

近红外光谱技术快速测定盾叶薯蓣中伪原薯蓣皂苷的含量^Δ

谢彩侠*,左春芳,白雁#,雷敬卫(河南中医学院,郑州 450008)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1396-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.19

摘要 目的:建立一种快速测定盾叶薯蓣中伪原薯蓣皂苷含量的方法。方法:首先扫描76份盾叶薯蓣样本的近红外光谱(NIRS)图,通过对光谱预处理方法及建模波段的考察,选择标准归一化+一阶导数作为最优光谱预处理方法,10 118.36~4 007.37 cm⁻¹为建模最佳波段。在此基础上,以高效液相色谱(HPLC)法测定的伪原薯蓣皂苷的含量为参考值,结合偏最小二乘法(PLS)建立NIRS与HPLC分析值之间的定量分析模型。结果:所建模型具有良好的预测能力($r=0.975\ 96$),内部交叉验证均方差为0.169 75,预测均方差为0.089 6。结论:利用NIRS技术可以快速、准确地测定盾叶薯蓣中伪原薯蓣皂苷的含量。

关键词 近红外光谱技术;盾叶薯蓣;伪原薯蓣皂苷;含量测定

Rapid Determination of Pseudoprodioscin in *Dioscorea zingiberensis* by Near Infrared Reflectance Spectroscopy

XIE Cai-xia, ZUO Chun-fang, BAI Yan, LEI Jing-wei (Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a rapid method for the content determination of pseudoprodioscin in *Dioscorea zingiberensis*. METHODS: Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) of 76 *D. zingiberensis* samples were scanned firstly. By investigating the pretreatment methods and modeling band, the best preconditioning was the standard normalization+first derivative and the best modeling band was 10 118.36-4 007.37 cm⁻¹. On the basis, using the content of pseudoprodioscin determined by HPLC as reference, the quantitative analysis model for pseudoprodioscin by NIRS and HPLC method was established with PLS. RESULTS: The quantitative analysis models had good forecasting ability ($r=0.975\ 96$), and the root-mean-square error cross-validation (RM-SECv) and root-mean-square error of prediction (RMSEP) were 0.169 75 and 0.089 6, respectively. CONCLUSION: NIRS can determinate the content of pseudoprodioscin in *D. zingiberensis* rapidly and correctly.

KEY WORDS Near infrared reflectance spectroscopy; *Dioscorea zingiberensis*; Pseudoprodioscin; Content determination

外光谱鉴别方法。结果表明,广陈皮与其他陈皮样品能较好地分为两类,说明近红外光谱技术具有较好的重现性和准确性,适合对广陈皮道地性的快速鉴别分析。

近红外光谱技术可以全面地反映广陈皮的整体质量信息,对不同种属的陈皮,特别是茶枝柑,也就是广陈皮能较为准确地识别。

本试验因样品较少,所得结果代表性有限,进一步的应用研究需要增加具有代表性的样本数。试验过程中发现,陈皮的质量受原产地、贮藏时间和条件、炮制工艺等因素的影响很大,因此需要建立各个因素的分析方案,以实现准确的定性分析、判别。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年

^Δ基金项目:河南省教育厅自然科学研究计划资助项目(No. 2011A360021);河南省高等学校青年骨干教师资助计划项目(No.2010GGJS-134)

*副教授,博士。研究方向:中药质量控制。E-mail: zuochunfang.818@163.com

#通信作者:教授,硕士研究生导师。研究方向:现代仪器分析方法对中药品质进行评价。E-mail: 407813267@qq.com

版.北京:中国医药科技出版社,2010:132.

- [2] 陈封怀.广东植物志:第二卷[M].广州:广东科学技术出版社,1991:279-280.
- [3] 郑小吉,詹晓如,王小平.陈皮道地性研究[J].江西中医药,2007,39(7):71.
- [4] 左大勋,贺善安.中药广陈皮[J].中药通报,1957,3(5):196.
- [5] 戚志华,王四旺,王剑波.高效液相色谱法测定陕西境内不同产地、不同生长期女贞子中2组分的含量[J].中国药房,2007,18(6):455.
- [6] Huck CW. Advances of near-infrared spectroscopy in phyto-chemistry[J]. *Near Infrared Spectrosc*,2002(10):491.
- [7] Huck CW, Maurer R, Bonn GK, et al. Quality control of liquid plant extracts in the phyto pharmaceutical industry [J]. *Near Infrared Spectrosc*,1999(9):487.
- [8] 苏彩珠,尹平河.NIRS分析技术在饲料品质检测中的应用[J].理化检验:化学分册,2003,39(2):126.
- [9] 郭念欣,李颖春,谢伟桥,等.广陈皮与陈皮HPLC指纹图谱的建立与鉴别[J].中国实验方剂学,2011,17(7):90.

(收稿日期:2012-05-31 修回日期:2012-09-06)

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright),又名黄姜、火头根,多年生草质藤本,为薯蓣科薯蓣属(*Dioscorea* L.)植物,是我国特有的植物资源,主要分布于河南、陕西、湖南、湖北等地区,并形成了规模化的人工栽培基地。其根状茎中含有丰富的甾体皂苷类成分,可治疗各种急性化脓性感染、软组织损伤,并有抗肿痛和降血糖的作用,对治疗冠心病有特效,可减少心绞痛,调节新陈代谢,是合成避孕药、甾体激素类药物的重要原料^[1-3]。作为提取原料,只有保证盾叶薯蓣中有效成分的含量在一定的范围内,原料药才有提取价值。经过大量的试验表明,作为甾体皂苷类代表性成分的伪原薯蓣皂苷可以作为控制盾叶薯蓣质量的指标。

近红外光谱(Near infrared reflectance spectrometry, NIRS)技术是近年来新兴的一种现代分析技术,由于其具有方便、快速、无需对样品进行复杂的前处理、适用于在线分析等特点,在药物分析领域中正不断地得到重视与应用。本试验尝试在高效液相色谱(HPLC)法测定伪原薯蓣皂苷含量的基础上运用NIRS技术建立数学模型,对盾叶薯蓣中伪原薯蓣皂苷进行含量测定。

1 材料

1.1 仪器

Nicolet 6700型傅里叶变换NIRS仪,配有积分球、样品旋转台、石英样品杯、OMNIC光谱采集软件和TQ 8.0分析软件(美国Thermo公司);1200型HPLC仪(美国Agilent公司);ELSD 2000 ES型蒸发光散射检测器(德国Alltech公司);KQ-700DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:700 W,频率:40 kHz)。

1.2 试剂

伪原薯蓣皂苷对照品(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,批号:111855-201001);乙腈为色谱纯,水为双蒸水,乙醇为分析纯。

1.3 药材

盾叶薯蓣药材分别采自河南南阳市西峡县、淅川县、内乡县,经河南中医学院中药鉴定教研室陈随清教授鉴定为盾叶薯蓣*D. zingiberensis* C. H. Wright的干燥根茎,清除杂质,60℃烘干,粉碎过65目筛,备用。

2 方法与结果

2.1 NIRS的采集

将76份不同产地、不同生长年限的盾叶薯蓣样品于60℃干燥,粉碎,过65目筛,取约5g样品粉末置于石英样品杯中,混合均匀,轻轻压平,按下述试验条件进行扫描:测样方式为积分球漫反射,分辨率为8 cm⁻¹,扫描32次,扫描范围为12 000~4 000 cm⁻¹,温度为25℃,空气湿度为60%。每份样品重复扫描3次,求平均光谱。76份盾叶薯蓣的NIRS叠加图见图1。

从图1可知,76份样品的NIRS原始图谱基本一致,很难看出药材的光谱信息差别。其原因有两方面:一是NIRS谱带自身重叠严重;二是中药材中成分众多、组成复杂,难以从原始NIRS图谱中找出特征吸收谱带。因此,必须通过化学计量学方法对图谱进行处理和提取^[4]。

2.2 盾叶薯蓣药材中伪原薯蓣皂苷含量的测定

2.2.1 供试品溶液的制备 本试验首次从盾叶薯蓣中提取出伪原薯蓣皂苷,并分别对提取方法、提取时间、提取溶剂等因素进行了多方面的考察,最终确定了如下提取方法。

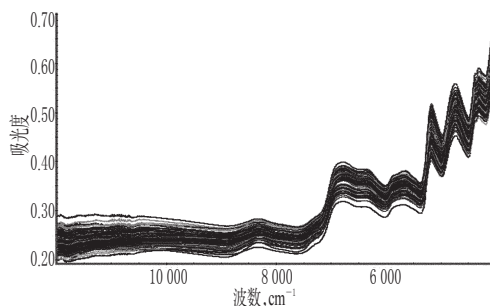


图1 76份样品的NIRS叠加图

Fig 1 Superposed NIRS spectra of 76 samples

取盾叶薯蓣粉末约2g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入75%乙醇50 ml,称定质量,密塞,放置过夜,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用75%乙醇补足失质量,摇匀,滤过,取续滤液25 ml,蒸干,残渣加甲醇适量,超声处理使溶解,并定容至5 ml量瓶中,摇匀,滤过,取续滤液,即得^[5]。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取伪原薯蓣皂苷对照品适量,置于10 ml量瓶中,加75%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为2 mg/ml的溶液,即得。

2.2.3 色谱条件与系统适用性试验 伪原薯蓣皂苷的最大吸收波长为203 nm,具有较强的紫外末端吸收,若采用紫外检测器检测,灵敏度低、干扰峰多,且基线漂移严重,无法准确测定。蒸发光散射检测器不依赖于样品的光学特性,不受官能团的影响,适于仅有末端吸收或无紫外吸收的皂苷类化合物的测定,对伪原薯蓣皂苷的检测效果明显优于紫外检测法^[6]。本试验分别对漂移管温度、载气流速、气压进行了考察,最终确定了如下色谱条件。

色谱柱:Dikma C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(30:70, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;进样量:20 μl;漂移管温度:105℃;载气:N₂;流速:3.0 L/min;气压:4.5 kPa。在此色谱条件下,伪原薯蓣皂苷与样品中相邻色谱峰可得到良好的分离。理论板数按伪原薯蓣皂苷峰计算应>8 000。另外,对上述方法进行方法学考察,各项指标均符合规定。色谱见图2。

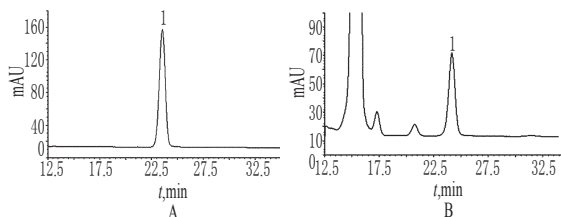


图2 高效液相色谱图

A. 伪原薯蓣皂苷对照品; B. 盾叶薯蓣; 1. 伪原薯蓣皂苷

Fig 2 HPLC chromatograms

A. pseudoprodioscin control; B. *D. zingiberensis*; 1. pseudoprodioscin

2.2.4 样品含量测定 取76份样品各适量,分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,照“2.2.3”项下色谱条件进样测定,计算样品中伪原薯蓣皂苷的质量分数,结果见表1。

2.3 盾叶薯蓣药材中伪原薯蓣皂苷定量模型的建立

2.3.1 建立模型的方法 将76份样品的NIRS与HPLC测定值相关联,输入到TQ 8.0定量分析软件中,随机分为校正集和验证集,要保证验证集的含量范围在校正集的含量范围之内(见表2)。采用偏最小二乘法(PLS)建立定量分析模型,并以

表1 76份样品中伪原薯蓣皂苷的含量测定结果(%)

Tab 1 Contents of pseudoprodioscin in 76 samples(%)

样品编号	伪原薯蓣皂苷的质量分数	样品编号	伪原薯蓣皂苷的质量分数	样品编号	伪原薯蓣皂苷的质量分数
1	0.593 8	27	1.083 3	53	0.034 2
2	0.234 7	28	0.506 8	54	0.028 4
3	0.242 5	29	0.228 9	55	0.180 9
4	0.082 8	30	0.181 0	56	0.494 0
5	0.318 3	31	0.138 0	57	0.089 3
6	0.476 9	32	0.148 2	58	0.037 6
7	0.289 2	33	0.244 2	59	0.020 1
8	0.299 7	34	0.259 6	60	0.297 5
9	0.186 2	35	0.126 0	61	0.105 2
10	0.163 6	36	0.165 4	62	0.034 1
11	0.055 1	37	0.219 7	63	0.740 9
12	0.401 8	38	0.056 6	64	0.142 8
13	0.235 3	39	0.467 3	65	0.338 4
14	0.099 2	40	0.585 8	66	0.076 8
15	0.261 3	41	0.027 4	67	0.337 7
16	0.085 2	42	0.042 4	68	0.492 1
17	0.102 7	43	0.020 5	69	0.510 4
18	0.097 8	44	0.392 1	70	0.912 8
19	0.354 2	45	0.134 2	71	1.097 7
20	0.314 0	46	0.086 0	72	1.045 7
21	0.165 8	47	0.077 7	73	1.017 0
22	0.496 9	48	0.353 9	74	0.268 4
23	0.671 0	49	0.066 2	75	0.147 1
24	0.614 9	50	0.078 6	76	0.488 7
25	0.493 1	51	0.072 2		
26	0.864 4	52	0.667 0		

表2 校正集和验证集中伪原薯蓣皂苷的质量分数分布

Tab 2 Distribution of pseudoprodioscin content in calibration set and validation set

样品	样品数	质量分数范围, %	\bar{x} , %
校正集	60	0.020 1~1.097 7	0.298 0
验证集	16	0.020 5~1.083 3	0.355 4

相关系数(r)、内部交叉验证均方差(RMSECV)、预测均方差(RMSEP)作为评价指标来优化模型性能。 r 越大、RMSECV越小,表明模型构建越合理;RMSEP越小,表明模型的预测性能和推广能力越强^[7-9]。

2.3.2 光谱预处理方法的选择 由于样品物理性质的不同,会引起光谱基线的漂移和斜率的变化,对校正模型的建立会产生较大的影响。因此,在建模前对光谱进行预处理来消除这些影响非常重要。图3为运用标准归一化(SNV)+一阶导数(First derivative)对原始光谱处理后的光谱图。表3为不同预处理方法对 r 和RMSECV的影响结果。从表3中可以看出,不同的光谱预处理方法对 r 和RMSECV有显著的影响。对原始光谱进行必要的处理后,可以很好地消除样品由于颜色差别引起的光谱基线偏移和漂移,强化谱带特征,更能真实细致地反映指标成分的光谱信息。其中,以SNV+ First derivative处理效果最好。

2.3.3 建模区间的选择 建模时所选光谱区间不仅要包含待测组分的最大信息量,避免冗余信息,同时要尽可能地降低噪声干扰,以改善所建模型的性能,获得最佳的预测效果。NIRS由倍频峰和合频峰组成,无锐峰和基线分离的峰,相互重叠严重,不易区分。但经过合适的光谱预处理方法处理之后,可使

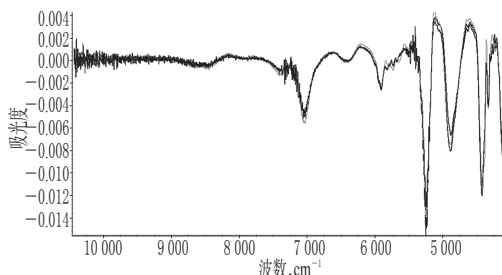


图3 原始光谱处理后的光谱图

Fig 3 Spectrum of original spectrum after treatment

表3 不同预处理方法对 r 和RMSECV的影响

Tab 3 Effects of different preprocessing methods on r and RMSECV

光谱预处理方法	r	RMSECV
SNV+First derivative	0.975 96	0.169 75
多元散射校正(MSC)+First derivative	0.975 80	0.169 83
二阶导数(Second derivative)	0.898 32	0.200 99
MSC+Second derivative	0.960 50	0.217 84
SNV+ Second derivative	0.760 57	0.217 48

各样品光谱间的区别变得明显^[10-12]。经过筛选,伪原薯蓣皂苷质量分数所对应的最佳建模区间为10 118.36~4 007.37 cm^{-1} 。建模区间的选择对 r 和RMSECV的影响见表4。

表4 建模区间的选择对 r 和RMSECV的影响

Tab 4 Effects of the selection of modeling interval on r and RMSECV

光谱范围, cm^{-1}	r	RMSECV
10 118.36~4 007.37	0.975 96	0.169 75
11 705.37~4 265.67	0.961 62	0.208 32
11 191.65~7 357.14	0.855 43	0.258 44
9 081.75~5 614.17	0.763 95	0.214 15

2.3.4 主因子数的选择 在建模过程中,PLS模型采用不同的主因子数,在校正集样本一定的情况下,若因子数取得太少,会导致用来建模的信息不全,模型的预测能力太低;反之,若因子数取得太多,则会将一些噪声的信息掺入计算,导致模型过于复杂,训练过程出现过拟合现象,从而降低模型的预测能力^[13]。因此,本试验用内部交叉验证法来筛选主因子数,最小RMSECV值对应的即为最佳主因子数。本试验采用的最佳主因子数为8。

2.3.5 伪原薯蓣皂苷定量模型的建立 本试验采用TQ 8.0定量分析软件中PLS进行数据处理,其中60份样品作为校正样品集,16份样品作为验证集来建立模型。所建模型的 $r=0.975 96$,校正均方差(RMSEC)=0.057 6(见图4);RMSECV=0.169 75,最佳主因子数为8(见图5);NIRS法测量值与真实值之间的绝对误差在 ± 0.18 之间,RMSEP=0.089 6(见图6)。从图4~图6可以看出,NIRS测量值逼近HPLC测定值,说明该模型建立成功。

2.3.6 伪原薯蓣皂苷定量模型的验证 将16份验证集样品的NIRS图谱输入校正模型,预测伪原薯蓣皂苷的质量分数,并与HPLC测定值进行比较,以NIRS预测值与HPLC测定值的比值作为预测回收率,得平均回收率为101.93%,结果见表5。由表5可以看出,预测结果较为准确,所建模型成功。对于给定的显著性水平0.05, $t_{(0.05, 15)}=2.131$ 。经配对 t 检验,16份样品NIRS预测值与HPLC测定值的 t 值为0.394,小于给定值

2.131,即两种方法的分析结果差异无统计学意义。因此,该模型通过验证,可以准确预测其覆盖范围的盾叶薯蓣药材中伪原薯蓣皂苷的质量分数。

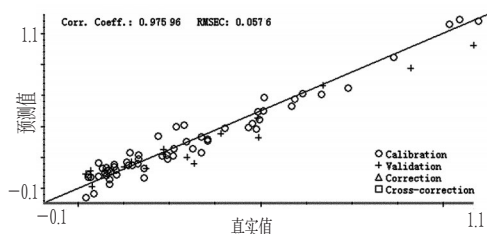


图4 伪原薯蓣皂苷质量分数NIRS预测值与真实值之间的相关图

Fig 4 Relationship of predicted value vs. experimental value of pseudoprodioscin content

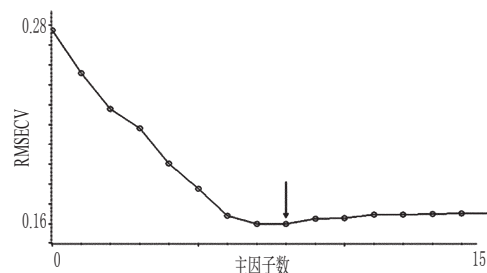


图5 校正集RMSECV与主因子数之间的相关图

Fig 5 Relationship of RMSECV of validation set and the number of main factors

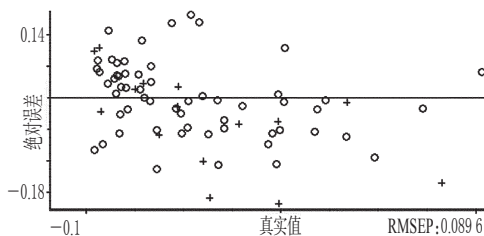


图6 NIRS预测值与真实值之间的偏差图

Fig 6 Deviation of predicted values with measured value of NIRS

表5 验证集样品的NIRS预测结果

Tab 5 The predicted results of NIRS in validation set

样品编号	HPLC法测定值, %	NIRS法预测值, %	预测回收率, %	平均回收率, %
2	0.234 7	0.230 7	98.30	101.93
5	0.318 3	0.308 8	97.02	
8	0.299 7	0.289 1	96.46	
9	0.186 2	0.177 3	95.22	
13	0.235 3	0.242 3	102.97	
23	0.671 0	0.663 4	98.87	
25	0.493 1	0.475 3	96.39	
27	1.083 3	1.072 6	99.01	
35	0.126 0	0.129 7	102.94	
43	0.020 5	0.022 4	109.27	
44	0.392 1	0.380 9	97.14	
53	0.034 2	0.035 9	104.97	
56	0.494 0	0.515 2	104.29	
58	0.037 6	0.040 5	107.71	
70	0.912 8	0.957 3	104.88	
75	0.147 1	0.169 9	115.50	

3 讨论

本试验首次运用HPLC-蒸发光散射检测器法对盾叶薯蓣中伪原薯蓣皂苷进行了含量测定,所得色谱峰能得到良好的分离。但由于测定方法比较烦琐,故通过NIRS法和HPLC法相结合,建立了盾叶薯蓣中伪原薯蓣皂苷含量的定量分析模型,将模型用于工业实际生产中,只需将扫描的样品NIRS图谱输入所建立的校正模型中,便可准确、快速地测定其含量。

本试验采用NIRS法测定盾叶薯蓣药材中伪原薯蓣皂苷的含量,经验证,计算结果准确,符合工业生产中的检测要求,很大程度上提高了经济效益,可为盾叶薯蓣质量的快速评价提供参考和依据。与常规分析方法相比,本法具有快速、无损、不消耗试剂、原位分析等特点,适用于大量盾叶薯蓣药材的快速测定,是一种很值得推广的绿色分析方法^[14-17]。本方法具有一定的普适性,有望应用于其他中药体系。

参考文献

- [1] 刘中博,王铁杰,卢忠强,等.HPLC法同时测定穿龙薯蓣中薯蓣皂苷和原薯蓣皂苷[J].中草药,2008,39(5):774.
- [2] 黄亚辉,盛效邦.盾叶薯蓣植物学研究进展与展望[J].中国中药杂志,2005,30(23):1 806.
- [3] 王辉,胡长鹰,庞自洁,等.盾叶薯蓣中甾体皂苷的研究[J].中草药,2009,40(1):36.
- [4] 白雁,刘乐,王东,等.近红外光谱对黄芩药材浸出物的快速测定[J].时珍国医国药,2009,20(5):1 081.
- [5] 荆文光,张启伟,刘安.HPLC测定黄山药中伪原薯蓣皂苷的含量[J].中国中药杂志,2009,34(20):2 616.
- [6] 王慧森,刘明,李更生.高效液相色谱-蒸发光散射检测法在中药研究中的应用[J].中医研究,2008,21(8):61.
- [7] 章顺楠,杨海雷,刘占强,等.近红外光谱法在线监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.
- [8] 王宁,孙岱,董海平.声光可调滤光器-近红外主成分分析法快速鉴别银黄口服液和双黄连口服液[J].中国药房,2009,20(30):2 355.
- [9] 张治军,饶伟文.三七及其伪品的近红外光谱鉴别法[J].中国药房,2009,20(30):2 367.
- [10] 丁东,赵振武,崔继承.葡萄糖粉末近红外光谱的测量[J].仪器仪表学报,2002,23(5):48.
- [11] 陆婉珍,袁洪福,徐广通,等.现代近红外光谱分析技术[M].北京:中国石化出版社,2007:44.
- [12] 洪明坚,温志渝,张小洪.基于稀疏优化的近红外光谱波长选择方法[J].仪器仪表学报,2011,32(5):1 114.
- [13] 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):1 037.
- [14] 高越,柴逸峰,吴玉田.近红外漫反射光谱法鉴别贝母药材的研究[J].中成药,2005,27(12):1 443.
- [15] 叶华俊,夏阿林,张学锋,等.基于长波近红外的便携式品质分析仪的研制及应用[J].仪器仪表学报,2012,33(1):85.
- [16] 王晋,张汝华,马成禹.近红外光谱法在药学上的应用[J].中国医药工业杂志,1999,30(1):39.
- [17] 张威,白雁,王星,等.近红外漫反射光谱法测定连翘提取物中连翘苷含量[J].中国医院药学杂志,2010,30(12):1 018.

(收稿日期:2012-05-15 修回日期:2012-09-13)