

近红外光谱法快速测定杭白菊中 3 种成分的含量

程亮¹, 杜伟锋^{1*}, 丛晓东¹, 蔡宝昌^{1,2*}, 葛卫红¹

(1. 浙江中医药大学, 中药炮制技术研究中心, 杭州 311401;

2. 南京中医药大学, 江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029)

[摘要] **目的:**建立杭白菊中绿原酸、木犀草苷及 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸含量快速测定的近红外光谱模型。**方法:**以 HPLC 分析值作为参照,采用傅里叶变换近红外漫反射光谱技术采集杭白菊的近红外光谱,结合偏最小二乘法(PLS)建立绿原酸、木犀草苷及 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸含量的快速测定方法。**结果:**杭白菊中绿原酸、木犀草苷及 3-5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸近红外光谱校正模型的相关系数(R)、校正均方差(RMSEC)、内部验证均方差(RMSEP)分别为 0.954 93,0.015 7,0.012 7,0.984 50,0.013 1,0.017 6 和 0.998 28,0.009 17,0.005 11。经外部验证,3 种成分的预测值和真实值相关系数分别达到 0.940 4,0.941 2,0.944 6。**结论:**该方法准确、快速、简便,可实现杭白菊大批量样品的快速分析。

[关键词] 杭白菊; 近红外光谱法; 绿原酸; 木犀草苷; 3, 5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0085-05

[doi] 10.11653/zgsyfyxzz2013070085

Rapid Determination of Three Ingredients in *Chrysanthemum morifolium* by Near-infrared Spectroscopy

CHENG Liang¹, DU Wei-feng^{1*}, CONG Xiao-dong¹, CAI Bao-chang^{1,2*}, GE Wei-hong¹

(1. Research Center of Traditional Chinese Medicine Processing Technology, Zhejiang Chinese

Medical University, Hangzhou 311401, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing,

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** A near-infrared quantitative method was developed for rapid determination of chlorogenic acid, luteoloside and isochlorogenic acid A in *Chrysanthemum morifolium*. **Method:** Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy technology was adopted to collect NIR spectra of *C. morifolium* with HPLC analysis values as reference, the rapid determination method of chlorogenic acid, luteoloside and isochlorogenic acid A was established with partial least squares (PLS). **Result:** The correlation coefficients, the root-mean-square error of calibration (RMSEC) and the root-mean-square error of validation (RMSEP) of the calibration model for chlorogenic acid, luteoloside and isochlorogenic acid A in *C. morifolium* were 0.954 93, 0.015 7, 0.012 7, 0.984 50, 0.013 1, 0.017 6 and 0.998 28, 0.009 17, 0.005 11, respectively. The correlation coefficient of the true value and prediction value from external validation of 3 ingredients was 0.940 4, 0.941 2 and 0.944 6.

Conclusion: The method is accurate, fast and simple, which can be applied for the rapid determination of large quantities of number of samples.

[Key words] *Chrysanthemum morifolium*; near-infrared spectroscopy; chlorogenic acid; luteoloside; isochlorogenic acid A

[收稿日期] 20120822(002)

[基金项目] 卫生部科学研究基金项目(WKJ2010-2-019),浙江省中医药科学研究基金计划项目(2012ZB032)

[第一作者] 程亮,在读研究生,从事中药炮制及质量标准研究, Tel: 0571-87195915, E-mail: chengliang_1224@yahoo.com.cn

[通讯作者] *杜伟锋, E-mail: duweifeng_200158@sohu.com; *蔡宝昌, E-mail: bccai@126.com

杭白菊为菊科多年生草本植物菊花的干燥头状花序,作为传统植物学饮料,不仅具有很高的营养价值,还具有很高的药用功效,作为浙八味之一,是卫生部首批批准的药食同源的道地药材。2010 年版《中华人民共和国药典》规定以高效液相色谱法测定绿原酸、木犀草苷及 3-5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸含量作为检测指标^[1],但该方法前处理繁琐、费时,不适合饮片厂大批样品的快速检测,且需要大量的有机试剂而污染环境。近红外分析技术不需对样品进行复杂的预处理就可直接进行测试,具有方便、快速、无污染等优点^[2-6]。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定量校正模型,为杭白菊中绿原酸、木犀草苷及 3-5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸含量的快速测定提供了一种新方法。

1 材料

Antaris 傅立叶变换近红外光谱仪,配有积分球、样品旋转台、样品杯、光谱采集软件和 TQ8.3.125 分析软件(美国 Thermo 公司);Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);梅特勒 XS-105 型电子分析天平(0.01 mg, METTLER TOLEDO, Switzerland),电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司),KQ-500DB 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),TGL-16B 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、MB45 型卤素水分测定仪(奥豪斯国际贸易(上海)有限公司)。

对照品绿原酸(中国药品生物制品检定所,批号 110753-200413)、木犀草苷(中国药品生物制品检定所,批号 111720-200501)、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸(北京金宝在线科技有限公司,批号 RFS-Y-110328-2);甲醇、磷酸为分析纯,乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水。

检测样品均从浙江桐乡收集,经浙江中医药大学中药饮片有限公司郑建宝主管中药师鉴定为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序,为杭白菊。

2 方法与结果

2.1 近红外光谱的采集 将杭白菊样品研碎过 4 号筛,每份样品取约 2 g,混合均匀后放入石英样品杯中,摊平,以内置背景作为参比,扣除参比,采集光谱图。采样方式积分球漫反射,波数区间 4 000 ~ 10 000 cm^{-1} ,分辨率 8.0 cm^{-1} ,扫描次数 64 次,empty 门衰减,增益为 2,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。

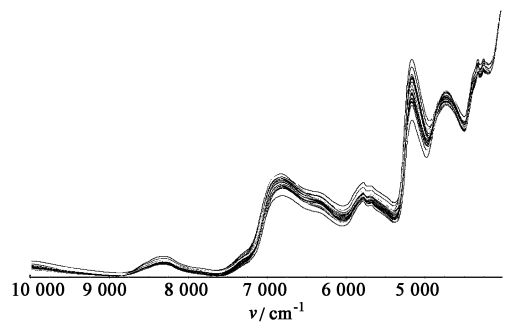


图 1 67 批杭白菊的近红外光谱

2.2 绿原酸、木犀草苷及 3-5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸含量 HPLC 分析 色谱柱为 Agilent Extend-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm),流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% 磷酸溶液, A, B 按梯度洗脱,流速 1 mL · min⁻¹,检测波长 350 nm,进样量 10 μL。以峰面积定量,外标法计算含量^[1]。每批样品平行进 3 针,求平均值,67 批杭白菊中绿原酸的含量为 0.210% ~ 0.453%、木犀草苷的含量为 0.197% ~ 0.768%、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸含量为 0.264% ~ 1.184%。

2.3 建立模型的方法 建模运用了近红外的漫反射原理,采用偏最小二乘法(PLS)为建模算法。通过对不同的滤噪方法以及不同的模型校正方法进行组合,比较不同方法组合条件下的相关系数(R)、预测均方差(RMSEP)、均方差(RMSEC)、性能指数(PI)和因子数(Factors)(见表 1 ~ 3)。经过多次的手动选择及综合比较,最终选择 MSC + Second Derivative 对光谱进行预处理所建立的杭白菊定量校正模型优于其他组合,故选定采用该方法建立定量校正模型。

2.3.1 波段选择 以相关系数(R)和校正均方差(RMSEC)为指标,经由 TQ Analyst 软件推荐,最终绿原酸选择 4 022.78 ~ 4 045.92, 5 311.00 ~ 5 345.71 cm^{-1} , 8 000.00 ~ 10 000.00 cm^{-1} 波段建模,木犀草苷选择 9 631.05 ~ 9 668.62, 9 275.96 ~ 9 287.50, 7 693.64 ~ 9 989.38 cm^{-1} 波段建模,3-5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸选择 4 420.05 ~ 4 431.62, 4 277.34 ~ 4 350.62, 4 537.48 ~ 9 887.00 cm^{-1} 波段建模。

2.3.2 因子数选择 建立模型时,所选的主因子数对预测结果有较大影响。如果 PLS 所用的因子数太少,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,则出现过拟合现象影响其结果^[6]。采用内部验证法,根据内部交叉验证均方差(RMSECV)随主因子数的变化,绿原酸主因子数选择为 2,木犀草苷主因子数为 3,3-5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸主因子数为 6。

表1 绿原酸定量校正模型的不同预处理方法比较

预处理方法	R	RMSEC	RMSEP	Factors	PI
没有预处理	0.974 75	0.034 9	0.050 1	4	48.8
多元散射校正	0.473 39	0.138 0	0.058 7	2	40.0
标准正态变量变换	0.472 15	0.138 0	0.058 4	2	40.3
多元散射校正 + SG 卷积平滑法	0.473 38	0.138 0	0.058 7	2	40.0
多元散射校正 + norris 微分过滤	0.509 70	0.135 0	0.076 8	2	21.5
多元散射校正 + 一阶导数	0.754 19	0.034 7	0.037 3	2	38.5
多元散射校正 + 二阶导数	0.954 93	0.015 7	0.012 7	2	79.1

表2 木犀草苷定量校正模型的不同预处理方法比较

预处理方法	R	RMSEC	RMSEP	Factors	PI
没有预处理	0.372 25	0.064 9	0.013 7	2	87.9
多元散射校正	0.515 30	0.064 1	0.017 8	2	84.3
标准正态变量变换	0.510 16	0.064 4	0.018 0	2	84.1
多元散射校正 + SG 卷积平滑法	0.515 24	0.064 1	0.017 8	2	84.3
多元散射校正 + norris 微分过滤	0.552 83	0.056 9	0.023 7	2	79.0
多元散射校正 + 一阶导数	0.649 58	0.026 3	0.026 3	1	26.7
多元散射校正 + 二阶导数	0.984 50	0.013 1	0.017 6	3	84.4

表3 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸定量校正模型的不同预处理方法比较

预处理方法	R	RMSEC	RMSEP	Factors	PI
没有预处理	0.532 74	0.132	0.087 7	2	10.3
多元散射校正	0.513 78	0.134	0.070 0	2	28.4
标准正态变量变换	0.514 18	0.134	0.068 4	2	30.0
多元散射校正 + SG 卷积平滑法	0.510 70	0.134	0.069 5	2	28.9
多元散射校正 + norris 微分过滤	0.509 70	0.135	0.076 8	2	21.5
多元散射校正 + 一阶导数	0.515 78	0.134	0.070 0	2	28.4
多元散射校正 + 二阶导数	0.998 28	0.009 17	0.005 11	6	94.8

2.3.3 模型建立 在所选择的的谱段范围内,由于本实验采用透射采集光谱,且光谱较为平滑,故直接用原始光谱建模。

从杭白菊样品中选取 35 个为标准样本集,4 个为验证集。运用 PLS 法建立绿原酸的定量校正模型,建模因子数为 2。结果如图 2 所示,相关系数为 0.954 93, RMSEC 为 0.0157。4 个验证集的内部验证结果如表 4 所示, RMSEP 为 0.012 7。

从杭白菊样品中选取 35 个为标准样本集,3 个为验证集。运用 PLS 法建立木犀草苷的定量校正模型,建模因子数为 3。结果如图 3 所示,相关系数为 0.984 50, RMSEC 为 0.0131。3 个验证集内部验

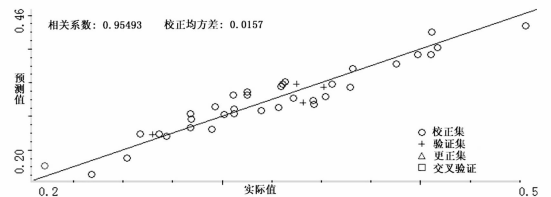


图2 杭白菊中绿原酸 PLS 建模结果

证的结果如表 5 所示, RMSEP 为 0.017 6。

从杭白菊样品中选取 40 个为标准样本集,4 个为验证集。运用 PLS 法建立 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸的定量校正模型,建模因子数为 6。结果如图 4 所示,相关系数为 0.998 28, RMSEC 为 0.009 17。4 个验证集内部验证的结果如表 6 所示, RMSEP 为

0.005 11。

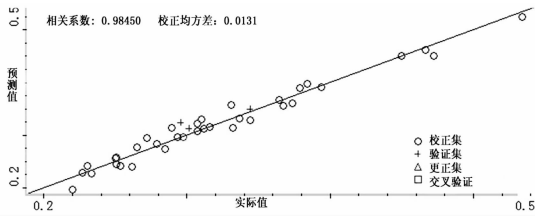


图 3 杭白菊中木犀草苷 PLS 建模结果

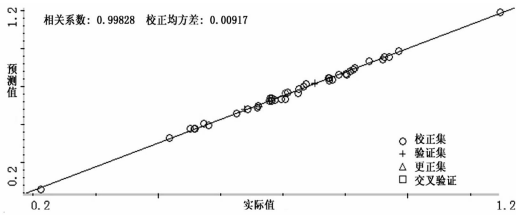


图 4 杭白菊中 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸 PLS 建模结果

表 4 杭白菊中绿原酸内部验证结果

No.	样品编号	实测值 /%	预测值 /%	绝对误差 /%	相对误差 /%
1	17	0.337 4	0.347 8	0.010 4	3.082 4
2	26	0.351 2	0.342 8	0.008 4	2.391 8
3	37	0.340 8	0.320 6	0.020 2	5.927 2
4	39	0.265 0	0.272 6	0.007 6	2.867 9

表 5 杭白菊中木犀草苷内部验证结果

No.	样品编号	实测值 /%	预测值 /%	绝对误差 /%	相对误差 /%
1	4	0.344 3	0.349 3	0.005 0	1.452 2
2	17	0.301 6	0.312 2	0.010 6	3.514 6
3	28	0.295 6	0.323 8	0.028 2	9.539 9

表 6 杭白菊中 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸内部验证结果

No.	样品编号	实测值 /%	预测值 /%	绝对误差 /%	相对误差 /%
1	4	0.813 9	0.818 4	0.004 5	0.552 9
2	5	0.702 7	0.694 7	0.008 0	1.138 5
3	6	0.673 2	0.677 6	0.004 4	0.653 6
4	27	0.814 2	0.815 1	0.000 9	0.110 5

2.3.4 外部验证 用建立的最佳校正模型,对预测集中的绿原酸、木犀草苷及 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸含量进行预测。杭白菊中绿原酸的预测集结果见表 7,近红外测试的预测结果与真值之间建立回归方程 $Y = 1.165 4X - 0.041 2$,预测值与真实值的相关系数达 0.940 4。杭白菊中木犀草苷的预测集结果见表 8,近红外测试的预测结果与真值之间建立

回归方程 $Y = 0.913X + 0.025 6$,预测值与真实值的相关系数达 0.941 2。杭白菊中 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸的预测集结果见表 9,近红外测试的预测结果与真值之间建立回归方程 $Y = 0.972 9X + 0.015 8$,预测值与真实值的相关系数达 0.944 6。

表 7 杭白菊中绿原酸外部验证结果

No.	样品编号	实测值 /%	预测值 /%	绝对误差 /%	相对误差 /%
1	2	0.314 4	0.339 0	0.024 6	0.078 2
2	7	0.352 7	0.369 1	0.016 4	0.046 5
3	10	0.238 1	0.222 4	-0.015 7	-0.065 9
4	13	0.269 8	0.283 0	0.013 2	0.048 9
5	36	0.231 0	0.236 0	0.005 0	0.021 6
6	47	0.267 7	0.275 2	0.007 5	0.028 0
7	61	0.342 4	0.333 4	-0.009 0	-0.026 3
8	64	0.363 9	0.389 8	0.025 9	0.071 2
9	65	0.288 6	0.276 9	-0.011 7	-0.040 5
10	67	0.325 4	0.352 1	0.026 7	0.082 1

表 8 杭白菊中木犀草苷外部验证结果

No.	样品编号	实测值 /%	预测值 /%	绝对误差 /%	相对误差 /%
1	9	0.308 5	0.296 4	0.012 1	3.922 2
2	10	0.253 1	0.231 8	0.022 1	8.731 7
3	13	0.285 0	0.288 2	-0.003 2	-1.122 8
4	19	0.318 7	0.339 4	-0.020 7	-6.495 1
5	30	0.279 3	0.283 5	-0.003 7	-1.324 7
6	32	0.258 9	0.241 2	0.017 9	6.913 9
7	47	0.382 2	0.359 5	0.022 7	5.939 3
8	51	0.387 8	0.376 7	0.011 1	2.862 3
9	62	0.309 0	0.333 7	-0.024 7	-7.993 5
10	63	0.513 6	0.487 3	0.026 3	5.120 7
11	65	0.289 3	0.304 4	-0.015 1	-5.219 5
12	67	0.354 1	0.361 8	-0.007 7	-2.174 5

表 9 杭白菊中 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸外部验证结果

No.	样品编号	实测值 /%	预测值 /%	绝对误差 /%	相对误差 /%
1	6	0.736 1	0.727 2	-0.008 9	-1.209 1
2	13	0.852 7	0.871 5	0.018 8	2.204 8
3	17	0.679 4	0.684 5	0.005 1	0.750 7
4	24	0.638 3	0.665 9	0.027 6	4.324 0
5	30	0.734 1	0.712 5	-0.021 6	-2.942 4
6	47	0.735 6	0.754 9	0.019 3	2.623 7
7	51	0.927 3	0.911 8	-0.015 5	-1.671 5
8	59	0.708 7	0.684 2	-0.024 5	-3.457 0
9	65	0.736 7	0.710 8	-0.025 9	-3.515 7
10	66	0.683 2	0.664 9	-0.018 3	-2.678 6

舒胆通颗粒的质量标准研究

吴静, 陆红*

(浙江中医药大学, 杭州 310053)

[摘要] 目的:建立舒胆通颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱法对舒胆通颗粒中栀子苷、大黄酸和延胡索乙素进行定性鉴别,并采用 HPLC 测定栀子苷含量。色谱柱:Agilent ZORBAX C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相乙腈-水(15:85),检测波长 238 nm,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。结果:在薄层鉴别中能检出栀子苷、大黄酸和延胡索乙素,栀子苷在 15.1 ~ 151.0 mg·L⁻¹具有良好的线性关系($r=0.9999$);平均回收率为 100.45%,RSD 0.48%。结论:使用薄层色谱法对舒胆通颗粒中栀子苷、大黄酸和延胡索乙素进行定性鉴别,操作简便,重现性好,且阴性对照无干扰;栀子苷的含量测定方法简便、快速、准确,具有良好的重复性和回收率,可作为舒胆通颗粒中栀子苷的质量控制方法。

[关键词] 舒胆通颗粒; 栀子苷; 大黄酸; 延胡索乙素; 薄层鉴别; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0089-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjzxx2013070089

Study on the Quality Standard of Shudantong Granules

WU Jing, LU Hong*

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of Shudantong Granules. **Method:** The jasminoidin, rhein and tetrahydropalmatine in Shudantong Granules were identified by TLC, and the content of jasminoidin was detected by HPLC. The separation was carried out on an Agilent ZORBAX C₁₈ column (4.6 mm ×

[收稿日期] 20120919(009)

[基金项目] 浙江省中医药管理局项目(2006C021)

[第一作者] 吴静, 硕士研究生, 从事中药药理学研究。

[通讯作者] * 陆红, 教授, 从事中药药理学研究。Tel: 0571-86613601, E-mail: luhong03@hotmail.com.cn

3 结论

本实验通过近红外光谱法与化学计量学技术相结合,采用偏最小二乘法建立了快速测定延胡索中绿原酸、木犀草苷及 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸含量的分析方法,结果表明该方法准确、简便、快速、无污染,可实现大批量样品的快速分析,为控制“浙八味”药材及饮片的质量提供了新的手段。

[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.
[2] 黄倩倩,潘瑞乐,魏建和,等. 近红外漫反射光谱法测定黄芩中总黄酮及黄芩苷的含量[J]. 光谱学与光谱分析,2009, 29(9): 2425.

[3] 雷敬卫,郭艳利,白雁,等. 山檀药材中银松素含量近红外定量模型的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17):75.
[4] 杨欣,杨瑞瑞,罗定强. 黄芩近红外漫反射光谱法定量模型的建立及应用[J]. 西北药学杂志,2010, 25(3):184.
[5] 曾焕俊,韩莹. 复方盐酸伪麻黄碱缓释胶囊近红外定性模型的建立[J]. 今日药学,2010, 20(9):35.
[6] 白燕,张威,王星,等. 近红外光谱法测定不同厂家银黄颗粒中黄芩苷含量[J]. 中国中药杂志,2010, 35(2):166.
[7] 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,2007.

[责任编辑 顾雪竹]