

黄芩提取物有效成分的近红外光谱定量分析

封银曼^{1,2}, 张威¹, 白杨¹, 白雁^{2*}

(郑州市卫生学校, 郑州 450005; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:** 利用黄芩提取物样品的近红外漫反射光谱(NIRS)信息, 建立能够快速分析其 3 种有效成分含量的校正模型。**方法:** 共收集 12 个不同厂家的 100 批样品, 其中 80 批样品作为校正集, 20 批样品作为验证集, 结合偏最小二乘法(PLS), 建立了黄芩提取物中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 3 种有效成分的近红外定量校正模型。**结果:** 3 个校正模型的建模效果均较好, 交叉检验决定系数(R_{cv}^2)分别为 0.994 8, 0.998 7, 0.994 8, 校正均方差(RMSEC)分别为 0.440, 0.022 5, 0.011 1, 交互验证均方差(RMSECV)分别为 2.259, 0.055 3, 0.048 3。用验证样品进行外部验证, 预测相关系数(r^2)分别为 0.998 2, 0.996 5, 0.990 9, 预测均方差(RMSEP)分别为 0.486, 0.027 1, 0.011 0。**结论:** 结果表明, 近红外光谱技术可对黄芩提取物中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量进行简便、快速、准确分析。

[关键词] 近红外光谱; 偏最小二乘法; 校正模型; 黄芩提取物

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0084-04

Near-infrared Determination of Active Components in Scutellaria Extract

FENG Yin-man^{1,2}, ZHANG Wei¹, BAI Yang¹, BAI Yan^{2*}

(1. Zhengzhou Health School, Zhengzhou 450005, China;

2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To rapidly analyse the three active components in Scutellaria extract by establishing calibration models with near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Method:** One hundred batches of Scutellaria extract samples from 12 different pharmaceutical factories were collected and they were divided into a calibration set (80 samples) and a validation set (20 samples). In combination with the partial least square (PLS), the quantitative calibration models were established for baicalin, baicalein and wogonin. **Result:** All models had great calibration performance. The correlation coefficients of cross-validation (R_{cv}^2) were 0.994 8, 0.998 7 and 0.994 8, the root-mean-square error of calibration (RMSEC) were 0.440, 0.022 5 and 0.011 1, the root-mean-square error of cross-validation (RMSECV) were 2.259, 0.055 3 and 0.048 3. The rest 20 samples were used to evaluate the performances of the models, the correlation coefficients of prediction (r^2) were 0.988 2, 0.996 5 and 0.990 9 and the root-mean-square error of prediction (RMSEP) were 0.486, 0.027 1 and 0.011 0. **Conclusion:** The results indicated that the NIRS was simply; rapidly and exactly method for analysis of baicalin; baicalein and wogonin contents in Scutellaria extract.

[Key words] near-infrared spectroscope; partial least square; calibration model; scutellaria extract

黄芩提取物是由唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根经加工制成, 具有清热燥

湿、泻火解毒、止血、安胎的作用, 用于治疗湿温、暑湿、胸闷呕恶、高热烦渴、痈肿疮毒等, 为多种中药制

[收稿日期] 20110816(012)

[基金项目] 河南省重大公益科研项目(081100912500); 河南省杰出人才项目(084200510017)

[第一作者] 封银曼, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, Tel:0371-88888179, E-mail: fym12369@sina.com

[通讯作者] * 白雁, 教授, 博士研究生导师, 从事利用现代分析手段对中药品质进行分析和评价, Tel:0371-65962967, E-mail: white_yan@hotmail.com

剂的主要原料药,其质量直接影响着用药安全及疗效,收录于2010年版《中国药典》。黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素作为黄芩提取物的主要有效成分,常规的含量测定方法为高效液相色谱法^[1-2]。但该方法分析耗时长、操作繁琐,并且消耗试剂、污染环境。近红外光谱技术是近年来新兴起的一种绿色分析技术,具有操作简便、快速、无损、无污染,可实现在线控制等优势,在石油化工、农业生产和医药卫生等领域的应用日益增多^[3-7]。本实验采用NIRS与PLS相结合的方法,建立了黄芩提取物中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的近红外定量校正模型,实现对黄芩提取物有效成分的简便、快速、准确分析。

1 材料

1.1 仪器设备 美国 Thermo 公司生产的 Nicolet 6700 型傅立叶变换近红外光谱仪,配有积分球、样品旋转台、石英样品杯、OMNIC 光谱采集软件和 TQ8.0 分析软件;美国安捷伦公司生产的 Agilent 1200 型高效液相色谱仪;瑞士 METTLER 公司生产的 AE240 型 1/10 万天平;昆山 HS-6150 超声波清洗仪(500 W,40 kHz)。

1.2 样品及试剂 黄芩提取物样品共 100 批,分别购于 12 个不同的生产厂家,主要为颗粒剂、口服液,注射剂等中药制剂的主要原料药。统一过 80 目药典筛,储存,备用。

甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其余均为分析纯。黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对照品购于中国药品生物制品检定所(批号 110715-200815, 111595-200604, 1514-200202, 供含量测定用)。

1.3 黄芩提取物近红外漫反射光谱的采集 每批样品取约 8 g,混合均匀后放入石英样品杯中,摊平,然后以空气为参比,扣除背景,采集光谱图。采样方式积分球漫反射,采集光谱范围 4 000 ~ 12 000 cm^{-1} ,分辨率 8 cm^{-1} ,扫描次数 64 次。温度(25 ± 2) °C,相对湿度 45% ~ 50%。每批样品扫描 3 次,求平均值作为样品的 NIRS 光谱,见图 1。

1.4 黄芩提取物有效成分含量的 HPLC 分析 参照 2010 年版《中国药典》及参考文献,经方法学考察和系统适用性试验,以下色谱条件可以准确测定黄芩提取物中各有效成分含量:

① 黄芩苷: Dikma Diamonsil C_{18} 分析柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.4% 磷酸(47:53),检测波长 280 nm,进样体积 10 μL ,流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30 °C。

② 黄芩素和汉黄芩素: Dikma Diamonsil C_{18} 分析

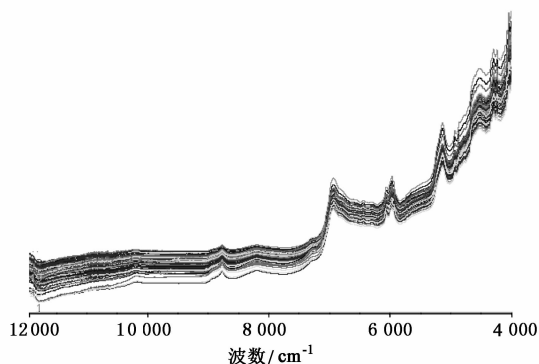


图 1 100 批黄芩提取物样品的近红外漫反射光谱
柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.4% 磷酸(61:39),检测波长 277 nm,进样体积 10 μL ,流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 27 °C,见图 2,3。

以保留时间定性,峰面积定量,外标法计算。每批样品平行作两份,取平均值作为样品的 HPLC 分析值。

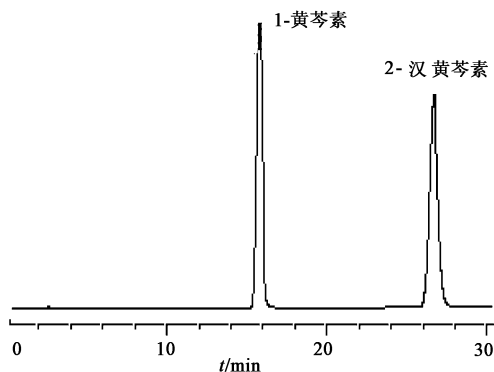


图 2 对照品高效液相色谱

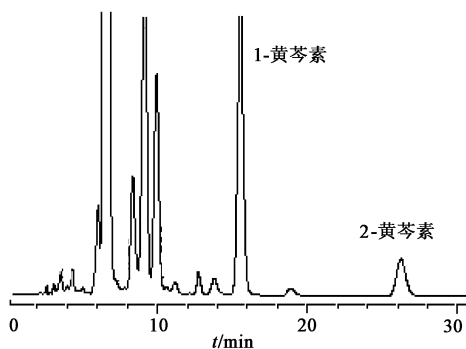


图 3 样品高效液相色谱

1.5 建立近红外定量分析模型的方法 根据黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量分布,按照 4:1 的比例划分为校正集和验证集,确保所选验证样品集更具代表性^[8],见表 1。利用 TQ 8.0 软件对样品光谱进行分析处理,采用偏最小二乘法(PLS)对校正集样品建立校正模型,同时作交叉验证,并用验证集样品对模型进行外部验证,最后根据交叉检验决定系数

表 1 校正集和验证集样品中三组分的含量分布

样品集	样品数	最小值	最大值	平均值	标准差
校正集					
黄芩苷	80	80.141	96.699	87.331	4.347
黄芩素	80	1.388	3.064	2.152	0.439
汉黄芩素	80	0.112	0.540	0.378	0.110
验证集					
黄芩苷	20	81.002	95.265	87.891	4.311
黄芩素	20	1.426	2.986	2.101	0.470
汉黄芩素	20	0.134	0.492	0.362	0.114

(R_{CV}^2)、校正均方差 (RMSEC)、交互验证均方差 (RMSECV)、预测相关系数 (r^2)、预测均方差 (RMSEP) 等性能参数来确定最优校正模型。对于同一样品集所构建的近红外定量校正模型来说, 相关系数越大、均方差越小, 表明所建模型适用性越强、预测效果越好^[9]。

2 结果与讨论

2.1 校正模型的建立

光谱预处理方法、谱区范围和主因子数是近红外校正模型的关键建模参数。合适的建模参数可以降低噪声信号干扰, 避免冗余信息, 提高建模光谱数据的有效信息率, 以达到提高模型性能的目的^[10]。实验采用 TQ 8.0 软件对近红外光谱进行全谱解析, 并对最佳光谱预处理方法和最佳主因子数进行筛选, 见表 2, 由此分别建立了黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素三成分的最优定量校正模型。

表 2 黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素三成分建模参数的选择

有效成分	建模参数		
	光谱预处理方法	谱曲范围/ cm^{-1}	主因子数
黄芩苷	MSC + 1st	6 173.32 ~ 4 095.26	10
黄芩素	MSC + 1st + SG	6 384.20 ~ 4 067.29	10
汉黄芩素	SNV + 2nd	7 618.76 ~ 4 008.10	8

注: MSC, 多元散射校正; SNV, 标准正态变换; 1st, 一阶导数; 2st, 二阶导数; SG, Savitsky-Golay 平滑。

2.2 校正模型建模效果分析

选择最佳建模参数后得到了最优定量校正模型的性能参数和交叉验证结果, 见图 4 ~ 6。黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素校正模型的交叉检验决定系数 R_{CV}^2 分别为 0.994 81, 0.998 67, 0.994 84, 校正均方差 RMSEC 分别为 0.440, 0.022 5, 0.011 1, 另外, 交互验证均方差 RMSECV 分别为 2.259, 0.055 3, 0.048 3。可见针对黄芩提取物各有效成分所建近红外校正模型性能较好。

2.3 校正模型的外部验证

为了评价模型的实际

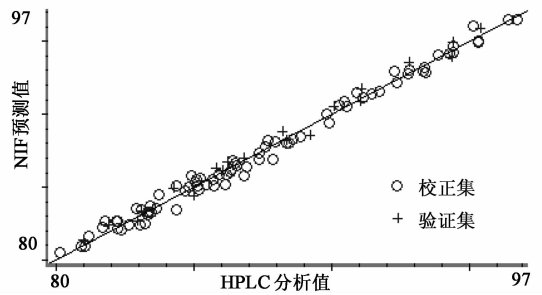


图 4 黄芩苷近红外定量校正模型示意

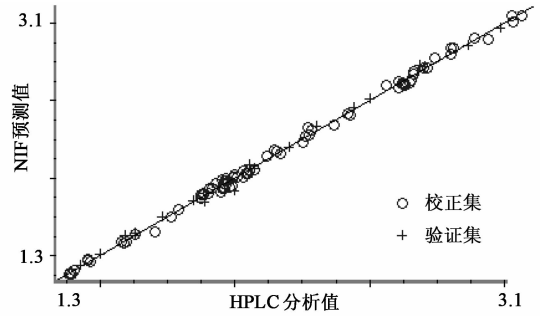


图 5 黄芩素近红外定量校正模型示意

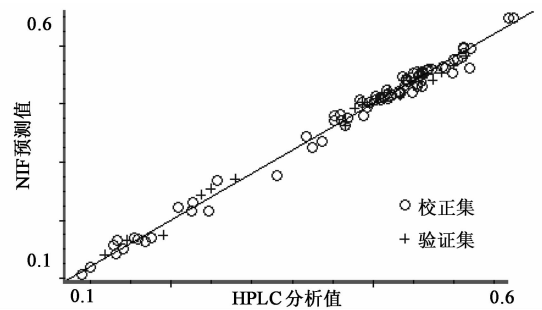


图 6 汉黄芩素近红外定量校正模型示意

预测效果, 将验证集样品的近红外光谱代入模型中, 并将所得 NIR 预测值与 HPLC 分析值做相关分析, 见图 7 ~ 9。模型的预测精度主要通过预测相关系数 (r^2) 和预测均方差 (RMSEP) 2 个参数来评价, 计算公式如下:

$$r^2 = \frac{\text{Cov}(C_i, C_i)}{\sigma_{C_i} \sigma_{C_i}} \quad (1)$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - C_i)^2}{n}} \quad (2)$$

式中: C_i 为 NIR 预测值, C_i 为 HPLC 分析值, n 为验证集样品的数量。

图 5 ~ 7 显示了校正模型的预测检验结果, 可以看出 20 个验证集样品的 NIR 预测值与 HPLC 分析值比较接近, 黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的预测相关系数 (r^2) 分别为 0.998 2, 0.996 5, 0.990 9, 预测均方差 (RMSEP) 分别为 0.486, 0.027 1, 0.011 0, 且二者与交叉检验决定系数 (R_{CV}^2) 和校正均方差 (RMSEC)

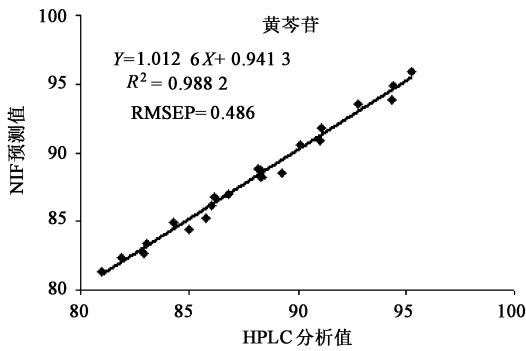


图7 验证集样品中黄芩苷含量 NIR 预测值与 HPLC 分析值的相关性

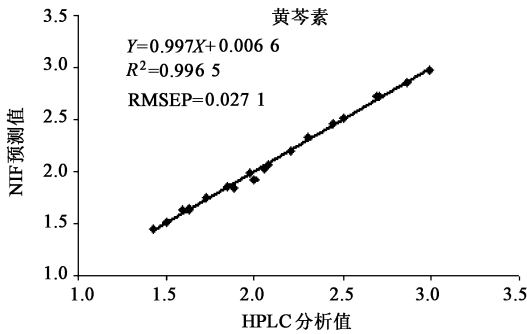


图8 验证集样品中黄芩素含量 NIR 预测值与 HPLC 分析值的相关性

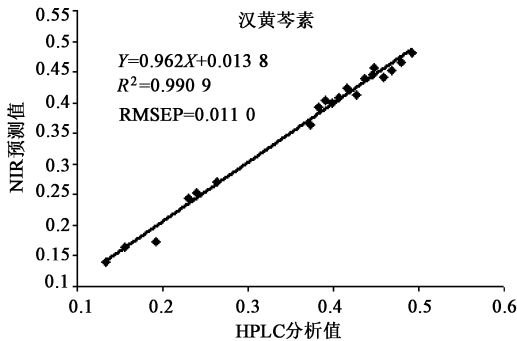


图9 验证集样品中汉黄芩素含量 NIR 预测值与 HPLC 分析值的相关性

比较接近。结果表明,所建模型可用于黄芩提取物中3种有效成分的定量分析。

3 结论

收集足够多、有代表性的样品集是建立优秀 NIR 定量校正模型的基础。实验所选用的100批黄芩提取物样品,黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量覆盖范围广,且分布比较均匀,具有一定的代表性。

近红外光谱数据和化学分析数据是建立近红外

定量校正模型的基础数据。实验对样品进行统一过筛、重复装样、取平均光谱,尽量降低样品粒度和装样条件等非目标因素对光谱的干扰;对每批样品的化学值进行精确分析,尽量减少分析误差。

合适的建模参数对建立优秀的近红外定量校正模型至关重要,实验通过对光谱预处理方法、建模谱区和主因子数进行对此筛选,最终建立了性能最佳的校正模型。

实验结果表明,近红外光谱法可以用于黄芩提取物中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量的准确测定,为黄芩提取物的质量评价提供了一种快速、简便的新方法。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:391.
- [2] 聂鑫,罗佳波,吕本强,等.高效液相色谱法定量分析黄芩苷粗品中4种黄酮类成分[J].中国医院药学杂志,2007,27(2):191.
- [3] 钱平,孙国琴,张存洲.基于近红外光谱技术的石油组分定量分析新方法[J].光谱学与光谱分析,2008,28(12):2851.
- [4] 白雁,李珊,王星,等.近红外光谱法快速测定金银花中绿原酸的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):66.
- [5] 毛雯岚,钱志余,杨天明,等.颅脑创伤近红外实时监测技术研究[J].光谱学与光谱分析,2009,29(4):922.
- [6] 宋韬,鲍一丹,何勇.利用光谱数据快速检测土壤含水量的方法研究[J].光谱学与光谱分析,2009,29(3):675.
- [7] 李晓明,杨滨.近红外光谱技术的研究进展及其在中药领域的应用[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(12):69.
- [8] 章顺楠,杨海雷,刘占强,等.近红外光谱法在线检测复方丹参滴丸料液中有有效成分含量[J].药物分析杂志,2009,29(2):192.
- [9] 滑容,韩建国,齐晓,等.近红外漫反射光谱法预测紫花苜蓿草颗粒营养价值[J].光谱学与光谱分析,2008,29(4):922.
- [10] 薛利红,杨林章.基于可见近红外高光谱的菠菜硝酸盐快速无损测定研究[J].光谱学与光谱分析,2009,29(4):926.

[责任编辑 蔡仲德]