

近红外光谱法快速测定枇杷叶中熊果酸的含量

李蕾蕾,王海霞,黄洁燕,林萍,姬生国*
(广东药学院 中药学院,广州 510006)

[摘要] 目的:建立枇杷叶药材中熊果酸含量的近红外光谱定量模型,快速测定枇杷叶中熊果酸含量。方法:用高效液相色谱法测定 131 批枇杷叶中熊果酸含量,采用二阶导数法预处理近红外光谱,结合偏最小二乘法建立枇杷叶中熊果酸含量的定量模型,并进行了内部交叉验证和 25 个枇杷叶样品的外部预测验证。结果:所建立的熊果酸近红外光谱定量分析模型,内部交叉验证决定系数达到 0.982 46,校正均方差为 0.175,预测均方差为 0.294,内部交叉验证均方差为 0.525 02。结论:该模型稳定,准确可靠,可应用于枇杷叶中熊果酸的含量测定。

[关键词] 枇杷叶; 高效液相色谱; 熊果酸含量; 近红外光谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0103-05

[doi] 10.11653/syfy2013230103

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130924.1437.007.html>

[网络出版时间] 2013-09-24 14:37

Rapid Determination of Ursolic acid Content in *Eriobotrya japonica* by Near-Infrared Spectroscopy

LI Lei-lei, WANG Hai-xia, HUANG Jie-yan, LING Ping, JI Sheng-guo*
(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University,
Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for the determination of ursolic acid content in *Eriobotrya japonica* by near-infrared spectroscopy. **Method:** The ursolic acid contents of 131 samples were determined by the method of HPLC. NIR spectrograms were measured, the second derivative was used as spectral preprocessing options, and calibration model of the ethanol extracts content was established by the partial least squares regression analysis, The models were verified by internal cross validation and external predictive validation with 25 *E. japonica* samples. **Result:** The correlation coefficients, the root-mean-square error of calibration, the root-mean-square error of prediction and the root-mean-square error of cross-validation of the calibration model for ethanol extracts content were 0.982 46, 0.175, 0.249 and 0.525 02. **Conclusion:** The method is steady, accurate, and can be used to predict ethanol extracts content of *Eriobotrya japonica* rapidly.

[Key words] *Eriobotrya japonica*; HPLC; ursolic acid content; NIRS.

枇杷叶来源于蔷薇科枇杷属植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶。研究

表明其化学成分主要含有三萜酸类、挥发油类、黄酮类、多酚、倍半萜及糖苷类等^[1]。近红外光谱分析技术(NIRS)是一种方便、快速、无损的绿色分析技术,光谱特性稳定,信息量大^[2]。本课题组已经利用该技术对广陈皮、广藿香进行了定性及定量模型的建立^[3-9],本文利用近红外光谱分析技术建立枇杷叶中熊果酸含量的近红外定量模型,以期实现枇杷叶药材的快速、准确的熊果酸含量测定。

1 材料

1.1 药材 2012年2月和11月期间分别采集于

[收稿日期] 20130531(012)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2009B030801044)

[第一作者] 李蕾蕾,硕士研究生,从事中药资源开发与道地性研究, Tel:020-39352327, E-mail:837127578@qq.com

[通讯作者] *姬生国,博士,教授,从事中药资源、中药质量标准、中药新药研究、分子生药学研究, Tel:020-39352327, E-mail:shengguo_ji@163.com

广东、湖北、河南、四川、浙江等省,经广东药学院中药学院姬生国教授鉴定,为蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶。枇杷叶药材经低温烘干后,粉碎过 60 目筛,保存于自封袋中,置于干燥器中备用。

1.2 仪器与试剂 傅立叶变换近红外光谱仪,配有漫反射积分球、样品旋转器和石英样品杯、OMNIC 光谱采集软件和 TQ8.0 分析软件(Nicolet 6700 型,美国 Thermo 公司)。1120 型全自动高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国迪马公司),BIY211b 型电子天平(日本岛津公司),KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),试剂除流动相为色谱纯外其余均为分析纯。熊果酸对照品(批号 MUST-12020602,纯度 >98%),购于成都曼思特生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 枇杷叶中熊果酸含量的测定方法^[10]

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称定样品 1 g,置具塞锥形瓶中,加乙醇 50 mL,称重,超声提取(功率 500 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,补足质量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

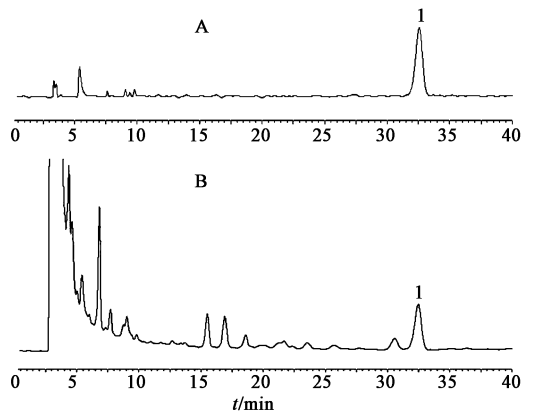
2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取熊果酸对照品 12.22 mg,加甲醇溶解,制成每 1 mL 含熊果酸对照品 1.222 mg 溶液,即得对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱条件 ODS-C₁₈ 色谱柱;流动相为甲醇-0.9% 磷酸二氢钠(86:14),流速为 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 210 nm,进样量 10 μL,理论塔板数为 14 558。保留时间约为 33 min,对照品及样品 HPLC 见图 1。

2.1.4 线性考察试验 精密吸取对照品贮备液 2.0,1.0,1.0,2.0,1.0,1.0 mL,分别加入甲醇定容至 5,5,10,25,25,50 mL,加甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过。按 2.1.3 项下进样测定(n=6),以对照品峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 8E + 07X + 824 717$ ($r = 0.999 9$)。结果表明,熊果酸对照品在质量浓度为 0.024 4 ~ 1.222 g·L⁻¹与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,按 2.1.3 项下测定连续进样测定 6 次,峰面积 RSD 2.2%,结果说明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密称定样品约 1.0 g,按 2.1.1 项下制成供试品溶液,按 2.1.3 项下测定,于 0,2,4,8,12,24 h 分别进样测定,计算熊果酸含量,RSD 1.0%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。



A. 对照品溶液;B. 样品溶液;1. 熊果酸
图 1 熊果酸对照品、枇杷叶供试品 HPLC

2.1.7 重复性试验 取同一批样品 6 份,每份 1.0 g,精密称定,分别按 2.1.1 项下方法制备成供试品溶液,按 2.1.3 项下方法进样测定,计算熊果酸含量,结果 RSD 2.3%,表明该方法的重复性良好。

2.1.8 回收率试验 精密称取 6 份已知含量的样品 0.4 g,精密加入 2.10 mg 熊果酸对照品,按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下方法进样测定,计算回收率。见表 1。

表 1 熊果酸加样回收率试验

| No. | 样品含量 /mg | 测得总量 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD /% |
|-----|----------|----------|--------|----------|--------|
| 1 | 2.051 83 | 4.110 7 | 98.043 | | |
| 2 | 2.051 83 | 4.104 4 | 97.74 | | |
| 3 | 2.050 80 | 4.076 0 | 96.439 | | |
| 4 | 2.047 74 | 4.089 8 | 97.239 | 98.246 | 1.53 |
| 5 | 2.048 25 | 4.137 9 | 99.505 | | |
| 6 | 2.051 32 | 4.162 0 | 100.51 | | |

注:称样量均为 0.4 g,加入量均为 2.10 mg。

2.1.9 样品含量测定 将所有样品按 2.1.1 项下供试品制备方法制备成供试品溶液,按 2.1.3 项下含量测定方法进行测定,记录色谱图,计算各样品中熊果酸含量,131 份枇杷叶中熊果酸含量在 7.505% ~ 11.745%,且分布均匀,符合正态分布。结果见图 2。

2.2 近红外光谱的采集 取样品粉末 4 g,混合均匀后放入石英样品杯,轻轻振摇使分布均匀。采用积分球漫反射测样,分辨率 8 cm⁻¹;扫描 64 次;扫描范围 12 000 ~ 4 000 cm⁻¹;温度(22 ± 0.5) °C;相对湿度 35% ~ 40%。每批样品重复装样并扫描 5 次,求平均光谱。131 批样品的近红外光谱叠加图见图 3。

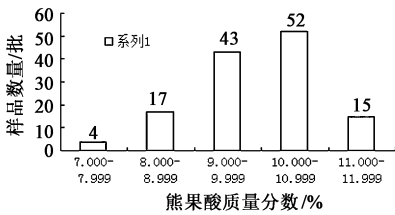


图2 枇杷叶中熊果酸含量的分布

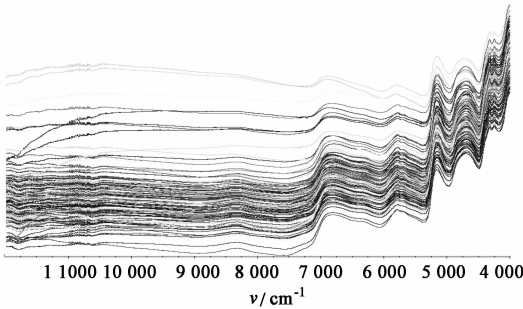


图3 131批枇杷叶样品的近红外光谱叠加图

2.3 光谱预处理^[11] 在近红外光谱采集时,有许多高频随机噪声、基线漂移、信号本底、样品颗粒大小和光散射等的噪声信息带入光谱中,干扰近红外吸收强度和样品中各指标的关系,并影响近红外模型的可靠性和准确性,因此,必须对原始光谱进行预处理。本实验结合多元散射校正(MSC)、标准归一化法(SNV)、一阶或二阶导数和平滑进行光谱预处理。以内部交叉验证决定系数(R^2)、校正均方差(Root-mean-square error of calibration, RMSEC)、预测均方差(Root-mean-square error of prediction, RMSEP)为综合指标,考察不同预处理方法对模型建立的影响。其中, R^2 越接近1,说明样品分析值与近红外预测值相关性越好;RMSEC, RMSEP越小,说明模型的预测性能越好。最终由TQ Analyst软件筛选出最优化的模型,具体参数见表2。

2.4 建模波段的选择^[12] 通过对光谱进行二阶导数处理,从处理后的光谱图可以看出不同批次样品的近红外光谱十分接近,无法直接判定熊果酸的含量与个别波长点的吸光度之间的相关性,不可能从某一个波长点来确定其含量,必须在一定的区间内建立数学模型来确定近红外光谱与含量间的定量关系。由于采用全谱建模工作量大、噪音干扰多,多采用优选特征波段进行建模。以 R^2 , RMSEC, RMSEP等为综合指标,考察不同建模波段对模型的影响,通过与其他波段的对比,可以看出在9 609 ~ 4 087 cm^{-1} 区间样品内吸收强度存在差异,信息量丰富,噪音干扰小,能反映出样品的性质和组成间的关联,确定此波段为最佳建模区间,见图4、表3。

表2 不同预处理方法对模型性能的影响

| 光谱预处理方法 | R^2 | RMSEC | RMSEP |
|-----------------------------|----------|-------|-------|
| Constant(无) | 0.862 4 | 0.480 | 0.474 |
| SNV(标准归一化) | 0.186 50 | 0.924 | 0.721 |
| MSC(多元散射校正) | 0.801 72 | 0.562 | 0.527 |
| First Derivative(一阶导数) | 0.883 19 | 0.441 | 0.433 |
| Second Derivative(二阶导数) | 0.982 46 | 0.175 | 0.294 |
| Second Derivative + SG 卷积平滑 | 0.825 59 | 0.531 | 0.434 |
| Second Derivative + ND 平滑 | 0.814 68 | 0.545 | 0.450 |

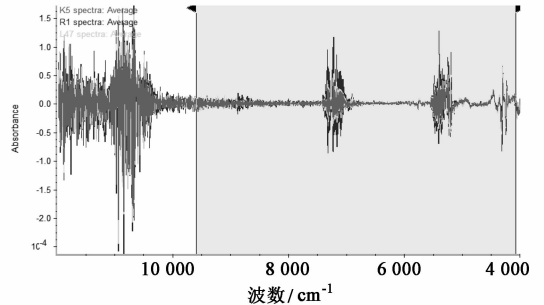


图4 样品的一阶导数光谱

表3 不同建模区间对模型性能的影响

| 建模区间/ cm^{-1} | R^2 | RMSECV | RMSEP |
|------------------------------|----------|--------|-------|
| 11 814 ~ 4 069 | 0.962 83 | 0.256 | 0.874 |
| 9 609 ~ 4 087 | 0.982 46 | 0.175 | 0.249 |
| 7 439 ~ 5 142 | 0.981 17 | 0.182 | 0.563 |
| 8 028 ~ 4 087; 5 633 ~ 4 087 | 0.859 63 | 0.481 | 0.447 |

2.5 主因子数的选定^[13] 本文选用偏最小二乘法(PLS)建立定量模型,PLS法的特点是速度快,准确可靠,预测能力强,具有一定的消除非线性的能力。可以说PLS法是多元线性回归、典型相关分析和主成分分析的完美结合。采用PLS法建立定量校正模型时,为了充分利用光谱信号的有效信息,同时避免过度拟合现象,需对主因子的阶数进行合理选择。本实验以校正集内部交叉验证均方差(Root-mean-square root of crossvalidation, RMSECV)为优化参数, RMSECV越小,模型的预测精度越高,当RMSECV值最小时,所选主因子数最佳。本实验RMSECV最小值为0.525 02,对应的最佳主因子数为10。见图5。

2.6 校正模型的建立 运用TQ8.0定量分析软件中PLS法建立校正模型,图6为131份校正集样品交互验证得到的NIR预测值与参考值之间的相关图,可以看出,校正集样品均匀地分布在回归线的两侧。经内部交叉验证得RMSEC = 0.175, $R^2 = 0.982 46$ 。

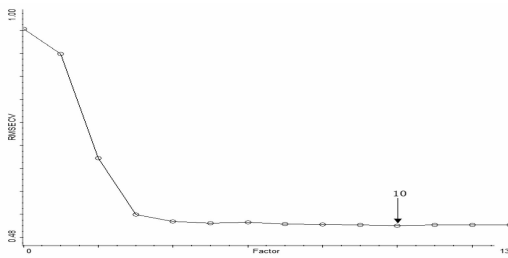


图 5 RMSECV 值随主成分的变化

图 7 为校正集样本与预测集样本的 NIR 预测值与参考值之间的绝对偏差图,可以看出,NIR 测定值与药典法测定值之间的绝对偏差在 ± 0.6 。

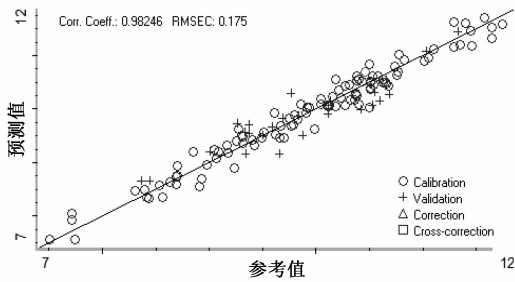


图 6 校正集样品交互验证得到的 NIR 预测值与参考值之间的相关性

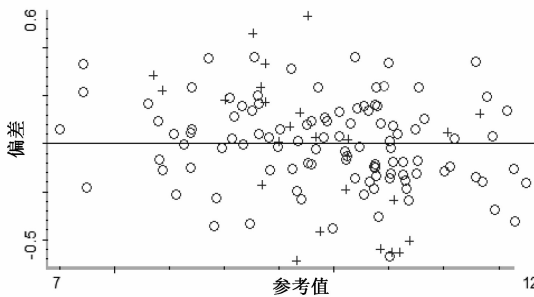


图 7 校正集样本与预测集样本的 NIR 预测值与参考值之间的绝对偏差性

2.7 校正模型和验证^[14] 近红外光谱经过 Second Derivative 处理后,在 $9\ 609 \sim 4\ 087\ \text{cm}^{-1}$,选择前 10 个主成分建立了最优校正模型。该模型的 $R^2 = 0.982\ 46$, $\text{RMSEC} = 0.175$, $\text{RMSEP} = 0.249$ 。以预测值与实测值的比值为预测回收率,25 批验证集样品的平均预测回收率为 99.944%,见表 4。

3 讨论

本文利用近红外光谱技术结合化学计量法获得枇杷叶药材样品中的有效信息,通过与对应样品中熊果酸的含量进行线性拟合而建立枇杷叶中熊果酸含量测定模型,模型准确可靠。与常规的分析方法相比,可以节省大量的分析时间,适用于大批量枇杷

表 4 验证集样品的预测

| 编号 | 实测值 | 预测值 | 绝对偏 | 平均回收率 |
|----|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 10.685 | 10.279 | -0.406 | |
| 2 | 9.691 | 9.818 | 0.127 | |
| 3 | 9.342 | 9.169 | -0.173 | |
| 4 | 9.374 | 9.548 | 0.174 | |
| 5 | 10.109 | 9.916 | -0.193 | |
| 6 | 9.502 | 9.509 | 0.007 | |
| 7 | 9.874 | 9.506 | -0.368 | |
| 8 | 10.116 | 10.063 | -0.053 | |
| 9 | 9.833 | 9.861 | 0.028 | |
| 10 | 10.548 | 10.313 | -0.235 | |
| 11 | 8.361 | 8.647 | 0.286 | |
| 12 | 8.442 | 8.664 | 0.222 | |
| 13 | 9.264 | 9.725 | 0.461 | 99.944 |
| 14 | 9.765 | 10.297 | 0.532 | |
| 15 | 9.376 | 9.710 | 0.334 | |
| 16 | 9.658 | 9.169 | -0.489 | |
| 17 | 11.328 | 11.449 | 0.121 | |
| 18 | 10.422 | 9.982 | -0.44 | |
| 19 | 10.132 | 10.150 | 0.018 | |
| 20 | 9.595 | 9.664 | 0.069 | |
| 21 | 11.034 | 11.081 | 0.047 | |
| 22 | 9.336 | 9.573 | 0.237 | |
| 23 | 10.528 | 10.074 | -0.454 | |
| 24 | 9.012 | 9.195 | 0.183 | |
| 25 | 10.595 | 10.142 | -0.453 | |

叶药材中熊果酸的快速测定,为中药及其制剂的快速、有效的质量控制方法提供参考。

[参考文献]

[1] 李婷,林文津,徐榕青,等. 枇杷叶的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2010,29(5):11.

[2] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 2 版. 北京: 中国石化出版社,2006:35.

[3] 蔡佳良,郭念欣,姬生国. 不同干燥方法对广藿香中百秋李醇含量影响的近红外光谱分析[J]. 云南中医中药杂志,2013,34(1):53.

[4] 蔡佳良,李蕾蕾,姬生国. 近红外光谱法快速测定广藿香中水分含量[J]. 医药导报,2012,31(11):1468.

[5] 蔡佳良,黄洁燕,邓婉婷,等. 近红外光谱法快速测定广藿香中醇溶性浸出物含量[J]. 中国药学杂志,2012,47(24):2026.

人参提取物中腐霉利残留的 HPLC 分析

任刚, 廖卫波, 胡志成, 易文芳, 刘荣华, 邵峰, 黄慧莲, 袁金斌*
(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 建立人参提取物中农药残留-腐霉利的 HPLC 含量测定方法。方法: BDS HYPERSIL C₁₈ 分析色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (40:60), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm。结果: 腐霉利进样量 0.001 ~ 0.6 μg 与色谱峰面积呈良好线性关系 ($R^2 = 0.9994$), 平均加样回收率 100.0% ($n = 9$), RSD 3.0%。结论: 该法简便、准确、可靠, 可用于人参提取物中腐霉利残留的含量测定。

[关键词] 人参提取物; 腐霉利; 高效液相色谱; 农药残留

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0107-04

[doi] 10.11653/syjf2013230107

Analysis of Procymidone Residues in Ginseng Extract by HPLC

REN Gang, LIAO Wei-bo, HU Zhi-cheng, YI Wen-fang, LIU Rong-hua,
SHAO Feng, HUANG Hui-lian, YUAN Jin-bin*

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University
of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of procymidone residues in ginseng extract. **Method:** The BDS HYPERSIL C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used as analytical column with the mobile phase of acetonitrile-water (40:60) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detective wavelength was set at 220 nm. **Result:** Good linear range was obtained for the procymidone with an injection amount ranging from 0.001 to 0.6 μg ($R^2 = 0.9994$). The average recovery was 100.0% ($n = 9$), and RSD was

[收稿日期] 20130424(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160509, 81260605)

[第一作者] 任刚, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 0791-87119065, E-mail: firmblue@163.com

[通讯作者] * 袁金斌, 博士, 副教授, 从事中药物质基础与质量控制研究, Tel: 0791-87118659, E-mail: kings2008@163.com

- [6] 蔡佳良, 黄洁燕, 李蕾蕾, 等. 运用近红外光谱法建立广藿香含叶量定量分析模型[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(3): 260.
- [7] 蔡佳良, 郭念欣, 黄洁燕, 等. 近红外光谱法建立测定广藿香中百秋李醇的定量模型[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2113.
- [8] 郭念欣, 蔡佳良, 姬生国. 近红外光谱技术在陈皮道地性分析中的应用[J]. 中国药房, 2013, 24(15): 1394.
- [9] 郭念欣, 蔡佳良, 李蕾蕾, 等. 运用近红外技术建立藿香正气胶囊中厚朴酚的定量模型[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 146.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [11] 周芸, 张晓玲, 吴永江, 等. 近红外漫反射光谱法快速测定莲房原花青素及多酚含量[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(3): 220.
- [12] 王星, 白雁, 陈志红, 等. 近红外光谱法测定连翘中连翘酯苷含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2071.
- [13] 封银曼, 张威, 白杨, 等. 黄芩提取物有效成分的近红外光谱定量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 84.
- [14] 宋丽丽, 范丙义, 徐晓杰, 等. 近红外光谱法用于六味地黄丸模拟样品中熊果酸的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1590.

[责任编辑 顾雪竹]