

# 近红外光谱法测定柴胡药材中柴胡皂苷 A 含量

唐进法<sup>1\*</sup>, 王星<sup>2,3</sup>, 曹占霞<sup>1</sup>

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 北京中医药大学, 北京 100102;  
3. 河南中医学院, 郑州 450008)

**[摘要]** **目的:**利用近红外光谱法快速测定柴胡药材中柴胡皂苷 a 的含量。**方法:**利用 HPLC 测定柴胡样品中柴胡皂苷 a 的含量,运用偏最小二乘(PLS)法建立其含量与 NIR 光谱之间的多元校正模型,并对未知样品进行含量预测。**结果:**建立柴胡皂苷 a 定量模型准确性较好,内部交叉验证均方差(RMSECV)、内部交叉验证决定系数分别为 0.321, 0.934。经外部验证, NIR 预测值与 HPLC 测定值之间的相关系数为 0.931, 预测回收率为 103.84%。**结论:**利用近红外光谱法快速测定柴胡药材中柴胡皂苷 a 含量是可行的,该法可以为柴胡药材的快速无损检测提供参考和依据。

**[关键词]** 近红外光谱法; 柴胡; 柴胡皂苷 a; 定量分析

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0138-04

## Determination of Saikosaponin A in Radix Bupleuri by Near-infrared Spectroscopy

TANG Jin-fa<sup>1\*</sup>, WANG Xing<sup>2,3</sup>, CAO Zhan-xia<sup>1</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;  
2. Beijing University of TCM, Beijing 100102, China;  
3. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the content of saikosaponin A in Radix Bupleuri by combining near-infrared spectroscopy with the chemometrics method. **Method:** The content of saikosaponin A in Radix Bupleuri was determined by HPLC as a reference method. Multivariate calibration model based on PLS algorithm was developed to correlate the spectra and the corresponding values determined by the reference method. **Result:** RMSECV (root-mean-square error of cross-validation) of the model for saikosaponin A was 0.321 and the correlation coefficients of the calibration model was 0.934. External validation proved that the relative coefficient of the predicted value and the HPLC value was 0.951, with measured recycle rate of 96.64%. **Conclusion:** NIRS can be used in the determination of saikosaponin A, which sets up the foundation of product-line control of Radix Bupleuri.

**[Key words]** NIR; Radix Bupleuri; saikosaponin A; quantitative analysis model

柴胡为伞形科植物柴胡或狭叶柴胡的干燥根,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气等功效<sup>[1]</sup>,是常用的一味中药。现代药理学研究表明,柴胡皂苷 a 具有解热、镇痛、抗炎、免疫调节、抗肝损伤、抗肝纤

维化等药理活性<sup>[2]</sup>,为其特征性有效成分之一。目前柴胡中柴胡皂苷 a 的常用含量测定方法是高效液相色谱法<sup>[3-5]</sup>,但该方法需要消耗大量化学试剂,分析耗时较长,在制药生产中,难以满足原药材的快速测定以及在线检测的要求。

近红外(near infrared, NIR)光谱分析技术因分析速度快、对样品无损害、无化学污染等显著优点,近年来广泛用于中药分类、活性成分测定等<sup>[6-8]</sup>。本研究采用近红外漫反射光谱技术,建立了柴胡原

**[收稿日期]** 20120319(016)

**[通讯作者]** \*唐进法, 硕士生, 副主任药师, 从事中药合理应用研究, Tel: 0371-66233562, E-mail: a0519@163.com

药材中柴胡皂苷 a 的定量分析模型,对其进行了快速分析,并就其在制药过程控制中的应用进行了探讨。

## 1 仪器与试剂

美国 Thermo Nicolet 公司生产的 Nicolet 6700 型傅立叶变换近红外光谱仪,配有样品旋转台、样品杯、积分球、OMNIC 光谱采集软件和 TQ 分析软件,美国 Dionex 公司生产的 DIONEX-P680 型高效液相色谱仪,上海天平仪器厂生产的 FA2004A 型电子天平。

柴胡皂苷 a 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110792-200916),样品为 2009 年 8 月至 2010 年 8 月期间采购于河南、山西、内蒙、河北等地的药材共 80 份,通过河南中医学院第一附属医院药学部陈天朝主任药师鉴定,甲醇、乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 柴胡中柴胡皂苷 a 的 HPLC 分析

**2.1.1 供试品溶液的制备** 取本品粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 25 mL,密塞,30 °C 水温超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz)30 min,滤过,用甲醇 20 mL 分 2 次洗涤容器及药渣,洗液与滤液合并,回收溶剂至干。残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.1.2 色谱条件及系统适用性试验** ODS  $C_{18}$  (4.6 mm × 250 mm, 10  $\mu$ m),流动相甲醇-乙腈-水(19:38:43),检测波长 210 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温室温。在此条件下,样品中柴胡皂苷 a 与其他相关峰均能达到基线分离。理论塔板数以柴胡皂苷 a 计不低于 10 000。

**2.1.3 标准曲线的制备** 精密称取柴胡皂苷 a 对照品 5.12 mg,加甲醇定容至 10 mL,制成 0.512 g·L<sup>-1</sup> 的柴胡皂苷 a 对照品溶液,摇匀,即得。分别精密吸取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ L,按 2.1.2 项下色谱条件进样测定,以峰面积积分值(Y)为纵坐标,进样量(X)为横坐标进行线性回归,计算其含量。结果表明,柴胡皂苷 a 进样量在 1.024 ~ 5.120  $\mu$ g 呈良好的线性关系。

**2.1.4 精密度试验** 精密吸取同一对照品溶液 10  $\mu$ L,重复进样 6 次,计算柴胡皂苷 a 色谱峰面积的 RSD 为 1.06%。

**2.1.5 重复性试验** 取同一批柴胡药材样品,按 2.1.1 项下方法制备成 5 份供试品溶液,分别精密

吸取 10  $\mu$ L 进样测定。结果 RSD 1.38%。

**2.1.6 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液 10  $\mu$ L,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进行测定,以柴胡皂苷 a 的色谱峰面积进行考察。结果 RSD 1.53%,表明柴胡皂苷 a 在 12 h 内稳定性良好。

**2.1.7 加样回收率试验** 取已知含量的样品 6 份,精密称定,分别加入一定含量的柴胡皂苷 a,按以上方法进行提取和测定柴胡皂苷 a 的含量,计算加样回收率,结果表明,柴胡皂苷 a 平均回收率为 98.62%,RSD 1.26%。

**2.1.8 样品测定** 分别精密称取样品 0.5 g,按照 2.1.1 项下方法制备成供试品溶液,精密吸取供试品溶液 10  $\mu$ L 进样,测定各样品中柴胡皂苷 a 的含量,结果见表 1。

表 1 柴胡药材中柴胡皂苷 a 测定

No.	柴胡皂苷 a	No.	柴胡皂苷 a	No.	柴胡皂苷 a	No.	柴胡皂苷 a
1	1.502	21	1.627	41	0.887	61	1.628
2	0.176	22	1.059	42	1.365	62	1.657
3	1.107	23	0.550	43	0.544	63	1.643
4	0.840	24	0.876	44	0.550	64	1.703
5	0.932	25	0.696	45	0.870	65	1.713
6	1.323	26	0.672	46	0.794	66	1.714
7	0.874	27	0.994	47	0.723	67	1.507
8	0.886	28	1.435	48	0.152	68	1.517
9	0.479	29	0.783	49	1.472	69	1.481
10	1.300	30	0.850	50	1.380	70	1.469
11	0.493	31	0.923	51	0.897	71	1.476
12	0.874	32	0.840	52	0.365	72	1.484
13	0.853	33	1.497	53	0.738	73	1.791
14	1.655	34	0.666	54	1.253	74	1.628
15	1.374	35	0.490	55	1.132	75	1.617
16	0.779	36	1.262	56	1.153	76	1.786
17	0.225	37	0.439	57	0.069	77	1.674
18	0.299	38	0.870	58	0.087	78	1.651
19	1.539	39	1.719	59	1.693	79	1.593
20	0.818	40	0.629	60	1.674	80	1.403

### 2.2 近红外光谱法分析

**2.2.1 NIR 光谱的采集** 将收集到的 80 份样品晒干后粉碎,过 60 目筛,取约 5 g 粉末放入石英样品杯中,混合均匀,以空气为参比,按下述实验条件进行扫描:测样方式为积分球漫反射,分辨率为 8 cm<sup>-1</sup>,光谱采集范围 4 000 ~ 12 000 cm<sup>-1</sup>,扫描次

数 32 次, 温度室温, 相对湿度 35%。80 份柴胡样品的近红外光谱叠加见图 1。

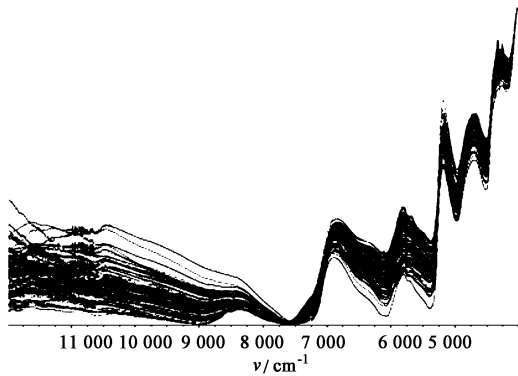


图 1 柴胡样品近红外图谱叠加

**2.2.2 校正集和验证集样品的选择** 从 80 份柴胡样品中, 根据其柴胡皂苷 a 的 HPLC 分析结果, 选取 65 个有代表性的样品组成校正集, 用于建立校正模型; 剩余 15 个样品为验证集, 对模型进行外部验证。

**2.2.3 校正模型的建立** 运用 TQ7.2 定量分析软件中偏最小二乘法 (PLS) 建立校正模型, 并用验证集样品进行外部验证。

### 3 结果

**3.1 光谱预处理** 为了消除噪音和基线漂移等对定标结果的影响, 对样品的原始吸收光谱进行预处理。表 2 为使用不同方法处理后模型的  $R^2$  和 RMSECV 的比较,  $R^2$  为校正集内部交叉验证决定系数, 其值越接近 1 说明模型预测越准确; RMSECV 为校正集内部交叉验证均方差, 其值越小说明模型的预测精度越高。经比较, 以一阶导数法处理效果最好, 该法可以很好地消除样品光谱基线的漂移<sup>[9]</sup>, 强化谱带特征。

表 2 采用 PLS 建模时预处理方法对 RMSECV 和  $R^2$  的影响

光谱预处理方法	$R^2$	RMSECV
MSC(多元散射校正)	0.909	0.227
SNV(标准归一化)	0.846	0.376
First Derivative(一阶导数)	0.965	0.127
Second Derivative(二阶导数)	0.938	0.159
MSC + First Derivative	0.946	0.146
SNV + First Derivative	0.915	0.178

**3.2 校正模型的建立** 运用 PLS 法将 68 份校正集样品的 NIR 图谱与其 HPLC 值进行关联, 建立校正模型, 图 2 为 68 份校正集样品交互验证得到的 NIR 预测值与 HPLC 测定值的相关图, 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  $RMSECV = 0.127$ ,  $R^2 = 0.965$ 。图 3 为校正集 RMSECV 与 Rank(主成分数)之间的相关图。其中, 前 9 个主成份能够代表原始光谱 98% 以上的信息, 且使 RMSECV 最小, 因此确定最佳主成分数为 9。

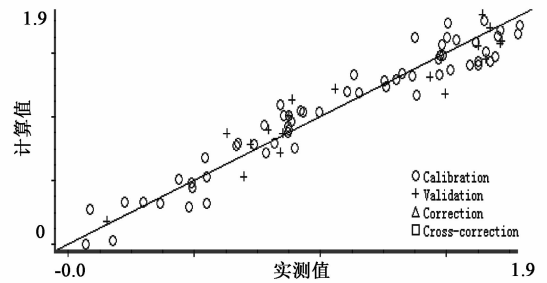


图 2 校正集 NIR 预测值与 HPLC 分析值相关性

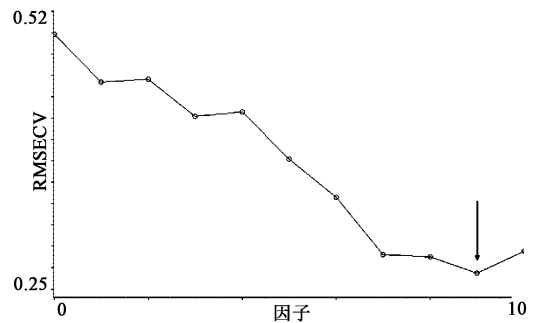


图 3 校正集 RMSECV 与 Rank 之间的相关性

**3.3 模型的验证** 将 17 份验证集样品的 NIR 图谱输入校正模型, 预测其柴胡皂苷 a 的含量, 并与其 HPLC 测定值进行比较, 以 NIR 预测值与 HPLC 测定值的比值做为预测回收率, 得平均回收率为 103.84%, 结果见表 3。

表 3 HPLC 法与 NIR 法测定结果的比较

No.	HPLC 法 /%	NIR 方法 /%	绝对偏差	预测 回收率/%	平均 回收率/%
1	0.874	1.009	0.135	115.45	
2	1.627	1.556	-0.071	95.64	
3	1.059	1.218	0.159	115.01	
4	0.696	0.529	-0.167	76.01	
5	1.435	1.307	-0.128	91.08	
6	0.850	0.867	0.017	102.00	
7	0.840	0.717	-0.123	85.36	
8	1.719	1.593	-0.126	92.67	103.84
9	0.629	0.872	0.243	138.63	
10	0.794	0.897	0.103	112.97	
11	0.723	0.780	0.057	107.88	
12	0.152	0.185	0.033	121.71	
13	1.674	1.702	0.028	101.67	
14	1.643	1.805	0.162	109.86	
15	1.714	1.572	-0.142	91.72	

经统计学检验,NIR 预测值与 HPLC 测定值的相关系数为 0.931。成对  $t$  检验结果显示, $t=0.73$ , $P>0.05$ ,即 2 种方法的分析结果差异无统计学意义,该模型通过验证,可以准确预测其覆盖范围的柴胡药材柴胡皂苷 a 含量。

#### 4 讨论

建立一个稳定可靠的 NIR 定量分析模型,收集足够多有代表性的样品是非常关键的,本实验所选用的 80 份柴胡药材来自河南、山西、内蒙、河北等产区,柴胡皂苷 a 含量范围为 0.069% ~ 1.791%,且分布均匀,具有一定的代表性。

样品粒度的差异会影响入射光与样品相互作用的环境,影响漫反射的光谱特性<sup>[10]</sup>,因此本实验所用的所有样品均在同一条件进行处理和干燥,并统一过 24 目药典筛。为获得样品的平均光谱,每份样品平行扫描 3 次,取平均光谱,以尽量减少上述因素引起的误差。

从本研究所建模型预测以及统计学结果可以看出,利用 NIR 方法测定柴胡药材中柴胡皂苷 a 含量是可行的。该方法计算结果准确,符合生产中检测的精度要求,与 HPLC 相比,该法具有快速、无损、不消耗试剂、原位分析等特点,适用于制药过程中大批量柴胡原药材的快速检测,在制药过程质量控制中具有潜在的应用前景。

#### [参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2005:118.

- [2] 朱兰香,刘世增,顾振纶.柴胡皂苷的药理作用及抗肝纤维化的应用[J].中草药,2002,33(10):附5.
- [3] 白雪梅,田嘉铭,王德宝.HPLC 测定不同产地柴胡中柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 的含量[J].中成药,2006,28(3):440.
- [4] 麻明臣,刘娟,陈宇峰,等.反相高效液相色谱法测定野生狭叶柴胡中柴胡皂苷 a 含量[J].药物研究,2008,17(12):32.
- [5] 潘瑞乐,陈迪华,陈建民,等.RP-HPLC 法测定中柴 1 号及其他产地柴胡中柴胡皂苷 a、d 的含量[J].中南药学,2008,2(4):198.
- [6] 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.
- [7] 孙国明,刘国林.近红外光谱技术在独活属药用植物分类中的应用[J].中国中药杂志,2007,31(27):1597.
- [8] 王宁,蔡绍松,武卫红,等.一种基于声光可调滤光器-近红外光谱技术的复方丹参片快速定性分析方法[J].中国中药杂志,2008,33(16):1597.
- [9] 王宁,蔡绍松,魏红,等.声光可调-近红外光谱技术快速分析复方丹参片中丹参酮 II A 和丹酚酸 B 的新方法[J].中国中药杂志,2008,33(3):262.
- [10] 白雁,贾永,王东,等.应用近红外漫反射光谱技术测定酒炖熟地黄中的还原糖含量[J].中药材,2006,10(10):1037.

[责任编辑 顾雪竹]

## 欢迎订阅 2013 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。本刊立足于行业报道的前沿,关注相关的政策动态,跟踪报道中医药重大课题,及时分析报道中医药的新政策、新技术、新发明、新成果、新疗法,努力使信息的选择与表达方式能够充分体现中医药发展水平,为广大读者提供一流的信息服务。

《中国中医药信息杂志》1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已被波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等国际检索系统收录。

《中国中医药信息杂志》是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、中医药发展论坛、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、研究与进展、论著、实验研究、流行病学调查、质量标准研究、制剂与工艺、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学等。

《中国中医药信息杂志》为月刊,大 16 开国际开本,112 页,国内外公开发售,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部 邮编:100700 电话:010-64014411-3278 E-mail:Lxx@mail.cintcm.ac.cn