

· 近红外光谱学专题 ·

[编者按]本课题组在白雁教授的带领下,自 1998 年以来一直与“河南省宛西制药股份有限公司”、“河南太龙药业股份有限公司”等河南知名中药企业合作,以河南道地药材及其制剂为研究对象,将红外光谱技术、近红外光谱技术等应用于药材、提取物及其相关制剂的质量控制中,在中医药理论指导下,整体辨证地评价、分析,建立起全成分、数据化的质量控制体系。承担和参与完成了国家 973、863、国家教育部、河南省重大公益科研项目、河南省杰出人才计划项目等各级科研项目 40 余项,撰写近红外质量分析研究专著 1 部,发表学术论文 400 余篇,获得国家发明专利 4 项,获省部级科技进步和自然科学奖 6 项,在中药的红外及近红外光谱质量分析、评价与生产过程控制等方面具有丰富的研究和实践经验。

近红外光谱法快速测定酒女贞子中女贞苷含量

史晶晶, 张迪文, 白雁, 谢彩侠*, 张苗
(河南中医药大学药学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:利用近红外光谱技术(NIRS)快速测定酒女贞子中女贞苷含量。方法:采用 3 个不同产地的黄酒对女贞子进行炮制,以 HPLC 测定样品中女贞苷的含量为参考,运用近红外光谱技术结合偏最小二乘法(PLS)建立酒女贞子中女贞苷含量的定量分析模型。结果:女贞苷的定量分析模型内部交叉验证决定系数(R^2)为 0.967 89,校正均方根偏差(RMSEC)为 0.107,预测均方根偏差(RMSEP)为 0.103,交互验证均方根偏差(RMSECV)为 0.256 69,主因子数为 8。结论:该方法简便快速,准确无损,所建模型能够对酒女贞子中女贞苷的含量进行快速测定。

[关键词] 近红外光谱; 偏最小二乘法; 酒女贞子; 女贞苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)08-0069-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080069

Fast Determination of Ligustroflavone in Wine Ligustri Lucidum Fructus by Near Infrared Spectroscopy

SHI Jing-jing, ZHANG Di-wen, BAI Yan, XIE Cai-xia*, ZHANG Miao
(School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of ligustroflavone in wine Ligustri Lucidum Fructus by near infrared spectroscopy. **Method:** Ligustri Lucidum Fructus was processed with ricewine from three different regions. With the content of ligustroflavone determined by HPLC as reference value, quantitative model of ligustroflavone content in wine Ligustri Lucidum Fructus was established by using near infrared spectroscopy combined with partial least squares (PLS). **Result:** The correlation coefficients (R^2) of the quantitative calibration model for ligustroflavone was 0.967 89; root mean square error of calibration (RMSEC) was 0.107; root mean square error of predication (RMSEP) was 0.103; root mean square error of cross validation (RMSECV) was 0.256 69, and the number of main factors was 16. **Conclusion:** This method is convenient and accurate. The

[收稿日期] 20150629(014)

[基金项目] 河南省中药开发工程技术研究中心项目(142102313109)

[第一作者] 史晶晶, 讲师, 从事中药质量评价研究, Tel:13526860891, E-mail:nanyangxey@126.com

[通讯作者] * 谢彩侠, 教授, 研究生导师, 从事中药质量控制研究, Tel:13673651577, E-mail:1210571736@qq.com

established models can realize fast determination of ligustroflavone in wine Ligustri Lucidum Fructus.

[Key words] near infrared spectroscopy; partial least squares; wine Ligustri Lucidum Fructus; ligustroflavone

女贞子是一味传统的扶正固本药物,具有滋补肝肾、明目乌发之功效^[1]。临床上应用女贞子多采用其酒蒸品,疗效更为显著^[2],现代药理学表明,女贞子除了具有显著的抗菌抗炎作用外,还具有降血糖、保肝、免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化等多种活性^[3-4]。女贞子中主要成分有女贞苷、红景天苷、特女贞苷、齐墩果酸、熊果酸等^[5-7]。

女贞苷含量可以作为酒女贞子的质量控制指标,评价其临床药效,常用的含量测定方法为高效液相色谱法,但此法样品前处理繁琐,分析时间较长,不利于药材质量的快速检测。近红外光谱技术(NIRS)结合了光谱衡量技术、化学计量学技术和基础测量技术,能够快速、高效、无损的对样品进行定性和定量分析,真正实现绿色分析。目前已经广泛用于中药活性成分的含量测定、中药纯化过程分析、天然药物鉴别和药材的快速模式识别等^[8]。

1 材料

Nicolet 6700 型傅里叶变换近红外光谱仪(配有 InGaAs 检测器,50 mL 标准石英样品杯,漫反射积分球,样品旋转器以及 OMNIC 光谱采集软件, TQ Analyst 8.0 分析软件,美国 Thermo 公司),2695 型高效液相色谱仪(2998 检测器,美国 Waters),SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂),FW-200 型高速药材粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),101A-2B 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司),AL204 型 1/1 万分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),CPA225D 型 1/10 万分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),HS-6150 型超声波清洗仪(昆山超声仪器有限公司)。

女贞苷对照品(批号 MUST-14062606,纯度 $\geq 98\%$,成都曼思特生物科技有限公司),乙腈色谱纯,其他试剂均为分析纯。黄酒(浙江古越龙山、山东即墨、河南镇平)。

女贞子药材采购于四川、湖南、浙江、河南 4 个产地共 30 份样品,由河南中医学院董诚明教授鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 酒女贞子的制备 取净制后女贞子 100 g,置于白瓷盘内,加黄酒 20 g 拌匀,闷润 2 h,并不停搅

拌使黄酒充分被吸收,置蒸锅内蒸 4 h,取出,60 °C 烘箱干燥,打粉(过 40 目筛)。

30 份样品按上述方法用 3 种黄酒进行炮制,共得 90 份酒女贞子样品。

2.2 女贞苷参考值的 HPLC 测定

2.2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(0 ~ 30 min, 15% ~ 34% 乙腈),检测波长 230 nm,柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,采集时间 40 min。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取女贞苷 1.08 mg,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,摇匀,即得 0.021 6 g·L⁻¹的女贞苷对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末 0.2 g 精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,加甲醇 25 mL,超声处理(30 min × 2),滤过,合并滤液至 100 mL 的蒸发皿中,蒸干,残渣用水溶解并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

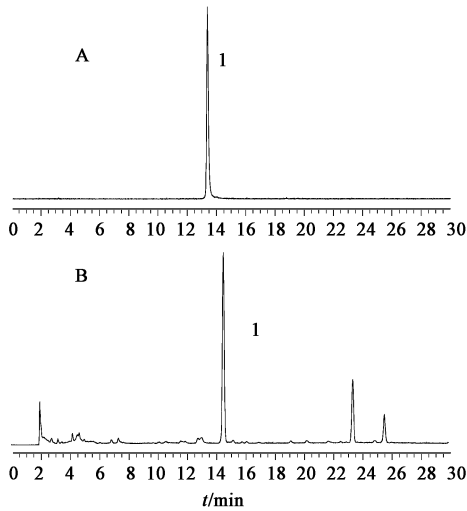
2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取 2.2.2 项下的女贞苷对照品溶液,配制成质量浓度为 0.120 4, 0.240 8, 0.361 2, 0.481 6, 0.602 0, 0.722 4, 0.842 8 g·L⁻¹的系列对照品溶液,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程为 $Y = 10138X - 80.193$ ($r = 0.9999$),线性范围 0.120 4 ~ 0.842 8 g·L⁻¹。

2.2.5 含量测定 每份样品平行测定 2 次,计算平均值,并以其作为建模参考值,女贞子药材中女贞苷 HPLC 色谱图见图 1,含量测定结果见表 1。

2.3 近红外光谱的采集 将 90 份样品粉碎过 40 目筛,取粉末约 5 g 装入石英杯,混合均匀,采用积分球漫反射,以空气为参比,扣除背景采集光谱图。采集参数为分辨率 8 cm⁻¹,光谱采集范围 12 000 ~ 4 000 cm⁻¹,扫描次数 64 次,每次扫描背景间隔 20 min。温度 25 ~ 28 °C,相对湿度 20% ~ 25%。每份样品重复扫描 3 次,求平均光谱,90 份样品的近红外光谱叠加图见图 2。

3 酒女贞子中女贞苷定量分析模型的建立与验证

3.1 校正集与验证集的选择 根据酒女贞子中女贞苷含量的分布情况,从 90 份酒女贞子样品中选择 70 份有代表性的样品组成校正集,其余 20 份样品为验证集,校正集和验证集样品之内女贞苷含量分



A 对照品; B 供试品; 1. 女贞苷

图 1 酒女贞子 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of wine Ligustri Lucidum Fructus

表 1 酒女贞子中女贞苷的含量

Table 1 Ligustr of lavone content of 90 samples

No.	女贞苷	No.	女贞苷	No.	女贞苷
1	2.20	31	1.99	61	2.32
2	2.06	32	2.26	62	2.38
3	2.08	33	2.03	63	2.67
4	1.96	34	2.07	64	2.45
5	2.12	35	2.05	65	2.02
6	1.94	36	2.40	66	1.86
7	2.11	37	2.30	67	1.88
8	2.05	38	2.46	68	1.33
9	1.75	39	2.05	69	1.19
10	1.97	40	2.34	70	1.18
11	1.83	41	2.32	71	1.91
12	1.82	42	2.13	72	1.67
13	2.08	43	2.12	73	2.02
14	1.91	44	1.19	74	1.91
15	1.96	45	1.38	75	2.12
16	2.16	46	1.02	76	1.61
17	2.08	47	1.28	77	1.80
18	1.93	48	1.13	78	1.49
19	2.06	49	1.97	79	1.46
20	2.09	50	1.15	80	1.18
21	1.87	51	1.26	81	1.31
22	1.85	52	1.05	82	1.94
23	2.05	53	1.32	83	2.18
24	1.86	54	1.39	84	1.91
25	2.01	55	1.51	85	1.34
26	1.93	56	1.27	86	1.27
27	2.02	57	1.15	87	1.03
28	1.86	58	1.44	88	1.47
29	1.86	59	2.44	89	1.50
30	2.34	60	2.44	90	1.48

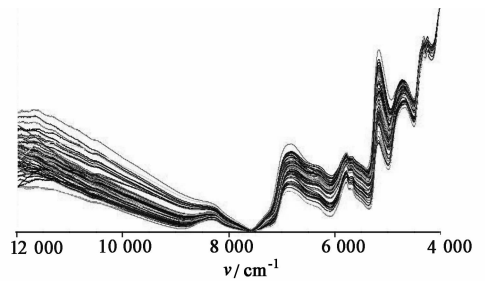


图 2 90 份酒女贞子样品近红外光谱叠加

Fig. 2 Near infrared reflectance spectra of 90 samples

布范围分别为 1.02% ~ 2.67% , 1.39% ~ 2.44% , 平均值分别为 1.79% , 1.97% 。

3.2 光谱预处理方法的选择 运用 TQ Analyst 8.0 分析软件进行数据处理, 结合 PLS 建立近红外定量分析模型。以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) 及交互验证均方根偏差 (RMSECV) 为综合指标, 考察不同建模方法的合理性。预处理方法对 R^2 , RMSEC, RMSEP 的影响见表 2。通过比较以 SNV + First Derivative 预处理效果最好, 可以消除样品光谱噪音以及漂移所造成的影响, 强化样品近红外光谱的谱带特征, 并克服样品谱带重叠的现象, 因此选用此法为光谱预处理的最佳方法。

表 2 不同预处理方法对定量模型性能的影响

Table 2 Effects of different pretreatment methods on quantitative model performance

光谱预处理方法	R^2	RMSEC	RMSEP	RMSECV
Constant	0.924 15	0.163	0.054	0.241 99
MSC + First Derivative	0.886 11	0.198	0.138	0.260 02
MSC + Second Derivative	0.998 00	0.027	0.217	0.289 84
SNV + Second Derivative	0.995 93	0.038	0.226	0.298 76
SNV + First Derivative	0.967 89	0.107	0.102	0.256 69
MSC + ND + First Derivative	0.962 54	0.116	0.092	0.193 62
MSC + ND + Second Derivative	0.964 47	0.113	0.110	0.192 96
MSC + SG + First Derivative	0.880 08	0.202	0.137	0.260 32
MSC + SG + Second Derivative	0.937 99	0.148	0.134	0.248 49
SNV + SG + First Derivative	0.962 06	0.116	0.096	0.256 34
SNV + SG + Second Derivative	0.935 42	0.151	0.137	0.251 39
SNV + ND + First Derivative	0.964 24	0.113	0.096	0.201 15

3.3 建模波段的选择 建模波段区间不仅要包含样品的大量信息, 避免重复信息, 而且要尽量消除样品光谱噪音。采用最佳预处理方法, 即 SNV + First Derivative, 对不同的波段进行手动优化比较, 选择最佳波段范围。结果见表 3, 在波段区间 4 001.50 ~

表 3 不同光谱范围对 R^2 和 RMSECV 的影响

光谱范围/ cm^{-1}	R^2	RMSECV
4 001.50 ~ 9 998.29	0.967 89	0.256 69
4 785.89 ~ 9 734.32	0.965 74	0.284 63
5 768.85 ~ 8 676.44	0.946 91	0.244 57
5 565.76 ~ 9 756.32	0.937 60	0.268 62

9 998.29 cm^{-1} , R^2 最接近 1, RMSECV 最小, 故此波段选为最佳建模波段。

3.4 主成分数的选择 在建模过程中, 采用不同的主成分数, 模型的预测能力不同, 主成分数太多, 模型包含过多的测量噪音, 校正过程会出现过拟合现象; 主成分数太少, 建模信息不全, 预测能力差。采用内部交叉验证考察主成分数对 RESECV 的影响, RESECV 随主成分数变化的曲线见图 3, RMSECV 最小值为 0.256 69, 对应的主成分数为 8。

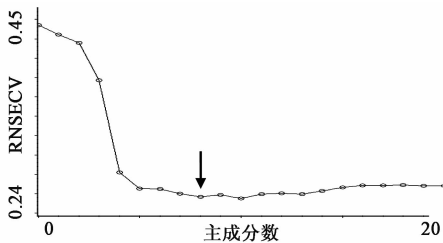


图 3 主成分数对 RMSECV 的影响

Fig. 3 RMSECV value with different factors for Ligustroflavone

3.5 定量模型的建立 运用 TQ Analyst 8.0 分析软件, 90 份样品进行建模, 对光谱采用 SNV + First Derivative 预处理方法, 在 4 001.50 ~ 9 998.29 cm^{-1} 波段范围, 8 个主成分数进行建模。用校正集样品进行内部验证, R^2 为 0.967 89, RMSEC 为 0.107, RMSEP 为 0.103, RMSECV 为 0.256 69。女贞苷的 NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关见图 4, 偏差见图 5, 可以看出预测值与参考值的相关性较高, 且结果很接近, 模型的性能较好, 该模型可以用于酒女贞子中女贞苷的定量分析。

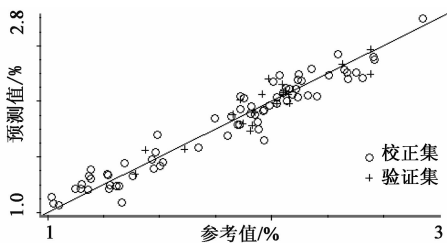


图 4 女贞苷 NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关

Fig. 4 Correlation between NIR predicted and reference values for Ligustroflavone

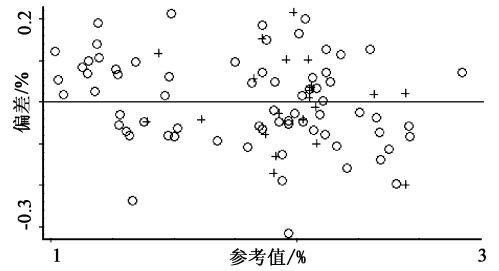


图 5 女贞苷 NIR 预测值与 HPLC 参考值的偏差

Fig. 5 Deviation between NIR predicted and reference values for Ligustroflavone

3.6 定量模型的验证 选择 20 份样品进行外部验证, 其女贞苷的含量均分布在校正集样品女贞苷含量范围之内。将其近红外图谱输入定量模型, 预测女贞苷含量, 并与 HPLC 测定的参考值作比较, 结果见表 5。预测结果绝对误差不超过 0.20%, 相对误差为 0.43% ~ 8.90%, 平均相对误差为 3.88%, 说明所建定量模型具有良好的预测能力与适应性。

表 5 NIR 预测值与 HPLC 测定值的比较

Table 5 NIR predicted values and HPLC reference values of validation set

No.	参考值	预测值	绝对误差	相对误差
1	2.05	2.15	0.10	4.87
2	1.83	1.88	0.05	2.73
3	2.08	1.98	-0.10	4.81
4	1.91	1.78	-0.13	6.80
5	2.08	2.06	-0.02	0.96
6	1.93	1.90	-0.03	1.55
7	1.91	1.74	-0.17	8.90
8	2.44	2.46	0.02	0.82
9	2.32	2.33	0.01	0.43
10	1.87	1.79	-0.08	4.27
11	2.05	2.08	0.03	1.46
12	2.02	1.98	-0.04	1.98
13	1.86	2.01	0.15	8.06
14	1.39	1.34	-0.05	3.59
15	1.44	1.56	0.12	8.33
16	2.06	2.10	0.04	1.94
17	1.96	2.06	0.10	5.10
18	2.05	2.06	0.01	0.48
19	2.44	2.24	-0.20	8.19
20	1.61	1.57	-0.04	2.48

4 讨论

近红外定量分析模型的建立,样品是否具有代表性非常关键。本试验收集的30份女贞子药材来自四川、湖南、浙江、河南4个产地,并用浙江古越龙山、山东即墨、河南镇平3个产地的黄酒进行酒蒸炮制,共得到90份酒女贞子样品,涵盖范围较广且分布较为均匀,具有一定的代表性。其次,对样品的近红外原始吸收光谱进行预处理也很关键,可消除光谱噪音、颗粒散射、光谱漂移等非线性因素对定量结果的影响。模型的建立以 R^2 , RMSEC, RMSEP和RMSECV为参考指标,其中, R^2 越接近1, RMSECV越小, RMSEC和RMSEP越小且越接近,则所建模型的适用性越强,预测结果越准确,可用于酒女贞子中有效成分女贞苷的含量预测。

本试验运用近红外光谱技术结合偏最小二乘法建立了一种快速测定酒女贞子中女贞苷含量的新方法,该方法分析速度快,获得信息多,简便快捷,测定过程不用化学试剂、不污染环境,真正实现“绿色”检验,节约检测成本。

[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: 43.
- [2] 姜秋, 蒋海强, 李慧芬, 等. 女贞子酒蒸过程中5种苯乙醇类成分的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 60-63.
- [3] 刘亭亭, 王萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 228-232.
- [4] 李慧芬, 张学兰, 赵资堂. 酒蒸女贞子对肾阴虚模型大鼠睾丸组织氧化应激损伤的保护作用[J]. 中成药, 2014, 36(10): 2144-2147.
- [5] 李转梅, 张学兰, 李慧芬, 等. 女贞子酒蒸过程中新女贞苷、木樨榄苷-11-甲酯和女贞酸的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 14-16.
- [6] 聂映, 姚卫峰. 女贞子的化学成分研究[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(5): 475-477.
- [7] 程敏, 胡正海. 女贞子的生物学和化学成分研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1219-1221.
- [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.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》社声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名, 冒用本刊名义, 骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明: ① <http://www.syfjxzz.com> 为本刊唯一域名, 其他域名均非本刊。

② 本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

③ 投稿成功后, 为确保稿件安全请与责任编辑电话联系。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为, 本刊将通过法律程序进行维权。