

声光可调-近红外漫反射光谱法快速评价黄芪药材质量^Δ

任绪华^{1*}, 苏婷², 姜文月², 李亚东³, 郑广晶³, 高陆^{2#}(1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 吉林省现代中药工程研究中心有限公司, 长春 130012; 3. 吉林长白山药业集团股份有限公司, 吉林白山 134300)

中图分类号 R978.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)02-0168-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.02.06

摘要 目的: 建立快速评价黄芪药材质量的方法。方法: 采用烘干法测定黄芪药材样品水分含量, 采用高效液相色谱(HPLC)-蒸发光散射检测法(ELSD)测定黄芪甲苷的含量, 采用HPLC法测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量(均作为参考值)。采用声光可调-近红外漫反射光谱法结合偏最小二乘法建立预测黄芪药材中上述指标含量的定量模型(作为预测值)。根据参考值, 采集60批药材样品, 采用一阶导数联合平滑降噪法预处理光谱, 水分、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量预测的最佳波段分别为1 100~2 300、1 080~2 160、1 170~2 230 nm。结果: 药材样品中水分、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定方法学考察符合要求。水分、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷定量模型校正均方根偏差分别为0.132 3、0.006 6、0.002 5, 预测均方根偏差分别为0.237 1、0.016 3、0.004 7, 校正集内部交叉验证相关系数分别为0.975 9、0.953 3、0.968 0; 定量模型内部验证偏差分别为1.43%、1.90%、1.84%, 外部验证偏差分别为1.73%、2.68%、2.71%。结论: 该方法快速、准确、简便、无污染, 可用于黄芪药材质量的快速评价。

关键词 近红外漫反射光谱法; 声光可调; 黄芪; 水分; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

Rapid Quality Evaluation of Astragali Radix by AOTF-NIR

REN Xuhua¹, SU Ting², JIANG Wenyue², LI Yadong³, ZHENG Guangjing³, GAO Lu²(1. College of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China; 2. Jilin Modern Chinese Medicine Engineering and Research Center Co., Ltd., Changchun 130012, China; 3. Jilin Changbai Mountain Pharmaceutical Group Co., Ltd., Jilin Baishan 134300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for rapid quality evaluation of Astragali Radix. METHODS: The moisture of medicinal material was determined by oven drying method; the content of astragaloside IV was determined by HPLC-ELSD; the content of isoflavone glucoside was determined by HPLC (as reference value). The partial least squares (PLS) method combined with acousto-optic turnable filter-NIDRS was adopted to build quantitative model of above indexes in Astragali Radix (as predict value). According to reference value, 60 batches of sample were collected. The spectra pretreatment was conducted by first derivative method combined with Savitzky golay. The optimal bands of moisture, astragaloside IV and isoflavone glucoside were 1 100-2 300 nm, 1 080-2 160 nm, 1 170-2 230 nm, respectively. RESULTS: The content determination of moisture, astragaloside IV and isoflavone glucoside in samples were all in line with methodology requirements. The corrected mean square root deviation of quantitative model for moisture, astragaloside IV, calycosin glucoside were 0.132 3, 0.006 6, 0.002 5, respectively; predicted mean square root deviation were 0.237 1, 0.016 3, 0.004 7; internal cross validation coefficient of correction set were 0.975 9, 0.953 3, 0.968 0; internal verification deviation of quantitative model were 1.43%, 1.90%, 1.84%; external verification deviation were 1.73%, 2.68%, 2.71%, respectively. CONCLUSIONS: The method is rapid, accurate, simple, pollution-free, and can be used for rapid quality evaluation of Astragali Radix.

KEYWORDS NIDRS; Acousto-optic turnable filter; Astragali Radix; Moisture; Astragaloside IV; Isoflavone glucoside

中药材在采购、验收、入库、投料过程中存在着质量检测程序繁杂、费时长等问题, 不能满足大批量的现场快速分析要求。为解决该问题, 有必要研发涵盖水分、浸出物、特征性成分等不同检测项目的快速检测方法作

为企业内部质量控制标准。

近红外漫反射光谱法(NIR)作为一种快速分析方法, 具有很多优点, 如快速、无损、环保, 并可对固体、液体和气体样品直接进行测定, 无需复杂的前处理过程^[1]。随着仪器与软件的发展, NIR法已广泛应用于农业、生物医学、石油化工等领域^[2-4]。

黄芪药材为豆科植物蒙古黄芪[Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge. var. mongholicus (Bge.) Hsiao]或膜荚黄芪[A. membranaceus (Fisch.) Bge.]的干燥根, 化学

^Δ 基金项目: 国家中药标准化项目(No.ZYBZH-C-JL-26); 吉林省科技发展计划项目(No.20150301009YY、YYZX201503)

* 硕士研究生。研究方向: 中药药剂。E-mail: 82899336@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 中药药剂。电话: 0431-89255164。E-mail: bxgl@163.com

成分以皂苷和黄酮类化合物为主,具有调节免疫功能、促进造血功能等作用^[6],是多种中成药的主要原药材之一。本研究中,笔者以黄芪药材样品中水分、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷为指标,应用声光可调(AOTF)-NIR法结合偏小二乘法(PLS)^[6],建立了快速通用的多指标测定方法,旨在为中药材整体质量的快速评价提供借鉴。

1 材料

1.1 仪器

Luminar-5030 型 NIR 仪,包括样品旋转台、石英样品杯、SNAP 光谱分析软件、CAMO 化学计量学软件(美国 Brimrose 公司);U3000 型高效液相色谱(HPLC)仪(美国 Thermo 公司);The Unscrambler 软件(挪威 CAMO 公司);L-3000 型 HPLC 仪,包括 L-3530 型蒸发光散射检测器(ELSD)(北京普源精电科技有限公司);GZX-9070 MBE 型鼓风干燥箱(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司);AB135-S 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 试剂

黄芪甲苷对照品(批号:110781-201515,纯度:>93%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号:111920-201505,纯度:>97.1%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

60 批黄芪药材来源于内蒙古、山西、甘肃、辽宁、黑龙江等省区,由吉林省现代中药工程研究中心有限公司提供,经长春中医药大学李焕荣教授鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 参考值的测定

2.1.1 水分含量测定 取药材样品粉末(过 4 号筛)约 3 g,平铺于干燥至恒质量的扁形称量瓶中,厚度不超过 5 mm,精密称定,开启瓶盖在 100~105 °C 干燥 5 h;将瓶盖盖好,置于干燥器中,放冷 30 min,精密称定,再在上述温度下干燥 1 h;放冷,称定质量,重复至连续两次质量差异不超过 5 mg 为止。根据减失的质量,可知药材样品中含水量。结果,药材样品中水分含量为 5.11%~9.38%,详见表 1。

2.1.2 黄芪甲苷含量测定 (1)色谱条件。色谱柱:Shimadzu-GL C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(32:68,V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:40 °C;进样量:20 μL。色谱见图 1。(2)对照品溶液的制备。精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成黄芪甲苷质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液。(3)供试品溶液的制备。取药材样品粉末(过 4 号筛)约 4 g,精密称定,置于索氏提取器中,精密加甲醇 40 mL,冷浸过夜,再加甲醇适量,加热回流 4 h;回收溶剂并浓缩至干,残渣加水 10 mL,微热使溶解,用水饱和正丁醇振摇提取 4 次,每次 40 mL,合并正丁醇液;用氨试液充分洗涤 2 次,每次 40 mL,弃去氨

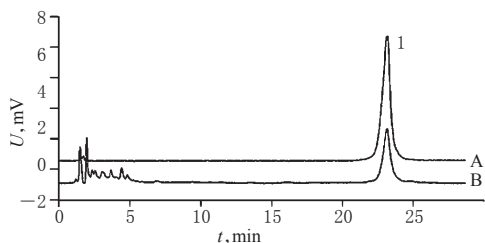
表 1 药材样品指标测定结果(n=3,%)

Tab 1 Content determination results of indicator in the medicinal materials(n=3,%)

批号	水分	黄芪甲苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	批号	水分	黄芪甲苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷
140301	8.08	0.188 4	0.059 9	150206	6.86	0.184 3	0.046 3
140302	8.39	0.104 3	0.047 2	150207	7.63	0.244 6	0.058 2
140303	6.05	0.200 1	0.048 5	150208	8.43	0.225 6	0.054 9
140304	7.83	0.166 0	0.030 3	150209	7.83	0.193 8	0.026 7
140305	5.84	0.180 7	0.060 4	150210	6.92	0.085 3	0.034 6
140306	7.39	0.183 7	0.007 7	153500	6.24	0.176 8	0.047 6
140307	6.71	0.160 9	0.019 3	153501	6.31	0.106 3	0.103 2
140308	7.03	0.289 8	0.031 6	153502	7.84	0.106 6	0.037 7
140309	6.73	0.185 6	0.045 9	153503	5.73	0.203 3	0.164 5
140310	7.19	0.086 9	0.056 7	153504	5.16	0.165 1	0.135 7
140311	8.27	0.178 3	0.047 9	153505	8.38	0.182 8	0.211 3
140312	7.91	0.108 4	0.056 7	153506	7.45	0.185 4	0.158 3
140401	6.61	0.105 0	0.058 6	153507	9.24	0.186 6	0.174 6
140402	6.13	0.090 0	0.025 3	153508	9.09	0.102 7	0.057 3
140403	6.27	0.157 5	0.031 4	153509	8.38	0.033 8	0.046 8
140404	7.90	0.188 5	0.048 1	153510	8.03	0.054 3	0.046 2
140405	7.53	0.274 9	0.031 2	153602	8.26	0.063 9	0.033 7
140406	8.93	0.186 5	0.027 5	153603	6.31	0.045 7	0.025 5
140407	7.85	0.246 0	0.053 6	153604	7.92	0.066 9	0.025 2
140408	8.41	0.224 7	0.025 6	153605	5.67	0.207 3	0.068 3
140409	9.38	0.190 1	0.020 5	153606	7.44	0.084 6	0.046 5
150201	8.69	0.208 7	0.039 3	153607	6.81	0.161 2	0.062 2
150202	7.94	0.140 0	0.043 5	153608	6.97	0.284 9	0.008 6
150201	5.65	0.068 1	0.100 9	153609	7.46	0.184 7	0.018 4
150202	5.11	0.209 4	0.059 3	160201	8.84	0.202 6	0.032 4
160201	5.95	0.118 1	0.060 6	160202	8.32	0.052 8	0.163 8
150202	6.18	0.150 4	0.048 9	160203	7.27	0.036 6	0.136 6
150203	7.56	0.198 4	0.010 7	160204	9.11	0.057 2	0.210 4
150204	6.15	0.251 0	0.057 2	160205	9.14	0.062 7	0.159 7
150205	6.59	0.073 3	0.052 9	160206	8.46	0.046 3	0.176 2

液,正丁醇液蒸干,残渣加水 5 mL 使溶解,放冷;通过 D101 型大孔树脂(内径为 1.5 cm,柱高为 12 cm),以水 50 mL 洗脱,弃去水液,再用 40% 乙醇溶液 30 mL 洗脱,弃去洗脱液,继续用 70% 乙醇溶液 80 mL 洗脱;收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。(4)方法学考察。按相关标准进行方法学考察。结果,精密度、稳定性、重复性试验中黄芪甲苷峰面积的 RSD 均小于 1.8%,表明仪器精密度、溶液稳定性、方法重复性均较好。(5)药材样品中黄芪甲苷含量测定。取 60 批药材样品各适量,按“(3)”项下方法制备供试品溶液,再按“(1)”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算药材样品中黄芪甲苷的含量。结果,药材样品中黄芪甲苷含量为 0.033 8%~0.289 8%,详见表 1。

2.1.3 毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定 (1)色谱条件。色谱柱:Shimadzu-GL C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2% 甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min,20% A→40% A;20~30 min,40% A);流速:1.0 mL/min;

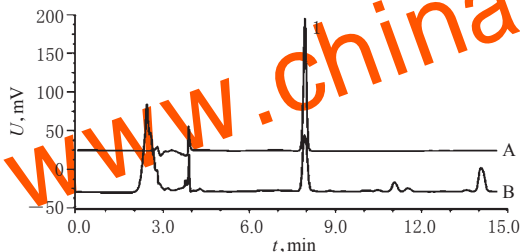


注:A. 对照品;B. 供试品;1. 黄芪甲苷
Note: A. substance control; B. test sample; 1. astragaloside IV

图1 黄芪甲苷的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of astragaloside IV

检测波长:260 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。色谱见图2。(2)对照品溶液的制备。精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量,加甲醇制成毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量浓度为50 μg/mL的对照品溶液。(3)供试品溶液的制备。取药材样品粉末(过4号筛)约1 g,精密称定,置于圆底烧瓶中,精密加甲醇50 mL,称定质量,加热回流4 h,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过;精密量取续滤液25 mL,回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,移至5 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。(4)方法学考察。按相关标准进行方法学考察。结果,精密度、稳定性、重复性试验中毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积的RSD均小于1.3%,表明仪器精密度、溶液稳定性、方法重复性均较好。(5)药材样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定。取60批药材样品各适量,按“(3)”项下方法制备供试品溶液,再按“(1)”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算药材样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量。结果,药材样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量为0.007 7%~0.211 3%,详见表1。



注:A. 对照品;B. 供试品;1. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷
Note: A. substance control; B. test sample; 1. isoflavone glucoside

图2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of isoflavone glucoside

2.2 NIR定量模型建立与验证

2.2.1 NIR的采集 采样方式:样品杯固体采样。采集条件:扫描间隔2 nm,扫描范围为1 000~2 500 nm,扫描300次^[7]。每批药材样品采集3张光谱,计算平均光谱以建立模型,每次扫描前振荡样品杯。药材样品的装样厚度、装填的紧密性和颗粒均匀性等都在试验中都力求一致,以减小对结果的影响。60批药材样品的近红外光谱叠加图见图3。

2.2.2 校正集和验证集样品的选择 根据“2.1”项下水分、黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量分布情况,从

60批药材样品中选取一定数量组成校正集,用于建立NIR模型;其余药材样品组成验证集,用于验证模型,详见表2。

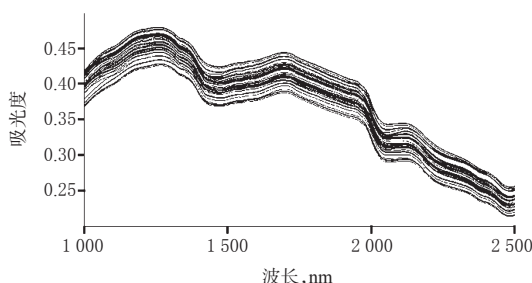


图3 60批药材样品的近红外光谱叠加图

Fig 3 Near infrared spectrum superposition diagram of 60 batches of samples

表2 校正集与验证集药材样品指标分布范围

Tab 2 Distribution range of indicator of samples in correction set and validation set

分集	水分		黄芪甲苷		毛蕊异黄酮葡萄糖苷	
	样品数,批	含量,%	样品数,批	含量,%	样品数,批	含量,%
校正集	55	5.11~9.38	55	0.033 8~0.289 8	55	0.007 7~0.211 3
验证集	5	7.27~9.14	5	0.036 6~0.062 7	5	0.136 6~0.210 4

2.2.3 光谱预处理方法的选择 NIR的采集容易受颜色、药材样品颗粒大小等影响,以致基线漂移和平移,因此必须对原始光谱进行预处理^[8]。常用的预处理方法有多元散射校正法(Multiple scatter correction, MSC)、标准归一化法(Standard normal variate, SNV)、一阶导数法(First derivative, FD)、二阶导数法(Second derivative, SD)、平滑降噪法(Savitzky golay, SG)^[9]等。通过采用不同预处理方法可得不同的校正集内部交叉验证相关系数(R^2)和校正均方根偏差(RMSEC),详见表3。

表3 不同光谱预处理方法对定量模型性能的影响

Tab 3 Effects of different spectrum pretreatment methods on the performance of quantitative model

预处理方法	水分		黄芪甲苷		毛蕊异黄酮葡萄糖苷	
	R^2	RMSEC	R^2	RMSEC	R^2	RMSEC
MSC	0.767 5	4.376 2	0.647 1	1.832 3	0.623 4	3.874 3
SNV	0.803 4	2.293 7	0.738 2	1.773 7	0.746 9	2.022 6
FD	0.887 6	1.968 3	0.823 6	1.372 6	0.837 7	1.721 1
SD	0.689 3	3.834 6	0.536 7	2.316 2	0.567 3	5.214 8
SNV+SG	0.892 1	2.030 1	0.843 7	0.976 3	0.850 2	1.213 3
FD+SG	0.922 7	1.598 2	0.912 1	0.371 9	0.901 5	0.832 7
SD+SG	0.759 4	3.893 4	0.632 8	1.926 4	0.674 6	3.034 7

运用The Unscrambler软件对表1数据进行处理,以PLS法建立NIR定量分析模型。选择 R^2 、RMSEC为评价指标,综合评价不同模型的准确性与适用性。其中, R^2 越接近1,NIR预测值与参考值相关性越好;RMSEC越小,所建定量分析模型适用性越强、预测效果越好^[10]。结果表明,以FD+SG法预处理效果最好,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得NIR,详见图4。

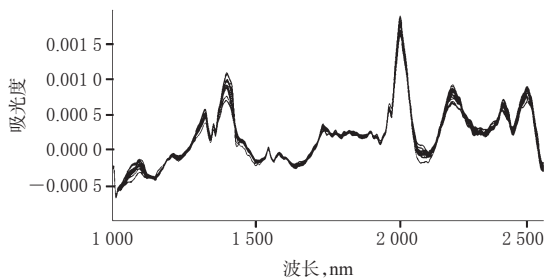


图4 预处理后的近红外光谱

Fig 4 Near infrared spectrum after pretreatment

2.2.4 建模波段的选择 建模波段要求在包含药材样品大量信息的同时避免冗余信息,降低噪声干扰。采用FD+SG法对不同的波段进行手动优化比较,通过The Unscrambler软件分析得到水分含量预测最佳波段为1 100~2 300 nm,黄芪甲苷含量预测最佳波段为1 080~2 160 nm,毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量预测最佳波段为1 170~2 230 nm,详见表4。

表4 不同波段对定量模型的影响

Tab 4 Effects of different bands on performance of the quantitative model

指标	波段, nm	R ²	RMSEC
水分	1 000~2 400	0.923 7	0.276 8
	1 100~2 300	0.975 9	0.132 3
黄芪甲苷	1 080~2 160	0.953 3	0.006 6
	1 290~2 430	0.908 4	1.233 4
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	1 050~2 450	0.911 5	0.632 7
	1 170~2 230	0.968 0	0.002 5

2.2.5 定量模型的建立 运用The Unscrambler软件对校正集55批药材样品进行建模,对光谱采用FD+SG法预处理,在“2.2.4”项下波段内对3个指标进行建模。结果,预测值与参考值的相关性较高,且结果很接近,表明该模型的性能较好,可以用于黄芪药材中多指标的定量分析。校正集样品NIR模型见图5。

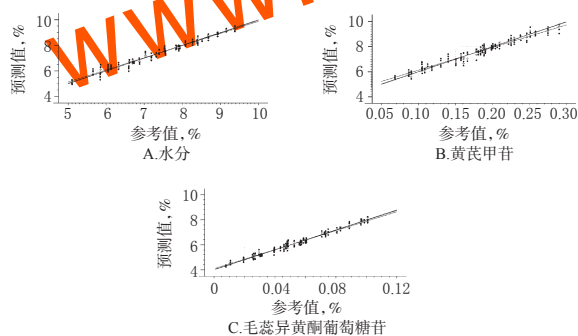


图5 校正集样品NIR模型

Fig 5 Correction set sample NIR model

2.2.6 定量模型的验证 选择校正集和验证集样品分别进行内部验证和外部验证,将其NIR输入定量模型,预测各指标含量,再与含量测定参考值进行比较,计算偏差,结果见表5(注:表中RMSEP为预测均方根偏差)。

表5 定量模型验证结果

Tab 5 Results of quantitative model verification

指标	校正模型			验证偏差	
	R ²	RMSEC	RMSEP	内部, %	外部, %
水分	0.975 9	0.132 3	0.237 1	1.43	1.73
黄芪甲苷	0.953 3	0.006 6	0.016 3	1.90	2.68
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.968 0	0.002 5	0.004 7	1.84	2.71

3 讨论

本试验利用AOTF-NIR法建立了快速测定黄芪药材中水分、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的分析方法,选用各指标的特征光谱区间,并根据不同分析对象优选出合适的预处理方法,对NIR原始光谱进行预处理,进而采用PLS法建立了各指标含量的NIR定量模型。

结果表明,本方法快速、准确、简便、无污染,可用于黄芪药材质量的快速评价。虽然NIR法的准确度不及HPLC法,但因其上述特点,能满足工业生产中大批量采集药材样品化学信息的需求,适用于快速测定药材中多指标含量,可与法定标准一起构建准确、便捷、普适性强的中药材整体质量快速评价方法体系,对保障最终制剂产品质量的稳定可控具有重要意义。

参考文献

- [1] 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): 261-264.
- [2] 褚小立,陆婉珍. 近五年我国近红外光谱分析技术研究与应用进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(10): 2595-2605.
- [3] 周昭露,李杰,黄生权,等. 近红外光谱技术在中药质量控制应用中的化学计量学建模:综述和展望[J]. 化工进展, 2016, 35(6): 1627-1645.
- [4] 卢福洁,狄艳全. 近红外光谱分析技术在油品领域的应用[J]. 中国设备工程, 2012(12): 9-10.
- [5] 高月颖. 黄芪的药理作用及临床应用分析[J]. 中国医药指南, 2016, 14(28): 194-195.
- [6] 洗瑞仪,黄富荣,黎远鹏,等. 可见和近红外透射光谱结合区间偏最小二乘法(iPLS)用于橄榄油中掺杂煎炸老油的定量分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(8): 2462-2467.
- [7] 苏婷,李亚东,郑广品,等. AOTF-NIR快速检测丹参中丹参酮I含量的新方法[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(68): 196-197.
- [8] 王动民,纪俊敏,高洪智. 多元散射校正预处理波段对近红外光谱定标模型的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(9): 2387-2390.
- [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] 周文婷. 巴戟天近红外光谱的研究[D]. 广州: 广东药学院, 2015.

(收稿日期:2017-04-22 修回日期:2017-06-16)

(编辑:张静)