

· 化学与分析 ·

# 怀地黄中地黄苷 A, 地黄苷 D 及益母草苷含量快速 分析方法的建立

谢彩侠<sup>1,2</sup>, 李雅静<sup>1</sup>, 张苗<sup>1</sup>, 耿晓桐<sup>1</sup>, 雷敬卫<sup>1</sup>, 王丰青<sup>3\*</sup>, 张重义<sup>2\*</sup>

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 福建农林大学, 福州 350002;  
3. 河南农业大学, 郑州 450002)

**[摘要]** 目的:建立一种快速测定怀地黄中地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷含量的方法。方法:应用近红外光谱技术(near infrared reflectance spectroscopy, NIRS)测得 85-5,北京 1 号,白状元,沁怀,白选,沁怀郑共 6 个品种 108 份怀地黄样品的近红外光谱图,结合高效液相法(high performance liquid chromatography, HPLC)同时测定的样品中地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的含量,并利用 TQ 软件将光谱信息与测得含量相关联,采用偏最小二乘法(partial least squares, PLS)建立怀地黄中地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的定量分析模型。结果:模型的内部交叉验证决定系数( $R^2$ )分别为 0.924 67,0.934 96,0.951 54,校正均方差(root mean square error of calibration, RMSEC)分别为 0.016 6,0.015 9,0.022 8,验证均方差(root mean square error of prediction, RMSEP)分别为 0.017 00,0.007 86,0.012 50,交叉验证均方差(root mean square error of cross validation, RMSECV)分别为 0.032 13,0.030 36,0.069 22,以及性能指数(performance index, PI)分别为 92.5,82.7,83.1;配对样本  $t$  检验显示 NIR 模型预测值与 HPLC 测得参考值的  $P$  分别为 0.422,0.549,0.131,均  $>0.05$ ,表明两组数据无显著性差异。结论:该方法准确、快速、绿色,可用于怀地黄中地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的定量分析。

**[关键词]** 近红外光谱技术; 怀地黄; 快速测定; 偏最小二乘法; 地黄苷 A; 地黄苷 D; 益母草苷

**[中图分类号]** R284.1; 282.6; R931.71; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0047-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180612

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1411.020.html>

**[网络出版时间]** 2017-12-26 17:57

## Establishment of Rapid Method for Analysis of Content of Rehmaionoside A, Rehmaionoside D and Leonuride in Rehmanniae Radix

XIE Cai-xia<sup>1,2</sup>, LI Ya-jing<sup>1</sup>, ZHANG Miao<sup>1</sup>, GENG Xiao-tong<sup>1</sup>,  
LEI Jing-wei<sup>1</sup>, WANG Feng-qing<sup>3\*</sup>, ZHANG Zhong-yi<sup>2\*</sup>

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;  
2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;  
3. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a rapid analysis method for determining the contents of rehmaionoside A, rehmaionoside D and leonuride in Rehmanniae Radix. **Method:** Near-infrared spectra of six varieties of Rehmanniae Radix (108 samples) were obtained by near infrared diffuse reflectance spectroscopy (NIRS) technique. By using high performance liquid chromatography (HPLC) method, the contents of rehmannioside A, rehmaionoside D and leonuride were detected and their values were correlated with the spectra information by using

**[收稿日期]** 20170719(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473299);河南省自然科学基金项目(162300410157)

**[第一作者]** 谢彩侠,博士,教授,从事中药质量控制研究,E-mail: 1210571736@qq.com

**[通信作者]** \*张重义,博士,教授,从事中药资源可持续利用,E-mail: zy Zhang@fafu.edu.cn;

\*王丰青,博士,副教授,从事中药资源可持续利用,E-mail: heauzyqcxw@126.com

TQ Software. Then the quantitative models of rehmaionoside A, rehmaionoside D and leonuride in *Rehmanniae Radix* were built by partial least squares (PLS). **Result:** The correlation coefficients ( $R^2$ ) of the models was 0.924 67, 0.934 96 and 0.951 54; the root mean square error of calibration (RMSEC) was 0.016 6, 0.015 9 and 0.022 8; the root mean square error of prediction (RMSEP) was 0.017 00, 0.007 86 and 0.012 50; the root mean square error of cross validation (RMSECV) was 0.032 13, 0.030 36 and 0.069 22; and the performance index (PI) was 92.5, 82.7 and 83.1 respectively. Besides, paired sample *t*-test showed that the *P* value of NIR and HPLC was 0.422, 0.549 and 0.131, all higher than 0.05, indicating that there was no significant difference between the two methods. **Conclusion:** The NIR method is accurate, rapid, and green. It can be used for quantitative analysis of rehmaionoside A, rehmaionoside D and leonuride in *Rehmanniae Radix*.

[**Key words**] near infrared spectrum instrument; *Rehmanniae Radix*; rapid detection; partial least squares; rehmaionoside A; rehmaionoside D; leonuride

地黄具有养阴生津、清热凉血的功效,始载于《神农本草经》,被列为上品,以河南温县、武陟、孟县、沁阳为道地产区,系“四大怀药”之一<sup>[1-2]</sup>。地黄中主要含有环烯醚萜类、紫罗兰酮类、苯乙醇苷类、糖类化合物,其中以环烯醚萜苷类为主<sup>[3]</sup>。环烯醚萜苷类成分主要有梓醇、益母草苷、二氢梓醇、桃叶珊瑚苷、地黄苷 A、B、C、D 等,近代研究发现环烯醚萜苷类化合物以益母草苷为母体者居多并以原型入血<sup>[4]</sup>,且已报道地黄苷 A 具有良好的免疫活性<sup>[5]</sup>,地黄苷 D 具有明显降低血糖的作用<sup>[6]</sup>,故分析地黄中地黄苷 A、地黄苷 D、益母草苷的含量对地黄的质量评价具有重要意义。

目前,3 种苷类的含量测定大多应用 HPLC 法,精密度高,结果准确,但存在前处理复杂,成本高,耗时长等缺点,难以实现快速检测<sup>[7]</sup>。近红外光谱技术(NIRS)是利用化学计量学的方法将物质的近红外指纹图谱信息与其物理、化学及其他特征进行关联,建立的一种快速、无损的绿色分析方法,可以反映物质整体的质量信息<sup>[8]</sup>,因此,近几年广泛应用于中药的定性鉴别及定量分析。白雁等<sup>[9]</sup>采用 NIRS 对 3 种不同产地的地黄进行 NIRS 指纹图谱判别分析,建立不同产地地黄快速、简便的鉴别方法;薛淑娟等<sup>[10]</sup>基于 NIRS 对不同商品规格地黄进行定性及定量研究,建立了较理想的地黄中梓醇的近红外定量分析模型。目前,利用 NIRS 准确快速测定地黄中地黄苷 A、地黄苷 D 及益母草苷含量的方法鲜有报道。基于此,本实验以 6 个品种的地黄为研究对象,结合 NIRS 与 HPLC 技术建立一种快速测定怀地黄块根中地黄苷 A、地黄苷 D、益母草苷含量的方法,为快速评价地黄药材质量奠定基础,同时,为地黄生育期内 3 种苷类成分的在线检测提供思路,促进地黄产业发展。

## 1 材料

Nicolet 6700 型傅立叶变换近红外光谱仪(赛默飞世尔科技有限公司);Waters2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Milli-Q Academic A 10 型超纯水机(美国密理博公司);FW-100 型高速万能粉碎机;KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);CPA225D 型 1/10 万分析天平,AL 204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

色谱纯乙腈、甲醇;分析纯甲醇;自制双蒸水;中美纯水。对照品地黄苷 A 和地黄苷 D(批号分别为 150513,150412)均购自四川省维克奇生物科技有限公司;益母草苷(批号 L10A6Y2298)购自上海源叶科技有限公司;所有对照品均符合含量测定要求。

本实验采挖 85-5,北京 1 号,白状元,沁怀,白选,沁怀郑共 6 个品种的地黄样品,均产于河南焦作温县的地黄种植基地,经河南中医药大学董诚明教授鉴定为玄参科多年生草本植物地黄 *Rehmannia glutinosa*。生育期内随机均匀取样,净制、切制、干燥、粉碎,过 3 号筛,置干燥器中备用。样品信息见表 1。

## 2 方法与结果

**2.1 近红外光谱的采集** 取地黄粉末约 5 g 于石英杯中,均匀铺平,以空气为参比,采用积分球漫反射法采集样品的近红外光谱图。采集参数如下,光谱采集范围 12 000 ~ 4 000  $\text{cm}^{-1}$ ,采集分辨率 8  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数 64 次,温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 28%。每份样品重复扫描 3 次,取其平均谱图,108 份地黄样品的近红外光谱叠加见图 1。

**2.2 益母草苷,地黄苷 A,地黄苷 D 的含量测定**

**2.2.1 色谱条件** 采用 Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),以乙腈-水(4:96)为流动相,检测波长 205 nm,流速 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温

表 1 地黄样品信息

Table 1 Information of Rehmanniae Radix

No.	样品批次	No.	样品批次	No.	样品批次
1	07/10. 85-5 ①	37	07/10. 白状元 ①	73	07/10. 白选 ①
2	07/10. 85-5 ②	38	07/10. 白状元 ②	74	07/10. 白选 ②
3	08/02. 85-5 ①	39	08/02. 白状元 ①	75	08/02. 白选 ①
4	08/02. 85-5 ②	40	08/02. 白状元 ②	76	08/02. 白选 ②
5	08/21. 85-5 ①	41	08/21. 白状元 ①	77	08/21. 白选 ①
6	08/21. 85-5 ②	42	08/21. 白状元 ②	78	08/21. 白选 ②
7	09/10. 85-5 ①	43	09/10. 白状元 ①	79	09/10. 白选 ①
8	09/10. 85-5 ②	44	09/10. 白状元 ②	80	09/10. 白选 ②
9	09/30. 85-5 ①	45	09/30. 白状元 ①	81	09/30. 白选 ①
10	09/30. 85-5 ②	46	09/30. 白状元 ②	82	09/30. 白选 ②
11	10/10. 85-5 ①	47	10/10. 白状元 ①	83	10/10. 白选 ①
12	10/10. 85-5 ②	48	10/10. 白状元 ②	84	10/10. 白选 ②
13	10/21. 85-5 ①	49	10/21. 白状元 ①	85	10/21. 白选 ①
14	10/21. 85-5 ②	50	10/21. 白状元 ②	86	10/21. 白选 ②
15	10/30. 85-5 ①	51	10/30. 白状元 ①	87	10/30. 白选 ①
16	10/30. 85-5 ②	52	10/30. 白状元 ②	88	10/30. 白选 ②
17	11/11. 85-5 ①	53	11/11. 白状元 ①	89	11/11. 白选 ①
18	11/11. 85-5 ②	54	11/11. 白状元 ②	90	11/11. 白选 ②
19	07/10. 北京 1 号 ①	55	07/10. 沁怀 ①	91	07/10. 沁怀郑 ①
20	07/10. 北京 1 号 ②	56	07/10. 沁怀 ②	92	07/10. 沁怀郑 ②
21	08/02. 北京 1 号 ①	57	08/02. 沁怀 ①	93	08/02. 沁怀郑 ①
22	08/02. 北京 1 号 ②	58	08/02. 沁怀 ②	94	08/02. 沁怀郑 ②
23	08/21. 北京 1 号 ①	59	08/21. 沁怀 ①	95	08/21. 沁怀郑 ①
24	08/21. 北京 1 号 ②	60	08/21. 沁怀 ②	96	08/21. 沁怀郑 ②
25	09/10. 北京 1 号 ①	61	09/10. 沁怀 ①	97	09/10. 沁怀郑 ①
26	09/10. 北京 1 号 ②	62	09/10. 沁怀 ②	98	09/10. 沁怀郑 ②
27	09/30. 北京 1 号 ①	63	09/30. 沁怀 ①	99	09/30. 沁怀郑 ①
28	09/30. 北京 1 号 ②	64	09/30. 沁怀 ②	100	09/30. 沁怀郑 ②
29	10/10. 北京 1 号 ①	65	10/10. 沁怀 ①	101	10/10. 沁怀郑 ①
30	10/10. 北京 1 号 ②	66	10/10. 沁怀 ②	102	10/10. 沁怀郑 ②
31	10/21. 北京 1 号 ①	67	10/21. 沁怀 ①	103	10/21. 沁怀郑 ①
32	10/21. 北京 1 号 ②	68	10/21. 沁怀 ②	104	10/21. 沁怀郑 ②
33	10/30. 北京 1 号 ①	69	10/30. 沁怀 ①	105	10/30. 沁怀郑 ①
34	10/30. 北京 1 号 ②	70	10/30. 沁怀 ②	106	10/30. 沁怀郑 ②
35	11/11. 北京 1 号 ①	71	11/11. 沁怀 ①	107	11/11. 沁怀郑 ①
36	11/11. 北京 1 号 ②	72	11/11. 沁怀 ②	108	11/11. 沁怀郑 ②

30 ℃, 进样量 20 μL。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取地黄苷 A, 地黄苷 D, 益母草苷对照品适量, 用流动相定容至 5 mL, 得到地黄苷 A, 地黄苷 D, 益母草苷质量浓度

分别为 0.270, 0.344, 1.224 g · L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密称定地黄样品约 0.50 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 60% 甲醇 50 mL,

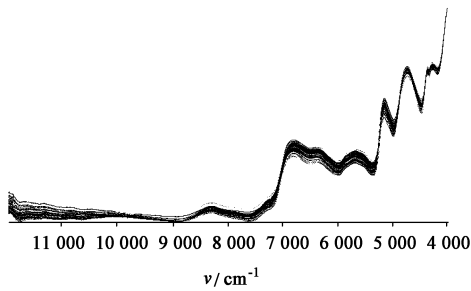


图 1 108 份怀地黄近红外光谱叠加  
Fig. 1 Near infrared spectrum overlay of 108 batches of Rehmanniae Radix

称定质量,超声提取 40 min,放冷至室温,补足减失质量;摇匀,滤过,精密量取续滤液 20 mL,浓缩至近干;残渣用流动相溶解,转移至 10 mL 量瓶中,用流动相定容,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

**2.2.4 线性关系考察** 精密吸取 2.2.2 项下对混合对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中,用流动相定容,得到 6 个不同质量浓度的对照品溶液。将上述对照品溶液按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面积积分值(Y)为纵坐标,对照品质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程。结果见表 2。

表 2 线性关系考察

Table 2 Linear relationship investigation

成分	回归方程	相关系数	线性范围/mg·L <sup>-1</sup>
地黄苷 A	$Y = 12.115X - 9.5933$	0.9997	10.8 ~ 64.8
地黄苷 D	$Y = 9.8175X - 12.773$	0.9996	13.76 ~ 82.56
益母草苷	$Y = 8.1179X + 27.56$	0.9996	48.96 ~ 293.76

**2.2.5 精密度试验** 精密吸取对照品溶液按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积,结果地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的峰面积 RSD 分别为 1.2%, 1.1%, 1.0%, 表明仪器的精密度良好。

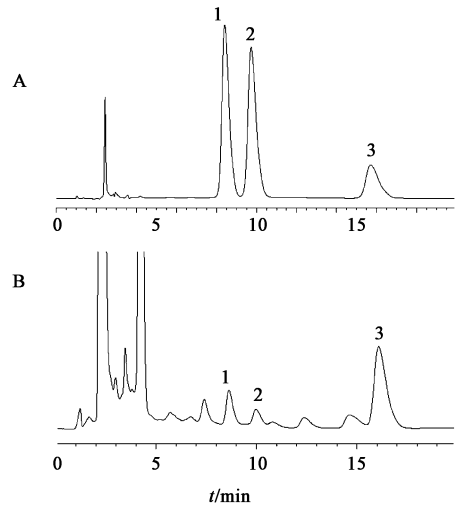
**2.2.6 稳定性试验** 将同一供试品溶液于样品制备后 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 按 2.2.1 项下色谱条件进样,记录峰面积,结果地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的峰面积 RSD 分别为 1.0%, 1.2%, 1.6%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.2.7 重复性试验** 精密称取同一批沁怀样品 6 份,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样,测定地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的含量,结果地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷含量的 RSD 分别为 1.3%, 1.4%, 0.7%, 说明该方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 精密称取 50 号样品 9

份,每份 0.25 g,分别精密加入适量地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷混合对照品溶液适量,按 2.2.3 项下方法制备。按 2.2.1 项下色谱条件进样,测定地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的含量,计算平均加样回收率与 RSD,结果地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷平均加样回收率分别为 100.83%, 100.84%, 99.55%, RSD 分别为 2.3%, 1.8%, 1.2%。

**2.2.9 样品含量测定** 取各样品按 2.2.3 项下制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进行测定,计算地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的含量;对照品及样品 HPLC 色谱图见图 2。含量测定结果见表 3。



1. 地黄苷 D; 2. 地黄苷 A; 3. 益母草苷; A. 对照品; B. 样品  
图 2 地黄样品 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC of Rehmanniae Radix

**2.3 地黄苷 A 定量分析模型的建立**

**2.3.1 校正集与验证集的选择** 根据怀地黄样品中地黄苷 A 的含量分布情况,从 108 份样品中选择 87 个样品建立定量分析模型,其中选择 76 个样品作为校正集,11 个样品作为验证集。验证集和校正集样品中地黄苷 A 的含量分布范围见表 4。

**2.3.2 光谱预处理方法的选择** 由于粉末样品均匀性、颗粒大小等因素使光程无法保持恒定,而且湿度、温度、仪器状态等条件也会影响建模的准确性,而通过对光谱进行预处理可降低这些影响。本实验以  $R^2$ , 验证均方差 (root mean square error of prediction, RMSEP), 校正均方差 (root mean square error of calibration, RMSEC), 性能指数 (performance index, PI) 作为参考指标考察不同处理方法对模型性能的影响, RMSEP, RMSEC 值越小,  $R^2$  越接近 1, PI 值越接近于 100, 表明该预处理方法越好。不同的预处理方法对模型性能的影响见表 5。综合分析

表 3 108 份怀地黄中益母草苷,地黄苷 A,地黄苷 D 的含量测定

Table 3 Determination of rehmaionoside A, rehmaionoside D and leonuride in Rehmanniae Radix

No.	地黄苷 A	地黄苷 D	益母草苷	No.	地黄苷 A	地黄苷 D	益母草苷	No.	地黄苷 A	地黄苷 D	益母草苷	No.	地黄苷 A	地黄苷 D	益母草苷
1	0.143	0.167	0.429	28	0.151	0.301	0.540	55	0.131	0.290	0.477	82	0.066	0.168	0.292
2	0.147	0.175	0.452	29	0.105	0.228	0.500	56	0.149	0.281	0.444	83	0.098	0.136	0.327
3	0.183	0.167	0.444	30	0.103	0.215	0.478	57	0.201	0.230	0.567	84	0.098	0.171	0.341
4	0.178	0.169	0.453	31	0.143	0.241	0.436	58	0.191	0.252	0.585	85	0.101	0.137	0.389
5	0.244	0.136	0.465	32	0.136	0.255	0.430	59	0.161	0.189	0.574	86	0.095	0.134	0.385
6	0.238	0.140	0.459	33	0.091	0.259	0.396	60	0.158	0.171	0.576	87	0.066	0.126	0.296
7	0.170	0.168	0.509	34	0.089	0.266	0.398	61	0.107	0.269	0.503	88	0.079	0.126	0.290
8	0.168	0.175	0.511	35	0.127	0.263	0.480	62	0.112	0.255	0.504	89	0.080	0.138	0.296
9	0.145	0.193	0.423	36	0.122	0.255	0.478	63	0.107	0.203	0.497	90	0.074	0.143	0.301
10	0.140	0.191	0.423	37	0.118	0.210	0.518	64	0.127	0.201	0.495	91	0.070	0.229	0.318
11	0.150	0.220	0.455	38	0.117	0.191	0.528	65	0.096	0.259	0.473	92	0.065	0.230	0.320
12	0.135	0.219	0.440	39	0.159	0.166	0.462	66	0.102	0.254	0.474	93	0.980	0.162	0.533
13	0.133	0.200	0.374	40	0.188	0.152	0.468	67	0.089	0.194	0.375	94	0.215	0.153	0.515
14	0.134	0.202	0.375	41	0.201	0.158	0.523	68	0.101	0.187	0.376	95	0.182	0.172	0.421
15	0.145	0.165	0.363	42	0.206	0.158	0.533	69	0.127	0.204	0.456	96	0.192	0.162	0.418
16	0.151	0.168	0.363	43	0.154	0.204	0.530	70	0.122	0.196	0.456	97	0.116	0.190	0.435
17	0.119	0.183	0.416	44	0.164	0.210	0.527	71	0.069	0.202	0.322	98	0.121	0.182	0.456
18	0.123	0.185	0.420	45	0.140	0.164	0.490	72	0.069	0.200	0.322	99	0.092	0.189	0.341
19	0.195	0.264	0.462	46	0.148	0.165	0.476	73	0.090	0.189	0.348	100	0.089	0.218	0.340
20	0.197	0.271	0.471	47	0.129	0.188	0.418	74	0.082	0.200	0.357	101	0.111	0.189	0.362
21	0.257	0.145	0.555	48	0.136	0.183	0.409	75	0.115	0.125	0.443	102	0.099	0.256	0.375
22	0.268	0.139	0.544	49	0.124	0.195	0.363	76	0.117	0.131	0.443	103	0.097	0.213	0.382
23	0.241	0.170	0.513	50	0.101	0.226	0.376	77	0.188	0.153	0.453	104	0.099	0.208	0.387
24	0.218	0.170	0.520	51	0.126	0.189	0.433	78	0.206	0.168	0.468	105	0.072	0.231	0.366
25	0.153	0.270	0.531	52	0.113	0.188	0.400	79	0.148	0.122	0.438	106	0.072	0.232	0.411
26	0.131	0.300	0.530	53	0.077	0.183	0.413	80	0.142	0.119	0.428	107	0.072	0.237	0.445
27	0.159	0.284	0.528	54	0.078	0.187	0.371	81	0.065	0.161	0.293	108	0.073	0.259	0.456

表 4 地黄苷 A 含量范围分布情况

Table 4 Distribution of content distribution of rehmaionoside A

组别	样品数/个	最大值/%	最小值/%	平均值/%
校正集	76	0.257	0.066	0.162
验证集	11	0.159	0.079	0.119

选择 MSC + FD + SG 为最佳光谱预处理方法。

**2.3.3 光谱范围的选择** 近红外光谱的波段扫描范围是 12 000 ~ 4 000  $\text{cm}^{-1}$ , 选择建模的波段尽量避免冗余信息以降低噪声干扰。本实验以  $R^2$ , RMSEP, RMSEC, PI 作为性能指标考察不同光谱范围对模型的影响。不同光谱范围对模型性能的影响见表 6。各项性能指标测试结果, 选择 10 967.47 ~ 7 019.78  $\text{cm}^{-1}$  为最佳的光谱范围。

**2.3.4 主成分数的选择** 采用偏最小二乘法 (PLS) 建立校正模型, 主成分数对所建模型的预测值影响较大, 主成分过多, 会将代表噪音的主成分加

表 5 不同预处理方法对模型性能的影响

Table 5 Effect of different pretreatment methods on model performance

光谱预处理方法	$R^2$	RMSEC	RMSEP	PI
MSC + FD + SG	0.972 40	0.010 2	0.014 80	93.5
constant + FD + ND	0.713 38	0.030 5	0.010 64	92.8
SNV + FD	0.953 16	0.013 2	0.016 90	92.6
MSC + SD	0.768 15	0.027 9	0.023 60	89.7
SNV + SD + SG	0.938 63	0.015 0	0.023 50	89.7
constant + SD + ND	0.684 31	0.031 8	0.021 70	90.5
SNV	0.692 00	0.031 4	0.020 70	90.9

入到模型中, 出现计算结果过拟合的现象; 主成分选择过少, 不能充分反映样品被测组分产生的光谱变化, 使模型的预测性能下降。本实验以交叉验证均方差 (RMSECV) 为优化参数, 选择合适的主成分数。将 RMSECV 值随主成分数变化作曲线。

表 6 不同光谱范围对模型性能的影响

Table 6 Effect of different spectral ranges on model performance

光谱范围/cm <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	RMSEC	RMSEP	PI
6 099.64 ~ 4 007.06	0.652 48	0.033 0	0.022 60	90.1
8 328.00 ~ 5 455.39	0.714 51	0.030 5	0.021 70	90.5
10 967.47 ~ 7 019.78	0.924 67	0.016 6	0.017 00	92.5
9 713.41 ~ 6 114.48	0.932 53	0.015 7	0.033 20	85.5
10 284.79 ~ 6 418.72	0.319 97	0.041 3	0.031 00	86.4

当 RMSECV 值最小时,所选主成分数最佳。RMSECV = 0.032 13 时最小,此时主成分数为 6。

**2.3.5 地黄苷 A NIR 定量分析模型的建立** 运用 TQ Analyst 8.0 分析软件结合 PLS 法,选择最优的光谱预处理方法、光谱范围、最佳主成分数建立地黄苷 A 的 NIR 定量分析模型。NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关图及偏差见图 3。

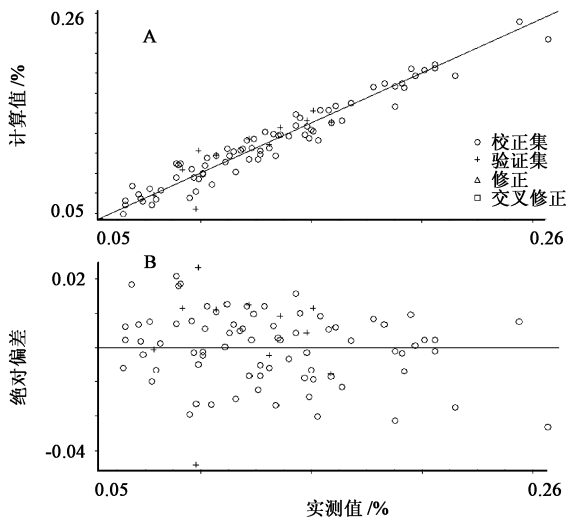


图 3 地黄苷 A NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关 (A) 及偏差 (B)  
Fig.3 Correlation (A) and deviation (B) of rehmaionoside A NIR predictive value and HPLC reference

**2.3.6 模型的验证** 本实验选择 11 个地黄样品作为验证集,输入到该模型中预测地黄苷 A 的含量。NIR 模型预测值与 HPLC 参考值的比较见表 7。由表 7 可知,模型预测值与参考值绝对偏差较小,比较接近;并应用 SPSS 19.0 对预测值和参考值做配对样本 *t* 检验,结果显示  $t = -0.834, P = 0.422 > 0.05$ ,表明两种方法的检测结果基本一致,无显著差异。

**2.4 地黄苷 D 定量分析模型的建立** 根据地黄样品中地黄苷 D 的含量分布,从 108 份样品中选取 93 个样品进行建模,随机选取校正集 81 个,验证集 12 个,并对光谱预处理方法、光谱范围和主成分数等建

表 7 验证集样品地黄苷 A 的 NIR 预测值与 HPLC 参考值的比较

Table 7 Comparison of rehmaionoside A of NIR predictive value and HPLC reference

No.	预测值/%	参考值/%	绝对偏差	<i>P</i>
14	0.151	0.159	-0.008	
23	0.091	0.092	-0.001	
41	0.105	0.107	-0.002	
62	0.150	0.151	-0.001	
67	0.129	0.131	-0.002	
70	0.135	0.136	-0.001	0.422
72	0.120	0.122	-0.002	
79	0.096	0.099	-0.003	
87	0.094	0.098	-0.004	
89	0.078	0.079	-0.001	
104	0.152	0.148	0.004	

模条件进行优化,以 Constant + FD, 11 701.94 ~ 7 101.94 cm<sup>-1</sup>,主成分数为 7 建立模型, R<sup>2</sup>, RMSEC, RMSEP, RMSECV 及 PI 分别为 0.934 96, 0.015 9, 0.007 86, 0.030 36, 82.7。NIR 预测值与 HPLC 参考值的偏差图及相关图见图 4, NIR 预测值与参考值的比较见表 8。由表 8 可知, NIR 预测值与参考值比较接近,绝对偏差较小;且配对样本 *t* 检验结果显示  $t = 0.618, P = 0.549 > 0.05$ ,表明预测值与参考值数据无显著性差异,基本一致。

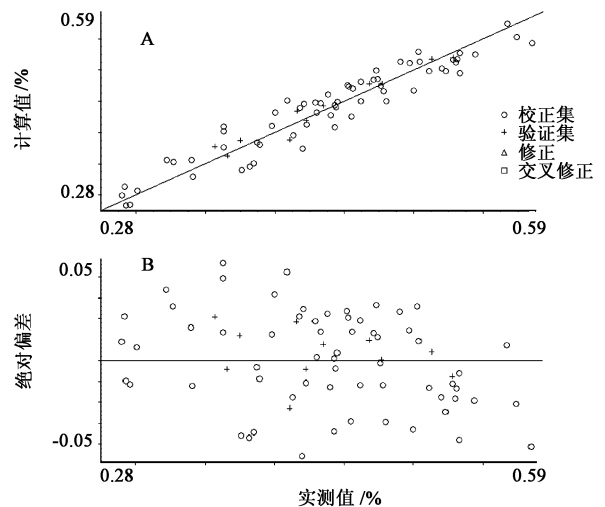


图 4 地黄苷 D NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关 (A) 及偏差 (B)  
Fig.4 Correlation (A) and deviation (B) of rehmaionoside D NIR predictive value and HPLC reference

**2.5 益母草苷定量分析模型的建立** 根据样品中益母草苷的含量分布,从 108 份样品中选取 74 个样品进行建模,随机选取校正集 63 个,验证集 11 个,并对光谱预处理方法、光谱范围和主成分数等建模

表 8 验证集样品的地黄苷 D NIR 预测值与 HPLC 参考值的比较  
Table 8 Correlation (A) and deviation (B) of rehmaionoside D NIR predictive value and HPLC reference of proof set sample

No.	预测值/%	参考值/%	绝对偏差	P
23	0.190	0.189	0.001	
38	0.234	0.230	0.004	
44	0.206	0.204	0.002	
45	0.207	0.202	0.005	
49	0.203	0.204	-0.001	
55	0.180	0.175	0.005	0.549
56	0.165	0.169	-0.004	
59	0.181	0.191	-0.010	
70	0.252	0.255	-0.003	
77	0.214	0.218	-0.004	
105	0.191	0.183	0.008	
106	0.198	0.189	0.009	

表 9 验证集样品的益母草苷 NIR 预测值与 HPLC 参考值的比较  
Table 9 Correlation (A) and deviation (B) of leonuride NIR predictive value and HPLC reference of proof set sample

No.	预测值/%	参考值/%	绝对偏差	P
9	0.435	0.416	0.019	
12	0.517	0.513	0.004	
22	0.443	0.435	0.008	
26	0.362	0.366	-0.004	
37	0.477	0.477	0.000	
59	0.419	0.423	-0.004	0.131
78	0.387	0.375	0.012	
80	0.409	0.411	-0.002	
82	0.358	0.357	0.001	
100	0.520	0.528	-0.008	
101	0.478	0.468	0.010	

条件进行优化,以 Constant + FD, 11 976.66 ~ 4 021.90  $\text{cm}^{-1}$ , 主成分数为 5 建立模型,  $R^2$ , RMSEC, RMSEP, RMSECV 及 PI 分别为 0.951 54, 0.022 8, 0.012 50, 0.069 22, 83.1。NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关图与偏差图见图 5, NIR 预测值与 HPLC 参考值的比较见表 9。由表 9 可知, NIR 模型预测益母草苷的含量结果与 HPLC 测定的数据比较接近, 绝对偏差较小; 且配对样本  $t$  检验结果显示  $t = 1.630, P = 0.131 > 0.05$ , 表明 NIR 预测值与参考值的差异无统计学意义, 可认为两组数据基本一致。

### 3 讨论

近代研究表明, 地黄苷 A 具有滋阴、增强体液免疫和细胞免疫的功能<sup>[5]</sup>。地黄苷 D 能够改善阴虚血虚病证, 具有降低血糖的作用<sup>[6]</sup>, 且其性质稳定、炮制前后含量均较高<sup>[11]</sup>, 较适合用于地黄质量评价。另外, 益母草苷为地黄中多数环烯醚萜苷类化合物的母体, 前期实验发现其在地黄道地性特征“菊花心”中含量较高, 本草考证也以地黄有“菊花心”为佳作为评价地黄质量的标准之一, 故地黄中益母草苷含量与地黄整体质量是否相关, 仍有待进一步研究。地黄苷 D 与益母草苷以原型入血, 推测其可能是地黄在生物体内直接发挥作用的物质<sup>[4]</sup>。因此, 地黄苷 A, 地黄苷 D 及益母草苷的研究价值不容忽视。科学的中药质量控制与评价方法是保证中药临床用药安全、有效、稳定、可控的重要前提, 2015 年版《中国药典》以梓醇与毛蕊花糖苷作为指标性成分控制地黄质量。而中药是一种多组分相互作用的特殊药品, 故对地黄苷 A, 地黄苷 D 及益母草苷的含量分析为进一步完善地黄质量评价体系提供依据。目前, 地黄中地黄苷 A, 地黄苷 D, 益母草苷的含量测定大多采用 HPLC 法, 由于地黄中地黄苷 A, 地黄苷 D, 益母草苷都属于环烯醚萜苷类化合物, 具有相似的化学性质, 故本实验在参考文献的基础上采用了 HPLC 法同时测定怀地黄中 3 种苷类含量的方法, 精密度高、结果准确<sup>[12-13]</sup>。但 HPLC 法存在前处理复杂、耗费有机试剂、对照品成本高、耗时长等缺点, 不适合药材在流通过程中的快速、批量检测, 以准确合理评价药材质量, 故迫切需要一种高效的

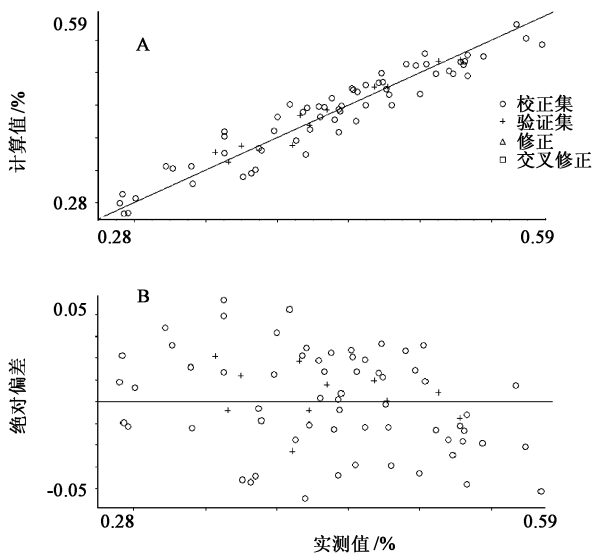


图 5 益母草苷 NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关 (A) 及偏差 (B)  
Fig. 5 Correlation (A) and deviation (B) of leonuride NIR predictive value and HPLC reference

分析方法以满足需求。

由于近红外光谱吸收强度弱,对大多数类型的样品,不需要进行任何处理便可直接检测,具有不破坏样品、不污染环境,具有检测方便、成本低、分析速度快、效率高等特点,尤其适合具有天然复杂体系样品的快速、高效、无损、现场分析<sup>[14-15]</sup>,近几年广泛应用于中药这一特殊药品的定性鉴别及定量分析。本实验将 NIRS 应用于地黄中地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷含量的快速检测。

实验前期发现,不同品种的地黄其苷类成分含量差异较大,故本实验选择 6 个品种的怀地黄作为研究对象,对其生育期内块根的近红外指纹图谱和地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的含量进行分析,样品具备差异性,且数据来源丰富,样本量充足具有代表性,在建立怀地黄中地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的定量分析模型时能够保证所建模型的准确性及适用性。同时在建模过程中,根据样品中地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的含量分布情况进行数据筛选,综合衡量  $R^2$ , RMSEC, RMSEP, PI 及 RMSECV 等模型性能参数,对光谱预处理方法、建模区间、主成分数进行考察,选择最佳建模组合,以去除冗余信息,提高模型精度。结果显示,实验建立的怀地黄中地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的快速定量分析模型性能良好,预测结果准确、偏差较小,可用于怀地黄中地黄苷 A,地黄苷 D,益母草苷的定量分析;该方法有效避免了常规检测方法的复杂、耗时间、污染环境、消耗试剂量大等问题,可实现大批量样品的快速检测,以快速高效评价地黄质量,同时,为地黄生育期内 3 种苷类成分的在线检测提供思路,为其他中药有效成分的快速测定提供参考。

由于地黄有较多的栽培品种,课题组将于后期在丰富样本量的同时,扩充地黄种质资源,对模型进行进一步校正和优化,不断提高该模型的稳定性和适用性;中药药效是在中药整体化学成分的共同作用下产生的,而 NIR 指纹图谱可以反映物质整体的质量信息,这与中医“整体观”的思想一致<sup>[15]</sup>,课题组将进一步以地黄 NIR 指纹图谱为基础,结合其药效学数据,应用生物信息学方法建立地黄 NIR 指纹图谱与其药效的关系,为揭示地黄药效物质基础及全面评控地黄质量提供参考。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:124-126.
- [2] 张蕾,邹妍,续洁琨,等. 地黄地上部分化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(16):3214.
- [3] 刘彦飞. 地黄活性物质与功能研究[D]. 北京:北京协和医学院,2013.
- [4] 王慧森,刘明,李更生,等. 鲜地黄提取物中 3 种原型入血成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):66-70.
- [5] 王军,于震,李更生,等. 地黄苷 A 对“阴虚”及免疫功能低下小鼠的药理作用[J]. 中国药理学杂志,2002,37(1):22-24.
- [6] 于震,王军,李更生,等. 地黄甙 D 滋阴补血和降血糖作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志,2001,28(4):240-242.
- [7] 谢惠英,时博,王丰青,等. NIRS 与 HPLC 结合快速测定知母中知母皂苷 B II 的含量[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2015,17(11):2306-2311.
- [8] 邵玉蓝,曹岗. HPLC 结合近红外光谱技术快速测定丹参饮片中丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量[J]. 中国医药导报,2014,11(9):135-137,141.
- [9] 白雁,李雯霞,谢彩侠,等. 3 种不同产地生地黄近红外图谱的判别分析[J]. 计算机与应用化学,2011,28(3):311-313.
- [10] 薛淑娟,陈随清,王利丽,等. 基于近红外光谱法对不同商品规格地黄进行定性及定量研究[J]. 中华中医药杂志,2017,32(5):2055-2059.
- [11] 李更生,王慧森. HPLC 法测定地黄中地黄苷 D 含量[J]. 中草药,2003,34(8):752-754.
- [12] 吴若男,张振凌,刘艳,等. 微波干燥对鲜地黄中地黄苷 A, D 和益母草苷含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(8):28-31.
- [13] 刘炯,张杰,张华锋,等. HPLC 测定不同品种怀地黄中地黄苷 A, D 的含量[J]. 药物分析杂志,2014,34(2):335-339.
- [14] 谢彩侠,王丽娜,刘蕊,等. NIRS 与 HPLC 指纹图谱技术在玉米须质量分析中的应用[J]. 药物分析杂志,2016,36(2):356-361.
- [15] 樊克锋,汤法银,赵建平,等. 红外光谱技术对生地黄整体评价[J]. 中国兽药杂志,2017,51(3):55-60.

[责任编辑 顾雪竹]