

近红外漫反射光谱法在青翘含量测定中的应用

白雁,段小彦,雷敬卫*,谢彩侠,张强
(河南中医学院,郑州 450046)

[摘要] 目的:运用近红外光谱法快速测定青翘中连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物的含量。方法:运用近红外光谱技术结合偏最小二乘法(PLS)建立青翘中连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物含量的定量校正模型。结果:连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物的定量校正模型的内部交叉验证决定系数(R^2)分别为 0.957 33,0.986 93,0.992 62,验证集相关系数(r)分别为 0.941 9,0.976 1,0.989 7。结论:近红外光谱法简便准确,可用于青翘中连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物含量的快速测定。

[关键词] 近红外光谱; 偏最小二乘法; 青翘; 测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)23-0111-04

[doi] 10.11653/syjf2013230111

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130924.1436.005.html>

[网络出版时间] 2013-09-24 14:36

Application of Near-infrared Spectroscopy in Determination of Green Forsythiae Fructus

BAI Yan, DUAN Xiao-yan, LEI Jing-wei*, XIE Cai-xia, ZHANG Qiang
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of phillyrin, forsythoside A and ethanol-extract in green Forsythiae Fructus by near-infrared spectroscopy. **Method:** Combine the near-infrared spectroscopy with partial least squares (PLS) to establish the quantitative model of phillyrin, forsythoside A and ethanol-extract in grown Forsythiae Fructus. **Result:** The correlation coefficients (R^2) of phillyrin, forsythoside A and ethanol-extract were respectively 0.957 33, 0.986 93 and 0.992 62. The validation coefficients (r) were respectively 0.941 9, 0.976 1 and 0.989 7. **Conclusion:** The method is convenient and accurate and it's feasible to determine the content of phillyrin, forsythoside A and ethanol-extract in green Forsythiae Fructus by near-infrared spectroscopy.

[Key words] near-infrared spectroscopy; PLS; green Forsythiae Fructus; determination

连翘为木犀科植物连翘的干燥果实,具有清热解毒,消肿散结,疏散风热之功效,为双黄连口服液、清热解毒口服液、银翘解毒片等中药制剂的主要原

料,临床应用广泛^[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”。2010年版《中国药典》以连翘苷、连翘酯苷 A、醇浸出物等作为其质量控制标准。连翘苷、连翘酯苷 A 的含量测定采用 HPLC 法,醇浸出物的含量测定采用冷浸法。这些分析方法操作繁琐,耗时较长,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。

近红外光谱技术是近年来迅猛发展的高新分析技术,扫描一张光谱可快速获取样品的多种信息,实现多组分的同时测量,具有高效、便捷、无损、环保等显著优点^[2-3],已广泛用于中药活性成分的测

[收稿日期] 20130719(016)

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(102102310402);2013年河南省工程技术中心项目(132102313104);郑州市重大科技攻关计划项目(121PPTGG509-1)

[第一作者] 白雁,教授,从事利用现代仪器分析方法对中药质量控制进行研究, Tel: 0371-65962967, E-mail: white-yan@hotmail.com

[通讯作者] *雷敬卫,副教授,博士,从事中药质量控制研究, Tel:18768870575, E-mail:312669121@qq.com

定^[4-7]。本试验采用近红外漫反射光谱技术结合偏最小二乘法建立青翘中连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物的定量分析模型,对其进行快速分析,为中药的快速质量控制提供参考。

1 材料

1.1 样品来源 85 份连翘药材于 2012 年 7 月至 9 月采自河南洛阳某药厂野生连翘基地,由河南中医药大学董诚明教授鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。除去杂质,蒸熟,晒干。

1.2 仪器 Nicolet 6700 型傅立叶变换近红外光谱仪(配有 InGaAs 检测器、外接积分球、样品旋转器、OMNIC 光谱采集软件和 TQ Analyst8 分析软件,美国 Thermo Nicolet 公司),Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司),FW-100 型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),CPA225D 型 1/10 万分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),AL204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q Academic A10 型超纯水机(美国 Millipore 公司),HY-8 型调速振荡器(国华电器有限公司),101-3AB 型电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司),DZKW-4 型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)。

1.3 试剂 连翘酯苷 A 对照品(批号 MUST-12100804,成都曼思特生物科技有限公司),连翘苷对照品(批号 MUST-11080301,成都曼思特生物科技有限公司),乙腈(色谱纯,Dikma Technology INC.),甲醇(色谱纯,天津市四友精细化学品有限公司),冰乙酸(天津市登科化学试剂有限公司),95%乙醇(分析纯,天津市登科化学试剂有限公司),中性氧化铝(100~200 目,上海五四化学试剂有限公司),中美纯水,蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 近红外光谱采集 将采集到的 85 份样品粉碎过 40 目筛,取约 8 g 粉末放入石英样品杯中,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。采集参数如下:分辨率 8 cm^{-1} ,光谱采集范围 $12\ 000\sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$,扫描次数 32 次,每次扫描背景间隔 20 min。温度 $20\sim 22\text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度 $30\%\sim 36\%$ 。每份样品重复扫描 3 次,求平均光谱,85 份样品的近红外光谱叠加图见图 1。

由图 1 可以看出各样品的近红外原始图谱基本一致,且谱带复杂,相互重叠,故根据此图无法判定

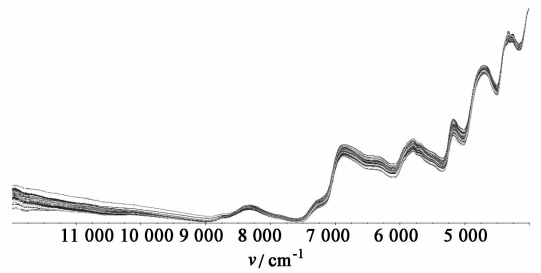


图 1 85 份样品的近红外光谱叠加

青翘各指标性成分含量与个别波长点吸光度之间的相关性,必须运用化学计量学方法建立其定量校正模型,才能确定青翘各指标性成分含量与其近红外光谱间的关系。

2.2 参考值的测定

2.2.1 连翘苷的含量测定 取青翘粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 15 mL,称定质量,浸渍过夜,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)25 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 mL,蒸至近干,加中性氧化铝 0.5 g 拌匀,加在中性氧化铝柱(1 g,内径 1.5 cm)上,用 70%乙醇 80 mL 洗脱,收集洗脱液,浓缩至干,残渣用 50%甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,待测。

采用 Agilent 1200 检测分析,Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(25:75),检测波长 277 nm,流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$,以外标法计算含量。85 份样品连翘苷的含量范围为 0.12%~1.33%。

2.2.2 连翘酯苷 A 的含量测定 取青翘粉末约 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,待测。

采用 Agilent 1200 检测分析,Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.4%冰醋酸溶液(15:85),检测波长 330 nm,流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$,以外标法计算含量。85 份样品连翘酯苷 A 的含量范围为 6.33%~11.88%。

2.2.3 醇浸出物的含量测定 取青翘粉末约 2 g,精密称定,置 250 mL 的锥形瓶中,精密加 65%乙醇 50 mL,密塞,冷浸,前 6 h 内时时振摇,再静置 18 h,用干燥滤器迅速滤过,精密量取续滤液 20 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于 $105\text{ }^\circ\text{C}$

干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量。计算醇浸出物的含量。85 份样品醇浸出物的含量范围为 42.51% ~ 54.91%。

2.3 模型的建立与验证 根据样品中连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物的含量分布,将 85 份样品分为校正集和验证集,使验证集样品各指标的含量均匀分布在校正集含量分布范围之内。表 1 列出了校正集和验证集连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物含量分布范围。

表 1 校正集和验证集连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物含量分布范围

指标	项目	样品数	最小值	最大值	平均值
			/%	/%	/%
连翘苷	校正集	70	0.12	1.33	0.61
	验证集	15	0.32	1.10	0.66
连翘酯苷 A	校正集	70	6.33	11.88	9.10
	验证集	15	7.32	10.69	8.59
醇浸出物	校正集	70	42.51	54.91	47.43
	验证集	15	44.32	51.35	48.10

2.3.1 模型的建立 采用偏最小二乘法建立定量校正模型,应用 TQ Analyst8 进行建模和优化,优化的内容包括光谱预处理方法、光谱范围及主成分数的选择。以 R^2 , RMSECV, RMSEC, RMSEP 为综合指标,考察不同建模方法的建模合理性。 R^2 越接近 1,参考值与近红外预测值相关性越好;均方差越小,且

RMSEP 与 RMSEC 越接近,所建模型适用性越强、预测效果越好。

采用化学计量学方法对光谱进行预处理可滤除噪音和其他不规则谱图影响因素,又能最大限度地保留样品成分浓度与近红外光谱间的线性关系,强化谱带特征^[8],得到更加稳健的模型^[9]。本文采用的光谱预处理方法有多元散射校正(MSC)、标准正交变量变换(SNV)、一阶导数法(1st Der)、二阶导数(2nd Der)、Norris derivative 平滑(ND 平滑)及 Savitzky-golay 平滑(SG 平滑)。

虽然 PLS 法允许处理全谱信息,但建模波段过宽,必然包含大量冗余信息^[10]。选择合适的光谱范围可以避免引入过多信息^[11],增大相对有效信息量,提高所建模型的性能。

合理确定参加建模的主成分数是充分利用光谱信息和滤除噪音的有效方法之一。主成分数对模型的稳定性有很大影响^[12],主成分数过多会使模型包含过多的测量噪声,导致过拟合;过少则导致建模信息不全,预测精度不够。本试验以 RMSECV 为优化参数,当 RMSECV 值最小时,所选主成分数最佳;且 RMSECV 越小,模型的预测精度越高。

通过优化,连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物的建模参数及评价指标见表 2。按照表 2 的建模参数建立连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物的定量校正模型,建模结果见图 2。

表 2 连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物的建模参数及评价指标

指标	建模参数			评价指标			
	光谱预处理方法	光谱范围/ cm^{-1}	主成分数	RMSECV	R^2	RMSEC	RMSEP
连翘苷	1st Der + SG 平滑	4 915 ~ 9 100	9	0.185 17	0.957 33	0.075 5	0.080 5
连翘酯苷 A	1st Der + ND 平滑	4 000 ~ 10 000	13	0.380 82	0.986 93	0.162	0.216
醇浸出物	MSC + 1st Der + SG 平滑	4 373 ~ 9 100	10	0.837 93	0.992 62	0.284	0.366

2.3.2 模型的验证 采用所建校正模型对预测集样品进行定量分析,从而判别模型的预测准确性。连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物的 RMSEP 分别为 0.080 5, 0.216, 0.366, 相关系数 r 分别为 0.941 9, 0.976 1, 0.989 7, 各指标参考值与预测值相关图见图 3。

从各指标定量校正模型图及参考值与预测值相关图可以看出,青翘近红外光谱与其中连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物含量之间存在一定的相关性,

NIR 预测值可以较准确接近药典法测定值,建立的 NIR 定量校正模型具有较好的预测效果,可快速预测其覆盖范围内青翘的连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物的含量。

3 讨论

近红外定量分析模型的适用范围取决于校正集样品指标性成分的含量范围,本试验收集到的青翘样品来自不同采收期,各指标性成分覆盖范围广且分布较均匀,具有一定的代表性,并且分析不同采收

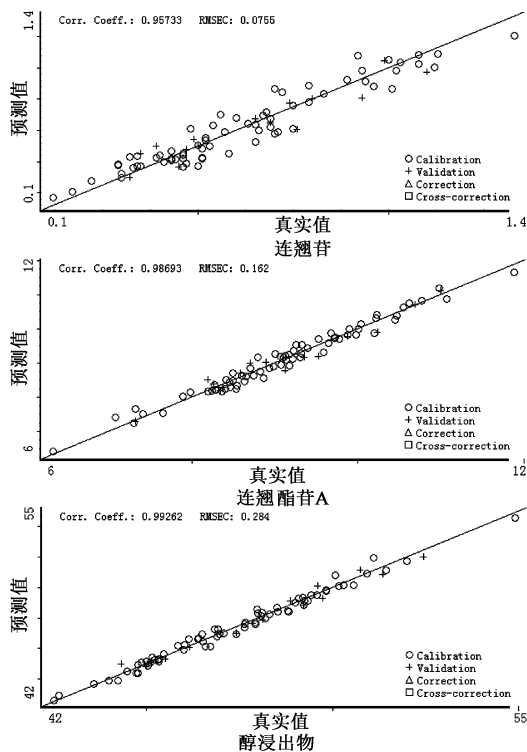


图 2 连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物的定量校正模型图

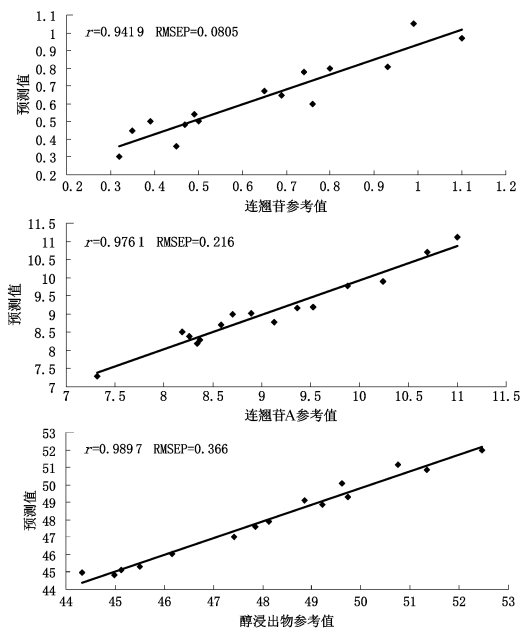


图 3 连翘苷、连翘酯苷 A 及醇浸出物参考值与预测值相关

时间连翘苷、连翘酯苷 A 与醇浸出物的含量能为青翘的最佳采收时间提供参考。

本试验与厂家合作,建立了青翘中 3 种指标性成分的定量校正模型,可用于企业在青翘原料药生产过程中的质量控制,对其他中药及有效成分的含量测定也具有一定的借鉴意义。

[参考文献]

- [1] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社, 2002:288.
- [2] 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.
- [3] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京:中国石化出版社,2007:36.
- [4] 徐广通,袁洪福,陆婉珍. 现代近红外光谱技术及应用进展[J]. 光谱学与光谱分析,2000,20(2):134.
- [5] 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.
- [6] 王宁,武卫红. 近红外光谱技术在中药分析领域中的应用[J]. 山东中医药大学学报,2007,31(4):350.
- [7] 杨南林,程翼宇,瞿海斌. 一种用于中药纯化过程的近红外光谱分析新方法[J]. 化学学报,2003,61(5):742.
- [8] 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, 2009:77.
- [9] 李勇. 近红外分析模型稳健性研究[D]. 兰州:西北农林科技大学,2005.
- [10] 王远,秦民坚,戚近,等. 近红外漫反射光谱法测定麦冬的多糖含量[J]. 光谱学与光谱分析,2009,29(10):2677.
- [11] 白雁,王星,陈志红,等. 近红外光谱法测定连翘药材中连翘苷含量[J]. 中成药,2009,31(11):1755.
- [12] 严衍禄. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005:175.

[责任编辑 顾雪竹]