

# 近红外光谱法快速测定女贞子药材中女贞苷的含量<sup>Δ</sup>

张迪文\*,白雁,谢彩侠#,雷敬卫,周琳琳,张苗(河南中医学院药学院,郑州 450046)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)36-5140-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.36.32

**摘要** 目的:建立快速测定女贞子药材中女贞苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)测定药材中女贞苷的含量(作为参考值);色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为230 nm,柱温为30℃,进样量为10 μl。采用偏最小二乘法-近红外光谱法建立预测药材中女贞苷含量的定量校正模型:根据HPLC法含量测定结果,采集校正集样品72份、验证集样品24份,以多元散射校正法联合一阶导数法预处理光谱,最佳波段为9 999.89~4 001.01 cm<sup>-1</sup>,主成分因子数为9。结果:女贞苷含量测定方法学考察符合要求。女贞苷含量预测的定量校正模型内部交叉验证决定系数为0.984 69,校正均方根偏差为0.097,预测均方根偏差为0.100,交叉验证均方根偏差为0.240 13,预测值与实测值差异无统计学意义(P>0.05)。结论:该方法快速、准确、简便、无破坏、无污染,可用于女贞子药材中女贞苷含量的快速测定。

**关键词** 近红外光谱法;偏最小二乘法;女贞子;女贞苷;含量

## Rapid Determination of Ligustroflavone in *Fructus ligustri* by PLS-NIR Spectroscopy

ZHANG Diwen, BAI Yan, XIE Caixia, LEI Jingwei, ZHOU Linlin, ZHANG Miao (College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the rapid determination of ligustroflavone in *Fructus ligustri*. METHODS: HPLC was conducted to determine the content of ligustroflavone (as reference value): the column was Diamonsil C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution) at a flow rate of 1 ml/min, the detection wavelength was 230 nm, column temperature was 30℃ and the injection volume was 10 μl. Partial least square (PLS)-near infrared spectroscopy (NIRS) were adopted to establish the quantitative calibration model of ligustroflavone content: according to the determination results of ligustroflavone content, 72 samples of calibration set and 24 samples of validation set were collected and pretreated spectrum by multivariate scattering correction (MSC) combined with the First Derivative, the optimized wavelength band was 9 999.89-4 001.01 cm<sup>-1</sup> and principal component factor number was 9. RESULTS: Methodology validation of content determination for ligustroflavone was in line with the requirement. Internal cross-validation coefficient of the quantitative calibration model for ligustroflavone was 0.984 69, corrected root mean square deviation was 0.097, the root mean square error of predication was 0.100, and the root mean square error of cross validation was 0.240 13. There was no significant different between the predicted value and the measured value. CONCLUSIONS: The method is rapid, accurate, simple without destruction and pollution, and can be used for the rapid determination of ligustroflavone in *F. ligustri*.

**KEYWORDS** Near-infrared spectroscopy; Partial least square; *Fructus ligustri*; Ligustroflavone; Content

女贞子是木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实,为一味传统的扶正固本药物,具有滋补肝肾、明目乌发之功效<sup>[1]</sup>,属于补益类中药中的上品。我国女贞子药材资源丰富,现代研究发现其中主要含有三萜类、环烯醚萜类、黄酮类及苯乙醇苷类等成分,具有调节免疫、降血糖、降血脂、抗氧化、抗炎抑菌及保肝等药理作用<sup>[2-4]</sup>。女贞苷为环烯醚萜类中含量较高的成分之一,可以作为女贞子药材专属指标性成分,用于评价其质量。女贞苷传统测定方法为高效液相色谱法(HPLC),虽然测定结果较准确,但其前处理烦琐复杂,且化学试剂污染空气环境,测定过程较长。

近红外光谱(NIR)技术简便、快捷,获得信息多,对环境零污染,具有非破坏性<sup>[5]</sup>。故本研究以96批不同产地的女贞子药材为样品,利用NIR仪采集其NIR,根据HPLC法含量测定结果,建立预测其中女贞苷含量的定量校正模型。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Δ 基金项目:河南省高等学校重点科研项目(No.15A360010)  
\* 硕士研究生。研究方向:中药品质的分析、评价。E-mail: 908625387@qq.com  
# 通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药品质的分析、评价。电话:0371-65962967。E-mail:2590464842@qq.com

Nicolet 6700型傅里叶变换NIR仪(美国Thermo公司); 2695型HPLC仪,包括2998检测器(美国Waters公司);SZ-93型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);ME54E型万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);CPA225D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);TY-500型超声波清洗仪(北京天佑恒达科技有限公司,功率:500 W,频率:40 kHz)。

### 1.2 试剂

女贞苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号: MUST-14062606,纯度>98%);甲醇为色谱纯,乙腈为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 药材

女贞子药材采购于四川、湖南、浙江、河南4个产地,共96批样品,由河南中医学院董诚明教授鉴定为真品。

## 2 方法与结果

### 2.1 NIR的采集

取样品适量,粉碎,过40目筛,取约5 g粉末置于石英杯中,混合均匀,采用积分球漫反射系统,以空气为参比,扣除背景采集NIR。采集条件:分辨率为8 cm<sup>-1</sup>,扫描范围为12 000~4 000 cm<sup>-1</sup>,扫描累积次数为64次,每次扫描背景间隔为20 min,温度为25~28℃,相对湿度为18%~20%。96批样品的

近红外原始光谱叠加图见图1。

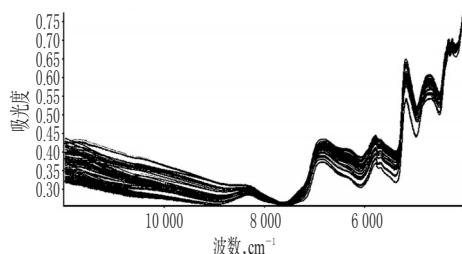


图1 96批样品的近红外原始光谱叠加图

Fig 1 The near-infrared reflectance spectra of 96 samples

## 2.2 女贞苷含量的HPLC法测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱 (0~30 min, 15%→34% A); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl。在上述色谱条件下, 理论板数以女贞苷峰计不少于3 000; 各成分基线分离良好, 分离度> 1.5, 详见图2。

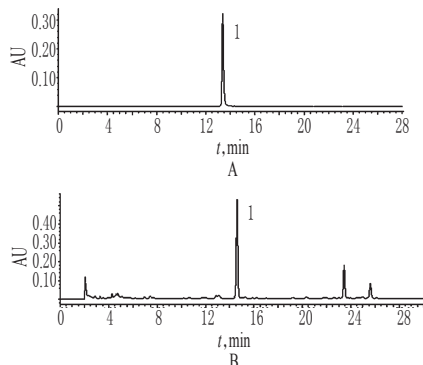


图2 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 女贞苷

Fig 2 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; 1. ligustroflavone

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取女贞苷对照品1.08 mg, 置于50 ml量瓶中, 加水溶解并定容, 摇匀, 即得女贞苷质量浓度为0.021 6 mg/ml的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末0.2 g, 精密称定, 置于100 ml锥形瓶中, 加甲醇25 ml, 超声处理30 min, 处理2次, 滤过, 合并滤液至100 ml蒸发皿中, 蒸干, 残渣用水溶解并定容至10 ml, 摇匀, 以0.45 μm滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 方法学考察 按相关标准进行方法学试验, 结果表明, 精密度、稳定性、重复性试验中女贞苷峰面积的RSD均< 3.0%, 表明仪器精密度、溶液稳定性、方法重复性均较好。

2.2.5 样品含量测定 取96批样品各适量, 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量, 结果见表1。

## 2.3 NIR定量校正模型建立与验证

2.3.1 校正集与验证集样品的选择 根据“2.2.5”项下女贞苷含量分布情况, 从96批样品中选取72批组成校正集, 用于建立模型; 其余24批样品组成验证集, 用于验证模型。选择原则为验证集样品女贞苷含量分布范围应包含在校正集样品女贞苷含量分布范围之内, 详见表2。

2.3.2 光谱预处理方法的选择 分别以常数偏移消除法(COE)、多元散射校正法(MSC)、Savitzky-Golay滤波法(SG)、Norris derivative滤波法(ND)、标准归一化法(SNV)、一阶导数

法(First derivative)、二阶导数法(Second derivative)等<sup>[6]</sup>方法预处理光谱, 得不同校正集内部交叉验证决定系数( $R^2$ )、校正均方根偏差(RMSEC)和预测均方决定差(RMSEP), 详见表3。

表1 样品含量测定结果( $n=3$ , %)

Tab 1 Results of contents determination of samples( $n=3$ , %)

编号	女贞苷含量	编号	女贞苷含量	编号	女贞苷含量
1	2.07	33	2.53	65	3.26
2	2.14	34	2.45	66	2.88
3	1.98	35	2.77	67	3.32
4	2.14	36	2.54	68	3.12
5	1.89	37	2.24	69	2.92
6	1.90	38	2.24	70	2.94
7	1.68	39	2.21	71	2.71
8	2.09	40	2.35	72	2.77
9	1.88	41	2.30	73	2.73
10	1.97	42	2.42	74	2.88
11	1.65	43	2.38	75	2.79
12	1.62	44	2.52	76	0.84
13	1.84	45	2.62	77	0.91
14	1.81	46	2.56	78	1.00
15	1.89	47	2.31	79	1.39
16	1.93	48	2.38	80	1.38
17	1.95	49	2.38	81	1.35
18	1.91	50	2.76	82	2.61
19	1.80	51	2.67	83	2.61
20	2.21	52	2.41	84	2.60
21	1.91	53	2.46	85	1.71
22	1.10	54	2.31	86	1.82
23	1.22	55	2.34	87	1.76
24	1.06	56	2.60	88	1.79
25	1.80	57	2.46	89	1.82
26	1.94	58	2.56	90	1.77
27	1.74	59	2.60	91	1.08
28	1.81	60	2.44	92	1.22
29	1.65	61	3.00	93	1.26
30	1.69	62	2.77	94	1.98
31	2.46	63	2.79	95	2.07
32	2.44	64	2.76	96	2.22

表2 校正集与验证集样品女贞苷含量分布范围

Tab 2 Distribution ranges of calibration and validation for ligustroflavone content

样品	样品量,批	最大值,%	最小值,%	平均值,%
校正集	72	3.32	0.84	2.13
验证集	24	3.26	1.08	2.25

运用TQ Analyst 8.0分析软件对表3数据进行处理, 结合偏最小二乘法建立NIR定量校正模型。选择 $R^2$ 、RMSEC、RMSEP为评价指标, 综合评价不同模型的准确性和适用性。其中, $R^2$ 越接近1, NIR模型预测值与实测值相关性越好; RMSEC与RMSEP越接近, 且RMSEC略小于RMSEP, 所建模型适用性越强, 预测效果越好<sup>[7-8]</sup>。结果表明, 以MSC+First derivative预处理光谱效果最好, 可以消除多重光谱偏差。对导数光谱进行微调处理, 经最佳光谱预处理方法处理后的NIR见图3。

2.3.3 建模波段的选择 建模波段区间要求包含样品的大量信息, 同时要避免冗余信息, 降低噪声干扰<sup>[9]</sup>。交叉验证均方根偏差(RMSECV)越小, 所建模型适用性越强, 预测效果越好。采用MSC+First derivative对不同的波段进行手动优化比较, 通过TQ Analyst 8.0分析软件得到最佳波段范围为9 999.89~4 001.01  $\text{cm}^{-1}$ , 详见表4。

表3 不同光谱预处理方法对定量校正模型性能的影响

Tab 3 Effects of different pretreatment methods on quantitative model performance

光谱预处理方法	$R^2$	RMSEC	RMSEP
COE	0.904 48	0.238	0.188
MSC+First derivative	0.984 69	0.097	0.100
MSC+Second derivative	0.981 40	0.107	0.149
SNV+Second derivative	0.983 10	0.102	0.157
SNV+First derivative	0.899 16	0.244	0.181
MSC+ND+First derivative	0.976 94	0.119	0.121
MSC+ND+Second derivative	0.965 79	0.145	0.151
MSC+SG+First derivative	0.988 32	0.085	0.113
MSC+SG+Second derivative	0.957 77	0.161	0.151
SNV+SG+First derivative	0.892 37	0.252	0.183
SNV+SG+Second derivative	0.968 03	0.140	0.146
SNV+ND+First derivative	0.977 59	0.118	0.118
SNV+ND+Second derivative	0.965 45	0.146	0.155

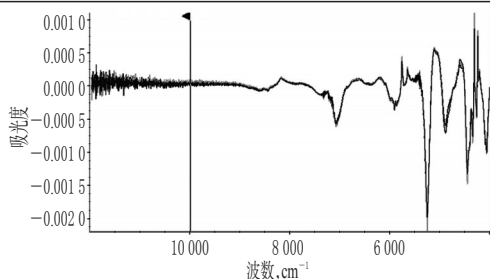


图3 预处理后的近红外光谱

Fig 3 The near-infrared spectra after pretreatment

表4 不同波段范围对 $R^2$ 和RMSECV的影响

Tab 4 Effects of different spectral range on  $R^2$  and RMSECV

波段范围, $cm^{-1}$	$R^2$	RMSECV
9 033.09~4 423.33	0.972 04	0.240 76
8 465.97~4 185.67	0.981 18	0.257 89
9 627.04~5 115.82	0.948 20	0.297 26
9 999.89~4 001.01	0.984 69	0.240 13

2.3.4 主成分数的选择 在建模过程中,采用不同的主成分数,模型的预测能力不同,若主成分数太少,建模信息不全,预测能力太低;反之,主成分数太多,验证过程会出现过拟合现象<sup>[10]</sup>。采用内部交叉验证考察主成分数对RMSECV的影响,并作曲线,详见图4。结果表明,当偏最小二乘法因子数为9时, RMSECV最小,即最佳建模主成分数为9。

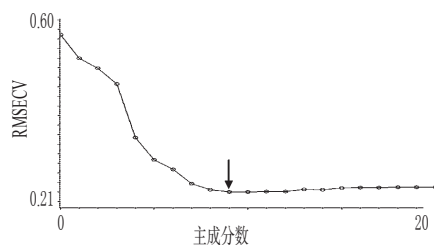


图4 主成分数对RMSECV的影响

Fig 4 Effects of principal component numbers on RMSECV

2.3.5 定量校正模型的建立 运用TQ Analyst 8.0分析软件,以72批校正集样品NIR为准,对光谱采用MSC+First derivative预处理方法,在9 999.89~4 001.01  $cm^{-1}$ 波段范围,选择9个主成分数进行建模。结果,用校正集样品进行内部验证,  $R^2=0.984 69$ ,  $RMSEC=0.097$ ,  $RMSEP=0.100$ ,  $RMSECV=0.240 13$ 。女贞苷NIR预测值与实测值的相关图和偏差图见

图5。由图5可知,NIR预测值与实测值的相关性较高,且结果很接近,所建模型的性能较好,可以用于女贞子药材中女贞苷的定量分析。

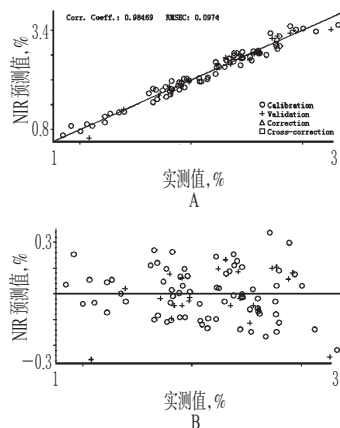


图5 女贞苷NIR预测值与实测值的相关图和偏差图

A.相关图;B.偏差图

Fig 5 Correlation and deviation between NIR predicted value and content reference value of ligustroflavone

A. correlation; B. deviation

2.3.6 定量校正模型的验证 选择24批验证集样品进行外部验证。将其NIR输入定量校正模型,预测女贞苷含量,再与实测值进行比较,结果见表5。由表5可知,验证集样品的NIR预测值与实测值的绝对误差不超过0.13%,相对误差为0.50%~5.62%,平均相对误差为2.77%,说明所建模型具有良好的预测能力与适应性。将验证集样品含量实测值与NIR预测值进行配对t检验,  $t=0.107$ ,  $P=0.914 > 0.05$ ,按0.05的显著性水平分析,实测值与预测值差异无统计学意义,说明该模型预测结果可靠,可用于样品中女贞苷含量的快速测定。

表5 24批验证集样品的NIR定量校正模型预测结果(%)

Tab 5 NIR predicted values of 24 validation samples (%)

编号	实测值	预测值	绝对误差	相对误差	平均相对误差
1	3.26	3.22	-0.04	1.22	
2	2.92	3.00	0.08	2.73	
3	2.73	2.83	0.10	3.66	
4	2.89	2.95	0.06	2.07	
5	2.24	2.34	0.10	4.46	
6	2.36	2.31	-0.05	2.11	
7	2.43	2.51	0.08	3.29	
8	2.53	2.42	-0.11	4.34	
9	2.56	2.52	-0.04	1.56	
10	2.31	2.44	0.13	5.62	
11	2.60	2.54	-0.06	2.30	
12	2.44	2.42	-0.02	0.81	
13	1.39	1.41	0.02	1.43	
14	2.78	2.88	0.10	3.59	
15	1.71	1.69	-0.02	1.16	
16	1.08	1.03	-0.05	4.62	
17	1.91	1.87	-0.04	2.09	
18	2.61	2.55	-0.06	2.29	
19	1.98	1.97	-0.01	0.50	
20	1.91	1.97	0.06	3.14	
21	1.98	1.95	-0.03	1.51	
22	1.84	1.80	-0.04	2.17	
23	1.82	1.72	-0.10	5.49	
24	1.80	1.88	0.08	4.44	

2.77

### 3 讨论

# 土茯苓药材 HPLC 指纹图谱研究及主成分的含量测定

张永贵\*, 赵力, 杨小英\*(宁夏医科大学总医院, 银川 750004)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)36-5143-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.36.33

**摘要** 目的: 建立土茯苓药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱及同时测定其中落新妇苷、白藜芦醇含量的方法。方法: 采用 HPLC 法。色谱柱为 Zorbax SB-C<sub>18</sub>, 流动相为甲醇-0.2% 乙酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 306 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μl。以落新妇苷为参照物, 对 13 批样品 HPLC 图谱采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A 版)进行相似度评价。结果: 13 批样品 HPLC 图谱有 12 个共有峰, 相似度均 > 0.90。落新妇苷、白藜芦醇检测质量浓度线性范围分别为 6.65~425.6、1.72~110 μg/ml ( $r$  均为 0.999 9); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD < 3.0%; 加样回收率分别为 97.30%~102.30% (RSD = 1.97%,  $n$  = 6)、98.12%~104.02% (RSD = 2.57%,  $n$  = 6)。结论: 该研究所建指纹图谱可为土茯苓药材的鉴别和质量评价提供参考; 该测定方法操作简便, 精密度、稳定性、重复性良好, 可用于土茯苓药材中落新妇苷和白藜芦醇含量的同时测定。

**关键词** 土茯苓; 落新妇苷; 白藜芦醇; 指纹图谱; 含量测定

## Study on the Quality of Commercially Available HPLC Fingerprint and Content Determination of Principal Component of *Smilacis rhizoma*

ZHANG Yonggui, ZHAO Li, YANG Xiaoying (General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint and determine the contents of astilbin and resveratrol in *Amilicis rhizoma*. METHODS: HPLC was performed on the column of Zorbax SB-C<sub>18</sub> with the mobile phase of methanol-0.2% acetic acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 306 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 20 μl. With reference of astilbin, the similarity analysis was conducted for the HPLC chromatograms of 13 batches of samples by using *TCM Fingerprint Similarity Evaluation System* (2004 A edition). RESULTS: There were totally 12 common peaks in the HPLC chromatograms of 13 batches of samples, similarities were all higher than 0.90. The linear range was 6.65-425.6 μg/ml for astilbin ( $r$  = 0.999 9) and 1.72-110 μg/ml for resveratrol ( $r$  = 0.999 9); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3.0%; recoveries were 97.30% -102.30% (RSD = 1.97%,  $n$  = 6) and 98.12% -104.02% (RSD = 2.57%,  $n$  = 6). CONCLUSIONS: The established fingerprint can provide reference for the identification and quality evaluation of *S. rhizoma*, the method is simple with good precision, stability and reproducibility, and can be used for the identification of *S. rhizoma* simultaneous determination of astilbin and resveratrol in *S. rhizoma*.

**KEYWORDS** *Smilacis rhizoma*; Astilbin; Resveratrol; Fingerprint; Content determination

NIR 定量校正模型的适用范围取决于校正集样品指标性成分的含量范围。本试验收集到的女贞子药材样品来自四川、湖南、浙江、河南等多个产地, 涵盖范围较广且分布较为均匀, 具有一定的代表性。因此, 所建模型适用性较强, 可用于女贞子药材中指标性成分女贞苷的含量预测。

本试验运用 NIR 法结合偏最小二乘法建立了一种快速测定女贞子药材中女贞苷含量的新方法。本方法简便、快捷, 成本较低, 获得信息多, 具有非破坏性, 并且对环境零污染, 符合现代中医药科学发展的理念, 也为女贞子药材及其制剂的临床应用和质量检验提供了一定的参考。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 45.
- [2] 江洪波, 董小萍. 女贞子总三萜的制备及抗氧化活性研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2015, 17(1): 189.
- [3] 刘亭亭, 王萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 228.

- [4] 张金玲, 王小虎, 邓振涛, 等. 中药女贞子化学成分及药理作用研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(36): 4 100.
- [5] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京: 中国石化出版社, 2007: 35.
- [6] 白雁. 现代近红外光谱分析技术在药品及食品品质评价系统中的应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 81.
- [7] 雷敬卫, 樊明月, 郭艳利, 等. 近红外光谱法快速测定木香中木香烃内酯与去氢木香内酯的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(7): 1 062.
- [8] 郭瑞峰, 鄯冰冰, 张铨源. 盐酸地芬尼多片近红外光谱定量模型的建立[J]. 中国药房, 2014, 25(25): 2 352.
- [9] 杜文俊, 刘雪松, 陶玲艳, 等. 热毒宁注射液金银花和青蒿(金青)醇沉过程中多指标的近红外快速检测[J]. 中草药, 2015, 46(1): 61.
- [10] 白雁, 樊明月, 雷敬卫, 等. 近红外漫反射光谱法快速测定枳实药材中醇浸出物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 73.

\* 副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0951-5601267  
# 通信作者: 主任药师。研究方向: 临床药学及临床药理学。电话: 0951-6743031。E-mail: yxy-1970@163.com

(收稿日期: 2016-01-07 修回日期: 2016-04-30)  
(编辑: 张静)