

近红外漫反射光谱法快速测定首乌丸中二苯乙烯苷的含量^Δ

刘喜乐*, 贾灿潮, 姬生国[#](广东药科大学中药学院, 广州 510006)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)18-2539-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.18.26

摘要 目的:建立快速测定首乌丸中二苯乙烯苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)测定首乌丸中二苯乙烯苷的含量(作为实测值);色谱柱为ODS-C₁₈,流动相为乙腈-水(25:75, V/V),流速为0.8 mL/min,检测波长为320 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。采用偏最小二乘法-近红外漫反射光谱法建立预测首乌丸中二苯乙烯苷含量的定量校正模型;根据实测值,采集校正集样品76份、验证集样品18份,以标准归一化法、一阶导数法联合滤波法预处理光谱,最佳波段为9 000~4 150 cm⁻¹,主成分因子数为12。结果:首乌丸中二苯乙烯苷的含量测定方法学考察符合要求。二苯乙烯苷含量预测的定量校正模型内部交叉验证决定系数为0.991 90,校正均方根偏差为0.020 1,预测均方根偏差为0.023 6,交叉验证均方根偏差为0.076 29,预测值与实测值差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:该方法准确、稳定、简便,可用于首乌丸中二苯乙烯苷含量的快速测定。

关键词 近红外漫反射光谱法;首乌丸;二苯乙烯苷;含量;偏最小二乘法

Rapid Determination of Stilbene Glycoside in Shouwu Pills by Near Infrared Diffuse Reflectance Spectrophotometry

LIU Xile, JIA Canchao, JI Shengguo (School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the rapid determination of stilbene glycoside in Shouwu pills. METHODS: HPLC method was used to determine the content of stilbene glycoside in Shouwu pills (as measured value). The determination was performed on ODS-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (25:75, V/V) at the flow rate of 0.8 mL/min. The detection wavelength was set at 320 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. The partial least square method-near infrared diffuse reflectance spectrophotometry was used to establish quantitative calibration model for predicting the content of stilbene glycoside in Shouwu pills. According to measured value, 76 calibration set samples and 24 validation set samples were collected. Standard normalization method and first-order derivative method combined with Savitzky-Golay filter method were used for spectrum pretreatment. The optimal band ranged 9 000-4 150 cm⁻¹, and main component factor was 12. RESULTS: The content determination method of stilbene glycoside in Shouwu pills was in line with the requirements. The correlation coefficients, the root-mean-square error of calibration, the root-mean-square error of predication and the root-mean-square error of cross-validation (RMSECV) of the quantitative calibration model were 0.991 90, 0.020 1, 0.023 6 and 0.076 29. There was no statistical significance between predicted value and measured value ($P>0.05$). CONCLUSIONS: The method is accurate, stable and simple, and can be used for rapid determination of stilbene glycoside in Shouwu pills.

KEYWORDS Near infrared diffuse reflectance spectrophotometry; Shouwu pills; Stilbene glycoside; Content; Partial least square method

首乌丸由制何首乌、熟地黄、桑椹等中药组成,具有补肝肾、益精血、乌须发的功效,可用于治疗肝肾两虚、头晕目花、耳鸣、腰酸肢麻、须发早白、高血脂等症^[1]。该制剂现收载于2015年版《中国药典》(一部),采用高效液相色谱法(HPLC)作为测定首乌丸中二苯乙烯苷含量的标准方法,但该方法操作较为烦琐,不仅费时费力,而且易破坏样品^[2]。近红外漫反射光谱法(Near infrared diffuse reflectance spectroscopy, NIDRS)作为一门绿色分析

技术,通过扫描样品的近红外光谱,可以得到样品中有机分子含氢基团的特征信息^[3],在药物的定性、定量分析方面具有广泛的应用前景^[4-7]。鉴于此,本课题组采用NIDRS法建立了快速测定首乌丸中二苯乙烯苷含量的方法,以期完善该制剂的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1120型全自动HPLC仪,配备SIL-20A自动进样器、SPD-20A紫外检测器、LC solution工作站(日本Shimadzu公司);Nicolet 6700型傅里叶变换近红外光谱仪,配有漫反射积分球、样品旋转器和石英样品杯、OMNIC光谱采集软件和TQ 8.0分析软件(美国Thermo公司);BIY211b型万分之一电子分析天平和AY120型十万分

Δ 基金项目:广东省科技计划项目(No.2009B030801044)

* 硕士研究生。研究方向:中药资源与质量。E-mail: xila_1990@126.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药资源、中药质量标准及中药新药研究。E-mail: shengguo_ji@163.com

之一电子分析天平(日本 Shimadzu 公司); Milli-Q Advantage A10 型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

首乌丸(广东药科大学中药学院自制,编号:1~94,规格:10 g/丸);二苯乙烯苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号:MUST-14021907,纯度: $\geq 98\%$);乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 NIDRS 采集

取样品适量,粉碎,过40目筛,取约4 g,混匀后置于石英杯中,轻轻振荡使其分布均匀,采用积分球漫反射系统,以空气为参比,扣除背景采集NIDRS。采集条件:分辨率为 8 cm^{-1} ,扫描范围为 $12\ 000\sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$,扫描累积次数为64次,温度为 $(25\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度为 $28\%\sim 35\%$ 。94批样品的近红外漫反射原始光谱叠加图见图1。

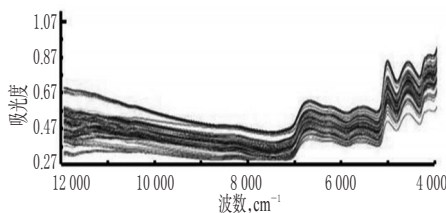
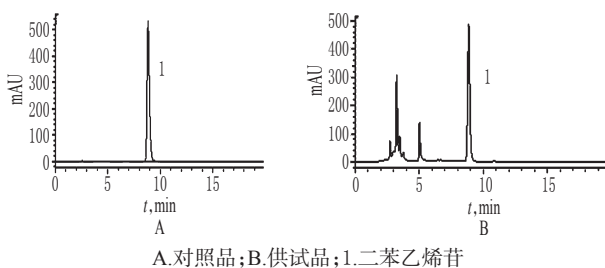


图1 94批样品的近红外漫反射原始光谱叠加图

Fig 1 Near infrared diffuse reflectance spectrum superposed graph of 94 batches of samples

2.2 二苯乙烯苷含量的测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: ODS-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(25:75, V/V); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 320 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。在上述色谱条件下,理论板数按二苯乙烯苷峰计 $\geq 2\ 000$;各成分基线分离良好,分离度 > 1.5 ,详见图2。



A. substance control; B. test sample; 1. stilbene glycoside

图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取二苯乙烯苷对照品4.03 mg,置于10 mL棕色量瓶中,加70%甲醇溶液溶解,制成每1 mL含二苯乙烯苷0.403 mg的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末约0.4 g,精密称定,置于25 mL棕色量瓶中,加70%甲醇溶液25 mL,称定质量,加热回流30 min,放至室温,再次称定质量,用

70%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,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、重复性试验中二苯乙烯苷峰面积的 $\text{RSD} < 2.0\%$,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94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。

表1 样品含量测定结果($n=3, \%$)

Tab 1 Results of content determination in samples ($n=3, \%$)

样品编号	含量	样品编号	含量	样品编号	含量
1	0.614 1	33	0.908 0	65	0.528 4
2	0.630 5	34	0.954 0	66	0.503 8
3	0.594 3	35	0.936 6	67	0.534 4
4	0.515 9	36	0.822 1	68	1.021 6
5	0.528 4	37	0.916 4	69	1.004 5
6	0.530 6	38	0.972 7	70	0.871 4
7	0.535 3	39	0.919 5	71	0.883 0
8	0.554 9	40	0.703 7	72	0.891 1
9	0.567 5	41	0.732 0	73	0.843 0
10	0.577 6	42	0.862 2	74	0.840 1
11	0.514 8	43	0.853 4	75	0.470 8
12	0.539 3	44	0.678 7	76	0.461 2
13	0.571 2	45	0.656 5	77	0.470 8
14	0.625 4	46	0.695 9	78	0.562 6
15	0.628 2	47	0.810 4	79	0.545 6
16	0.598 0	48	0.539 0	80	0.830 9
17	0.797 8	49	0.553 2	81	0.841 3
18	0.806 7	50	0.560 9	82	0.817 2
19	0.816 0	51	0.528 9	83	0.832 8
20	0.640 7	52	0.463 5	84	0.780 5
21	0.634 4	53	0.484 9	85	0.573 2
22	0.669 7	54	0.471 6	86	0.535 8
23	0.573 7	55	0.553 1	87	0.571 2
24	0.588 6	56	0.523 1	88	0.587 1
25	0.751 7	57	0.757 8	89	0.582 1
26	0.726 1	58	0.766 3	90	0.676 7
27	0.745 7	59	0.764 9	91	0.614 9
28	0.958 7	60	0.736 1	92	0.625 9
29	0.971 2	61	0.722 9	93	0.604 3
30	0.946 4	62	0.709 6	94	0.515 7
31	0.863 2	63	0.562 8		
32	0.860 6	64	0.579 2		

2.3 NIDRS 定量校正模型的建立与验证

2.3.1 校正集与验证集样品的选择 根据“2.2.5”项下二苯乙烯苷含量分布情况,从94批样品中选取76批组成校正集,用于建立模型;其余18批样品组成验证集,用于验证模型。选择原则为验证集样品中二苯乙烯苷含量分布范围应包含在校正集样品二苯乙烯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 分别以一阶导数法(First derivative)、二阶导数法(Second derivative)、滤波

表2 校正集与验证集样品中二苯乙烯苷含量分布范围

Tab 2 Content distribution of calibration set and validation set for stilbene glycoside

样品	样品量,批	最大值,%	最小值,%
校正集	76	0.46	1.02
验证集	18	0.47	0.86

法(Savitzky-Golay filter, SG)、无滤过法(No smoothing)、标准归一化法(SNV)、多元散射校正法(MSC)等方法预处理光谱或不进行预处理即常量光谱(Constant+ Spectrum),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)和预测均方根偏差(RMSEP),结果见表3。

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 the property of model

光谱预处理方法	R^2	RMSEC	RMSEP
Constant+ Spectrum+No smoothing	0.949 10	0.049 9	0.055 2
Constant+First derivative+No smoothing	0.997 31	0.011 6	0.026 8
Constant+Second derivative+No smoothing	0.993 28	0.018 3	0.072 0
SNV+Spectrum+No smoothing	0.758 41	0.103 0	0.096 9
SNV+First derivative+No smoothing	0.993 77	0.017 7	0.026 4
SNV+Second derivative+No smoothing	0.863 69	0.079 9	0.063 8
MSC+Spectrum+No smoothing	0.955 57	0.046 7	0.048 8
MSC+First derivative+No smoothing	0.996 40	0.013 4	0.034 7
MSC+ Second derivative+No smoothing	0.860 70	0.080 7	0.065 5
Constant+ Spectrum+SG	0.946 78	0.051 0	0.055 2
Constant+First derivative+SG	0.997 63	0.010 9	0.024 4
Constant+Second derivative+SG	0.990 33	0.022 0	0.040 0
SNV+Spectrum+SG	0.758 14	0.103 0	0.097 1
SNV+First derivative+SG	0.991 90	0.020 1	0.023 6
SNV+Second derivative+SG	0.894 81	0.070 8	0.077 2
MSC+Spectrum+SG	0.953 57	0.047 7	0.049 1
MSC+First derivative+SG	0.996 07	0.014 0	0.031 7
MSC+ Second derivative+SG	0.890 76	0.072 0	0.080 9

运用 TQ 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 NIDRS 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, NIDRS 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。结果表明, 以选取 SNV+First derivative+SG 预处理光谱效果最好, 对光谱进行预处理, 所建立的模型评价指标最好, 可以用于建立稳健的模型。预处理后的红外光谱图见图3。

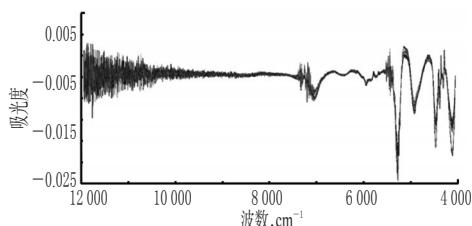


图3 预处理后的红外光谱图

Fig 3 Infrared spectrum after pretreatment

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。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 SNV+First derivative+SG 对不同的波段进行手动优化, 通过 TQ 8.0 分析软件得到最佳波段范围为 $9\ 000\sim 4\ 150\ \text{cm}^{-1}$, 详见表4。

表4 不同波段范围对 R^2 、RMSEC 和 RMSEP 的影响

Tab 4 Effects of different bands on R^2 , RMSEC and RMSEP

建模区间, cm^{-1}	R^2	RMSEC	RMSEP
9 050~4 100	0.992 63	0.019 2	0.032 0
9 030~4 125	0.992 53	0.019 3	0.026 1
9 000~4 150	0.991 90	0.020 1	0.023 6
9 000~4 200	0.991 64	0.020 5	0.027 3
9 000~4 300	0.990 92	0.021 3	0.037 7
9 000~4 190	0.991 47	0.020 7	0.024 2
9 000~4 050	0.996 02	0.014 1	0.036 7
9 000~8 200, 7 700~4 150	0.991 33	0.020 8	0.030 1
9 000~7 000, 6 400~4 150	0.991 25	0.020 8	0.027 0
9 000~5 400, 5 100~4 150	0.992 96	0.018 8	0.020 7

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。采用内部交互验证考察主成分数对 RMSECV 的影响, 并绘制曲线, 详见图4。结果表明, 当偏最小二乘法因子数为 12 时, RMSECV 值最小为 0.076 29, 即最佳建模主成分数为 12。

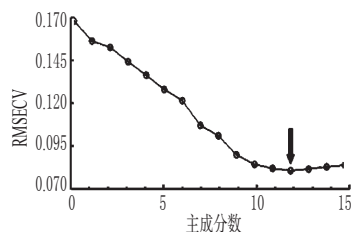


图4 主成分数对 RMSECV 的影响

Fig 4 Effects of main components on RMSECV

2.3.5 定量校正模型的建立 运用 TQ 8.0 分析软件, 以 76 批样品为校正集, 18 批样品为验证集, 采用 SNV+First derivative+SG 对光谱进行预处理, 在 $4\ 150\sim 9\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 波段范围内, 选择 12 个主成分数进行。结果, 用校正集样品进行内部验证, $R^2=0.991\ 90$, RMSEC=0.020 1, RMSEP=0.023 6, RMSECV=0.076 29, 二苯乙烯苷 NIDRS 实测值与预测值的相关图和偏差图见图5。

2.3.6 定量校正模型的验证 选择 18 批样品作为验证集进行外部验证, 将其 NIDRS 输入定量校正模型, 预测二苯乙烯苷含量, 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 NIDRS 预测值与实测值的绝对误差为 $\pm 0.05\%$, 回收率为 $92.67\%\sim 107.88\%$, 相对误差为 $-1.88\%\sim 7.88\%$, 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 NIDRS 预测值进行配对 t 检验, $t=0.437\ 2$, $P=2.110 (>0.05)$, 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。

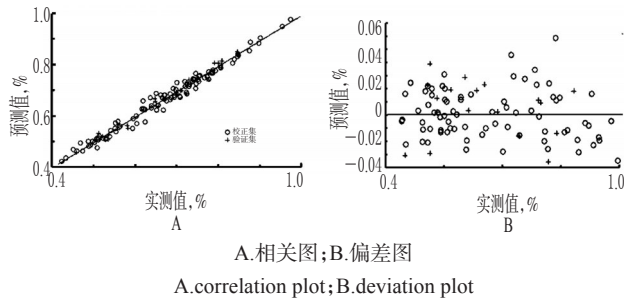


图5 首乌丸 NIDRS 预测值与实测值的相关图和偏差图

Fig 5 Correlation plot and deviation plot for predicted value and measured value of NIDRS of Shouwu pills

表5 17批验证集样品的NIDRS定量校正模型预测值与实测值比较(%)

Tab 5 Comparison of predicted and measured value of quantitative calibration model for NIDRS of 17 batches of validation set(%)

实测值	预测值	绝对误差	相对误差	回收率
0.535 3	0.502 3	-0.033 0	-6.16	93.83
0.625 4	0.656 0	0.030 6	4.89	104.89
0.816 0	0.827 6	0.011 6	1.42	101.42
0.634 4	0.637 6	0.003 2	0.5	100.5
0.588 6	0.609 0	0.020 4	3.46	103.46
0.863 2	0.847 0	-0.016 2	-1.88	98.12
0.908 0	0.927 0	0.019 0	2.09	102.09
0.822 1	0.831 7	0.009 6	1.16	101.17
0.656 5	0.676 4	0.019 9	3.03	103.03
0.553 2	0.555 3	0.002 1	0.38	100.37
0.528 9	0.553 0	0.024 1	4.55	104.56
0.553 1	0.566 2	0.013 1	2.37	102.37
0.764 9	0.746 6	-0.018 3	-2.39	97.61
0.709 6	0.711 6	0.002 0	0.28	100.28
0.470 8	0.436 3	-0.034 5	-7.33	92.67
0.841 3	0.801 2	-0.040 1	-4.77	95.23
0.535 8	0.578 0	0.042 2	7.88	107.88

3 讨论

本课题建立了可用于快速测定首乌丸中二苯乙烯苷含量的NIDRS定量分析模型,该模型参数 R^2 为0.991 90, RMSEC为0.020 1, RMSEP为0.023 6, RMSECV为0.076 29, 模型质量较好。经18批样品进行验证,模型预测结果准确,所建模型可用于快速测定首乌丸中二苯乙烯苷的含量,可为首乌丸生产加工或成品在线检测提供理论参考。NIDRS分析技术作为快速无损的物理检测技术,已成功应用于多种中药指标成分的含量测定^[8-12],因其具有检测速度快、准确性高、稳健性好等

优点,在药物生产加工以及成品在线检测中优势显著。水分含量和二苯乙烯苷含量为评价首乌丸质量的两大重要指标成分,本课题组前期已完成首乌丸中水分含量的近红外光谱定量分析模型的建立^[13],结合本研究,可较为系统地评价首乌丸的质量。

综上所述,本方法准确、稳定、简便,可用于首乌丸中二苯乙烯苷含量的快速测定。

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, 2015:1289-1290.
- [2] 徐广通,袁洪福,陆婉珍. 现代近红外光谱技术及应用进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(2):134-142.
- [3] 蔡丽芬,钟国跃,张倩,等. 不同产地与市场生何首乌和制何首乌的质量评价研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(2):204-208.
- [4] 郭念欣,蔡佳良,姬生国. 近红外光谱技术在陈皮道地性分析中的应用[J]. 中国药房, 2013, 24(15):1394-1396.
- [5] 贾灿潮,卢慧娟,姬生国. NIRS快速测定制何首乌中的水分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(16):52-55.
- [6] 贾灿潮,卢慧娟,黄柳芳,等. 何首乌中2,3,5,4'-二苯乙烯葡萄糖苷的NIRS法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(8):833-836.
- [7] 贾灿潮,卢慧娟,赵红宁,等. NIRS快速测定制何首乌中二苯乙烯苷的含量[J]. 计算机与应用化学, 2015, 32(7):863-866.
- [8] 贾灿潮,卢慧娟,林丹,等. 近红外光谱技术快速测定何首乌中水分的含量[J]. 医药导报, 2015, 12(34):1633-1636.
- [9] 贾灿潮,卢慧娟,刘喜乐,等. NIRS法快速测定制何首乌中醇溶性浸出物的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3):554-558.
- [10] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京:中国石化出版社, 2006:31, 145, 174-193.
- [11] 姬生国,蔡佳良,郑伟龙. 近红外光谱法测定霍胆丸中百秋李醇含量[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(24):2154-2157.
- [12] 郭念欣,蔡佳良,李蕾蕾,等. 运用近红外技术建立蕾香正气胶囊中厚朴酚的定量模型[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8):146-149.
- [13] 龚雪,贾灿潮,赖秀娣,等. 近红外光谱技术快速测定首乌丸水分含量[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(1):61-64.

(收稿日期:2016-12-28 修回日期:2017-04-12)

(编辑:刘柳)