

近红外光谱快速测定栀子逆流提取过程中总苷含量

杨培培¹, 周函钰¹, 丛晓东^{1*}, 蔡宝昌^{1,2}

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053;

2. 南京中医药大学, 江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210049)

[摘要] **目的:**采用近红外光谱透射法快速测定栀子逆流提取过程中总苷含量。**方法:**以 UV 分析值作为参照,采用 NIR 透射法结合偏最小二乘法建立总苷含量的快速在线测定方法。采样方式为透射采集,采集区间 4 000 ~ 10 000 cm^{-1} ,分辨率 8.0 cm^{-1} ,扫描数 64 次,empty 门衰减,增益为 1,温度(25 ± 2) °C,相对湿度 45% ~ 50%。**结果:**建立的栀子逆流提取液中总苷校正模型的相关系数、校正均方差分别为 0.993,0.179。经外部验证,校正模型的预测均方差 0.145,预测值和真实值间回归方程的相关系数达 0.991。**结论:**NIR 可作为一种准确、快速的在线检测方法用于中药提取过程中有效成分的含量检测。

[关键词] 栀子; 总苷; 逆流提取工艺; 近红外光谱技术; 快速测定; 方差分析

[中图分类号] R284.1;R284.2;R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0036-03

[doi] 10.11653/syjf2014020036

Rapid Determination of Total Glycosides in Countercurrent Extracting Process of Gardeniae Fructus by Near-Infrared Spectroscopy

YANG Pei-pei¹, ZHOU Han-yu¹, CONG Xiao-dong^{1*}, CAI Bao-chang^{1,2}

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210049, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a near-infrared quantitative method for rapid determination of total glycosides in countercurrent extracting process of Gardeniae Fructus. **Method:** UV was used as a reference method to determine the content of total glycosides in Gardeniae Fructus, a rapid on-line determination method of total glycosides was established by NIR transmission method and partial least squares method. Sampling method for transmission acquisition, collection interval 4 000-10 000 cm^{-1} , resolution 8.0 cm^{-1} , number of scans 64 times, empty door attenuation, gain of 1, temperature at (25 ± 2) °C, relative humidity 45%-50%. **Result:** Correlation coefficients and calibration root-mean-square error of calibration model for total glycosides in countercurrent extract of Gardeniae Fructus were 0.993 and 0.179, respectively. By external validation, prediction root-mean-square error of calibration model was 0.145, correlation coefficient of regression equation between the actual value and the predicted value was 0.991. **Conclusion:** NIR could be used as a kind of accurate, rapid and on-line detection method for determination of active ingredients in extracting process of traditional Chinese medicine.

[Key words] Gardeniae Fructus; total glycosides; countercurrent extraction process; NIR; rapid determination; variance analysis

[收稿日期] 20130618(010)

[基金项目] 浙江省中医药科技计划项目(2009CB008)

[第一作者] 杨培培,在读硕士,从事中药炮制工艺与质量标准研究,Tel:15168343631,E-mail:peipeiyangky@126.com

[通讯作者] *丛晓东,硕士生导师,副教授,从事中药活性成分研究及新药开发,Tel:15158023754,E-mail:yppfriend123@163.com

栀子具有泻火除烦、清热、凉血解毒之功效,临床用于治疗热病心烦等症^[1]。栀子苷作为控制栀子质量的一个重要指标,具有显著降低谷丙转氨酶、消退黄疸和恢复肝功能的作用^[2]。2010年版《中国药典》中栀子苷含量的测定采用 HPLC^[1],但该方法耗时长,较难满足大批量样品快速检测的需求;文献报道栀子总苷含量的测定亦可采用 UV 测定^[3-4],但分析过程十分繁琐,样品需经过一系列前处理,费时费力,同时前处理过程往往会导致有效成分的损失,使得最终结果的准确度和精密密度受到影响,被处理样品也可能因为被破坏及化学污染而无法继续使用。近红外光谱法是一种新型的绿色分析技术,具有分析速度快、相对损耗小等优点,已逐渐应用于中药质量的控制^[6]。本实验将近红外光谱法和化学计量学相结合,采用偏最小二乘法建立栀子中总苷的定量校正模型,以达到对大批量栀子中总苷含量的迅速在线测定,为中药逆流提取过程中在线检测、快速终点判断和产品质量控制等提供一种可靠的分析方法^[8-9]。

1 材料

XS-105 型 1/万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),TGL-16 B 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),Antaris 型傅立叶变换近红外光谱仪(TQ 8.3.125 型分析软件,美国 Thermo 公司),UV-2450 型紫外分光光度计(日本岛津)。栀子(由浙江致中和实业有限公司提供,经浙江中医药大学中药饮片厂郑建宝主管中药师鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥果实,栀子提取液为栀子经 50% 乙醇逆流提取),栀子苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110749-200714),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 近红外光谱的采集 分别取栀子逆流萃取液适量,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,倒入液体样品管中,密塞,以内置背景作为参比,扣除参比,采集光谱图。采样方式为透射采集,采集区间 4 000 ~ 10 000 cm⁻¹,分辨率 8.0 cm⁻¹,扫描数 64 次,empty 门衰减,增益为 1,温度(25 ± 2) °C,相对湿度 45% ~ 50%。每份样品扫描 3 次,求平均值作为样品的 NIR 光谱,见图 1。

2.2 总苷含量的测定 将对照品溶液和供试品溶液经紫外扫描,发现两者均在 238 nm 处有最大吸收峰,故确定检测波长 238 nm。精密称取栀子苷对照品 2.13 mg 置于 50 mL 量瓶中,加无水乙醇定容至

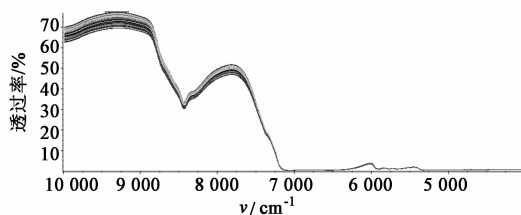


图 1 栀子逆流萃取液的近红外光谱

刻度作为母液。精密量取母液 1,2,3,4,5,6 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,得系列质量浓度的对照品溶液,分别于 238 nm 处测定吸光度(A),以对照品质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.02941C - 0.00564$ ($r = 0.9995$),表明栀子苷在 4.26 ~ 25.56 mg·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。分别将栀子醇提液稀释 500 倍,在 238 nm 处测定 A,计算样品中总苷质量浓度 3.97 ~ 14.06 g·L⁻¹。

2.3 模型方法的选择 运用 TQ 分析软件进行数据处理,选择多元信号校正(MSC)以解决基线漂移,比较偏最小二乘法(PLS)和主成分回归法(PCR)建模算法。结果表明 PLS 建立的模型优于 PCR,故选定采用 PLS 建立定量校正模型。以相关系数(r)和校正均方差(RMSEC)为指标选择建模参数和优化模型结构,以预测均方差(RMSEP)来考察模型的预测性能和推广能力。

2.4 处理方法选择 运用 UV 测定栀子总苷含量,结合 NIR,采用不同预处理方法建立校正模型,结果见表 1,性能指数(PI)均为 80.6,表明在选择的谱段范围内,宜采用 MSC + ND(一阶导数)预处理方法建模。

表 1 栀子逆流萃取液经不同预处理方法后建模的统计数据

预处理方法	r	RMSEC	RMSEP	主因子数
常数(Constant)	0.933 43	0.182	0.189	6
MSC	0.930 02	0.169	0.185	7
标准归一化(SNV)	0.945 33	0.128	0.156	7
MSC + no smooth(一阶导数)	0.974 45	0.189	0.190	7
MSC + SG(一阶导数)	0.972 32	0.178	0.197	6
MSC + ND(一阶导数)	0.993 43	0.179	0.188	6
MSC + SG(二阶导数)	0.984 21	0.149	0.198	8
MSC + ND(二阶导数)	0.971 43	0.156	0.193	10

2.5 波段选择 以 r 和 RMSEC 为指标,不断优化谱段范围,最终选择波段 5 407 ~ 5 218,7 023 ~ 6 942,7 123 ~ 7 096 cm⁻¹。

2.6 因子数选择 建立模型时,所选的主因子数对预测结果的影响相对较大。如果 PLS 选择的因子

数太少,光谱中一些有用的信息尚未被包含而导致模型预测能力欠佳;反之,选择的因子数过多,则会出现过拟合现象。采用内部验证法绘制内部交叉验证均方差(RMSECV)随主因子数的变化图(图 2),确定选择主因子数 6。

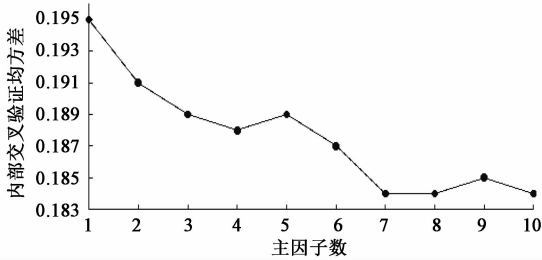


图 2 栀子总苷因子数的选择

2.7 模型的建立 从样品中选取 52 个为标准样本集,6 个为验证集。运用 PLS 建立栀子样品的定量校正模型,建模因子数为 6,结果见图 3, r 分别为 0.997,0.993,RMSEC 分别为 0.113,0.179。6 个内部验证集样品的相关数据见表 2。

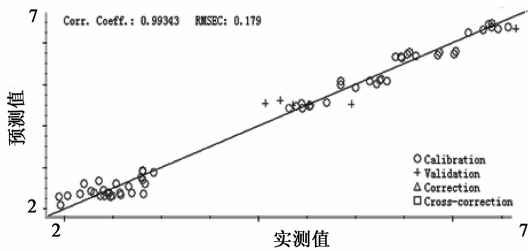


图 3 栀子总苷定量校正模型的建立

表 2 栀子总苷 PLS 建模的内部验证

No.	总苷			
	实测值 /g·L ⁻¹	预测值 /g·L ⁻¹	绝对误差 /g·L ⁻¹	相对误差 /%
1(5)	11.48	11.36	0.12	1.05
2(7)	10.67	10.58	0.09	0.84
3(23)	11.93	11.61	0.32	2.68
4(49)	12.18	12.53	0.35	2.87
5(51)	11.89	11.27	0.62	5.21
6(62)	10.88	11.21	0.33	3.03

2.8 外部验证 选择 17 批样品进行外部验证,以检验模型的准确性。栀子苷和总苷的预测值与真实值间分别建立回归方程为 $Y = 0.9958X + 0.07$ ($r = 0.991$),结果见表 3。

3 讨论

中药质量的稳定均一性难以保证一直是中药现代化的障碍,实现中药质量控制的在线化将在很大程度上改变这一现状,因此指标性成分的快速分析是中药发展的重要目标。NIR 技术由于快速、无损的特点,适合于大批量、快速检测中药材。将近红外光谱

表 3 栀子总苷 PLS 建模的外部验证

No.	总苷			
	实测值 /g·L ⁻¹	预测值 /g·L ⁻¹	绝对误差 /g·L ⁻¹	相对误差 /%
1(2)	11.13	11.04	0.09	0.81
2(3)	11.81	11.73	0.08	0.68
3(8)	11.03	11.22	0.19	1.72
4(12)	11.89	11.83	0.06	0.50
5(16)	13.17	13.16	0.01	0.08
6(19)	10.89	11.08	0.19	1.74
7(31)	11.37	11.37	0.00	0.00
8(33)	12.31	12.27	0.04	0.32
9(34)	13.19	13.04	0.15	1.14
10(37)	12.85	12.95	0.10	0.78
11(40)	13.21	13.42	0.21	1.59
12(41)	11.34	11.32	0.02	0.18
13(52)	10.88	11.18	0.30	2.76
14(55)	8.19	8.25	0.06	0.73
15(63)	8.02	8.08	0.06	0.75
16(65)	8.50	8.53	0.03	0.35
17(68)	8.72	8.63	0.09	1.03

法和化学计量法相结合,利用 PLS 建立了栀子逆流萃取中总苷的定量校正模型,可用于栀子总苷含量的快速测定。该方法具有快速、准确、分析对象多样且无须预处理的独特优点,建立的数学模型可作为中药材栀子生产过程即时分析和在线控制的手段。

[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,2010:231.
- [2] 王志超,杨小龙,张珂,等. 栀子苷药理作用的研究进展[J]. 河南科技大学学报:医学版,2012,30(2):159.
- [3] 王赞,李朝晖,华春. 中药栀子总环烯醚萜苷的含量测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(21):12859.
- [4] 李茂星. 藏药独一味止血活性部位的研究[J]. 兰州:兰州大学,2008.
- [5] 董晓强,魏惠珍,饶毅,等. 近红外光谱法快速测定六味地黄丸中马钱苷[J]. 中草药,2011,42(8):1453.
- [6] 苏碧茹,叶彬,耿春贤,等. 近红外光谱法快速测定消渴丸药粉中葛根素含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(6):672.
- [7] 褚小立,袁洪福,陆婉珍. 近年来我国近红外分析光谱技术的研究与应用进展[J]. 分析仪器,2006(2):1.
- [8] 金叶,丁海樱,吴永江,等. 近红外光谱技术用于血必净注射液提取过程的在线检测研究[J]. 药物分析杂志,2012,32(7):1214.
- [9] 严诗楷,罗国安,王义明,等. 栀子药材提取工艺的近红外光谱实时控制方法研究[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(6):1026.

[责任编辑 仝燕]