

陈皮中橙皮苷的近红外光谱定量模型的建立[△]

郭念欣*, 蔡佳良, 黄洁燕, 李蕾蕾, 姬生国[#](广东药学院中药学院, 广州 510006)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2932-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.18

摘要 目的:建立陈皮中橙皮苷的近红外光谱定量模型,快速测定陈皮中橙皮苷的含量。方法:采用高效液相色谱法测定213批陈皮中橙皮苷的含量;采集所有样品的近红外光谱,并用一阶导数预处理,结合偏最小二乘法建立橙皮苷的定量模型。结果:校正模型的内部交叉验证决定系数(R^2)达到0.931 98,校正均方差为1.009 85,预测均方差为0.948,主成分数为9;44批验证集样品的平均预测回收率为101.08%。结论:所建立的近红外光谱定量模型稳定、准确、可靠,可快速测定陈皮中橙皮苷的含量。

关键词 近红外光谱法;陈皮;橙皮苷;定量模型;化学计量学;高效液相色谱法

Quantitative Model for Hesperidin Content in *Citrus reticulata* by NIR Spectroscopy

GUO Nian-xin, CAI Jia-liang, HUANG Jie-yan, LI Lei-lei, JI Sheng-guo (School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop NIR quantitative analysis model of hesperidin and a method for the determination of hesperidin in *Citrus reticulata*. METHODS: The content of in 213 batches of *C. reticulata* were determined by HPLC. NIR spectrograms were measured, and the first derivative of Savitsky-Golay was used as spectral preprocessing options, and calibration model of hesperidin was established by the partial least squares regression analysis. RESULTS: Correlation coefficients (R^2), root-mean-square error of calibration and root-mean-square error of prediction for hesperidin were 0.931 98, 1.009 85, 0.948. There were 9 principal components and average recoveries of 44 batches of validation set were 101.08%. CONCLUSIONS: The method is steady, accurate and reliable, and can be used for the content determination of hesperidin in *C. reticulata*.

KEY WORDS NIR spectroscopy; *Citrus reticulata*; Hesperidin; Quantification model; Stechiometry; HPLC

近年来,近红外光谱技术在药物活性组分的定量分析方面得到了广泛应用。每种物质在近红外区域都有丰富的吸收光谱,每种成分都有特定的吸收特征,这就是近红外光谱技术定性或定量分析物质组成成分的基础^[1]。此技术以快速、方便、适应在线分析和无损分析的特点,在药物定性、定量分析中已经得到了广泛的重视和应用^[2-3]。本课题组首次采用该技术对具有岭南特色的中药材陈皮进行研究,并建立陈皮有效成分橙皮苷的近红外光谱定量模型,以探索陈皮快速、无损的质量评价新方法。

陈皮(*Citri Reticulatae Pericarpium*)为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮,药材分为“陈皮”和“广陈皮”^[4],用于胸脘胀满、食少吐泻、咳嗽痰多等证的治疗。现代研究表明,陈皮具有抗氧化、抗炎、增强毛细血管韧性、维持血管正常渗透压、降血脂、保护心血管、抗肿瘤等多种功效^[5-7]。笔者对213批陈皮药材中的有效成分橙皮苷的含量进行测定,并采集其近红外光谱数据,利用TQ8.0分析软件进行处理,建立陈皮中橙皮苷的近红外光谱定

量模型。

1 材料

1.1 仪器

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TQ8.0分析软件(美国Thermo公司);1120型自动进样液相色谱仪(美国Agilent公司)。

1.2 试剂

橙皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111571-200604);甲醇为色谱纯,水为超纯水。

1.3 药材

陈皮于2009年10月至2010年11月分别采集于广东新会等地的种植及栽培基地,213批样品均经广东药学院中药学院姬生国教授鉴定为芸香科植物橘 *C. reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮。

2 方法

2.1 橙皮苷的含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Kromasil ODS

[△]基金项目:广东省科技计划项目(No.2009B030801044)

*硕士研究生。研究方向:中药质量评价。电话:020-39352327。

E-mail:392825983@foxmail.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发。电话:020-39352327。E-mail:shengguo_ji@163.com

本栏目协办

江阴天江药业有限公司

地址:江苏省江阴市经济开发区秦望山路8号 电话:400 066 9211
传真:0510-86409611 网址:<http://www.tianjiang.com>

柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-醋酸-水(35:4:61, V/V/V);检测波长:283 nm;柱温:30 ℃;流速:1 ml/min;进样量:10 μl。理论板数按橙皮苷峰计算应不低于2 000;橙皮苷峰保留时间约为12 min。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品6.2 mg,加甲醇溶解并稀释,制成每1 ml含橙皮苷0.62 mg的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取陈皮粗粉约1.000 g,精密称定,置索氏提取器中,加石油醚(60~90 ℃)80 ml,加热回流2~3 h,弃去石油醚,药渣挥干,加甲醇80 ml,再加热回流至提取液无色,放冷,滤过,滤液置100 ml量瓶中,用少量甲醇分数次洗涤容器,洗液滤入同一量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,精密吸取1 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,即得供试品溶液。

2.1.4 标准曲线的制备 分别精密吸取对照品溶液2.0、2.0、1.0、1.0、2.0、1.0、1.0 ml,分别加入甲醇定容至2.5、5、10、25、25、50 ml,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得橙皮苷的回归方程为 $y=30\,000\,000x+50\,043$ ($r=0.999\,9, n=7$)。结果表明,橙皮苷的质量浓度在0.012 4~0.620 0 mg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.1.5 样品含量测定 精密吸取上述对照品溶液和供试品溶液各10 μl ($n=5$),分别按上述色谱条件进样测定,记录20 min内的色谱图(见图1),并计算得到213批陈皮样品中橙皮苷的质量分数为1.99%~10.79%。

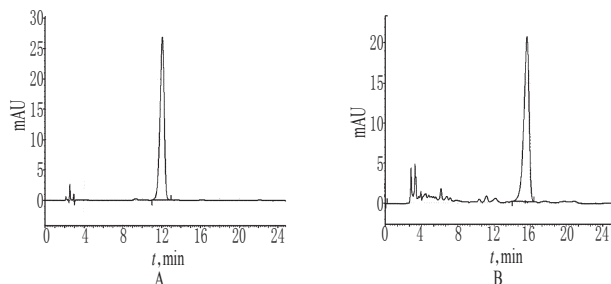


图1 高效液相色谱图

A.橙皮苷对照品;B.供试品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. hesperidin control; B. test sample

2.2 近红外光谱采集

将收集到的213批陈皮样品晒干后粉碎,过100目筛,混合均匀,取约5 g,置于石英样品杯中,以空气为参照对比,按下述试验条件进行扫描:采用积分球漫反射测样,分辨率为 8 cm^{-1} ,扫描64次,扫描范围为 $12\,000\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$,温度为 $(25\pm 2)\text{ ℃}$,相对湿度为40%~45%。每批样品重复装样并扫描5次,求平均光谱。213批陈皮样品的近红外光谱叠加图见图2。

3 结果与分析

3.1 光谱预处理

采用偏最小二乘法(PLS)建立定量分析模型,以内部交叉验证决定系数(R^2)、校正均方差(RMSEC)、预测均方差(RMSEP)为综合指标,考察不同预处理方法和不同波段对模

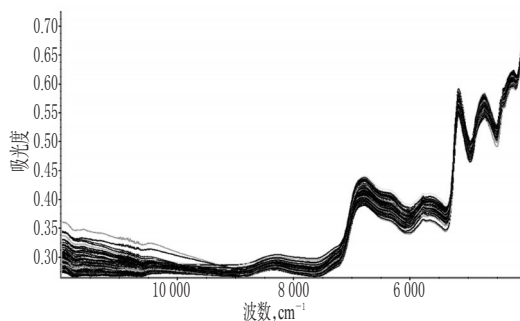


图2 213批陈皮样品的近红外光谱叠加图

Fig 2 NIRS spectra corresponding to 213 samples of *C. reticulata*

型建立的影响。其中, R^2 越接近1,说明样品化学值与近红外预测值相关性越好;RMSEC、RMSEP越小,说明模型预测性能越好^[8]。最终确定最佳预处理方法为一阶导数法(First derivative);建模波段为 $10\,000\sim5\,580\text{ cm}^{-1}$ 、 $5\,160\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$ 。不同预处理方法、不同波段对模型建立的影响分别见表1、表2。

表1 不同预处理方法对模型建立的影响

Tab 1 The influence of different pretreatment methods on the model

方法	R^2	RMSEC	RMSEP
无(Constant)	0.800 31	1.089 81	1.250
多元散射校正法(MSC)	0.784 83	1.097 96	1.250
标准归一化法(SNV)	0.791 59	1.091 04	1.260
First derivative	0.931 98	1.009 85	0.948
MSC+ First derivative	0.912 83	1.039 68	1.020
SNV+ First derivative	0.918 02	1.045 40	0.981

表2 不同波段对模型的影响

Tab 2 The influence of spectra wavelength on the model

波长, cm^{-1}	R^2	RMSEC	RMSEP
10 000~4 000	0.906 92	1.025 53	1.03
5 580~5 160	0.785 23	1.077 17	1.25
10 000~5 580	0.870 65	1.011 19	1.07
5 160~4 000	0.812 12	1.069 28	1.27
10 000~5 580, 5 160~4 000	0.931 98	1.009 85	0.95

3.2 主成分数的选定

以校正集内部交叉验证均方差(RMSECV)为优化参数, RMSECV越小,表示模型的预测精度越高。试验结果表明,选取主成分数为9时, RMSECV最小,因此最佳主成分数定为9。RMSECV值随主成分数的变化见图3。

3.3 校正模型的建立与验证

以交互验证法将所有样品按橙皮苷含量高低排序,均匀选择169批样品作为校正集,44批样品作为验证集^[9]。按“3.1”项下最佳预处理方法、建模波段与“3.2”项下最佳主成分数建立模型,得本模型 $R^2=0.931\,98$, RMSEC=1.009 85, RMSEP=0.948,主成分数为9。以预测值与化学值的比值为预测回收率,得到44批验证集样品的平均预测回收率为101.08%。所有样品化学值与预测值的相关图见图4;44批验证集样品的平均预测回收率见表3。

4 讨论

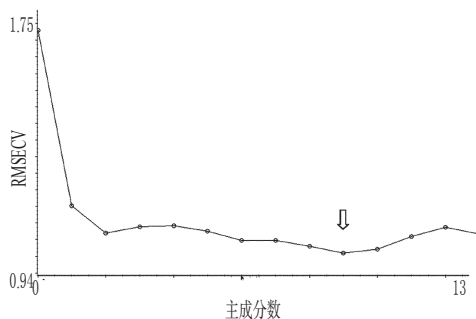


图3 RMSECV值随主成分数的变化

Fig 3 The trend plot of RMSECV following different principal components

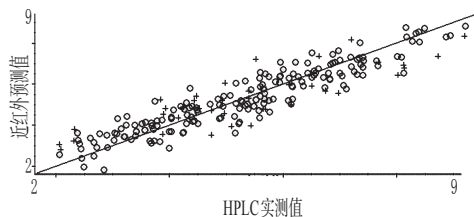


图4 所有样品化学值与预测值的相关图

Fig 4 Relationship between reference and predictive values of all samples

表3 44批验证集样品的平均预测回收率

Tab 3 Average recoveries of 44 batches of validation set

编号	化学值,%	预测值,%	绝对偏差	平均回收率,%
1	2.45	2.39	-0.06	
2	2.45	2.39	-0.06	
3	2.72	2.92	0.20	
4	3.72	3.80	0.08	
5	3.41	3.49	0.08	
6	3.89	3.58	-0.31	
7	4.16	4.37	0.21	
8	4.16	4.37	0.21	
9	4.41	4.18	-0.23	
10	4.43	5.22	0.79	
11	4.93	5.20	0.27	
12	4.94	4.93	-0.01	
13	5.17	5.06	-0.11	
14	5.39	5.31	-0.08	
15	5.50	5.26	-0.24	
16	5.53	7.20	1.67	
17	5.65	5.76	0.11	
18	5.67	5.54	-0.13	
19	5.67	5.54	-0.13	
20	5.68	4.77	-0.91	
21	5.73	5.99	0.26	101.08
22	5.81	6.37	0.56	
23	5.84	5.91	0.07	
24	5.94	6.38	0.44	
25	6.02	5.72	-0.30	
26	6.03	5.95	-0.08	
27	6.11	5.99	-0.12	
28	6.15	6.06	-0.09	
29	6.16	6.07	-0.09	

续表3

Continued tab 3

编号	化学值,%	预测值,%	绝对偏差	平均回收率,%
30	6.17	5.86	-0.31	
31	6.18	6.51	0.33	
32	6.19	6.50	0.31	
33	6.31	6.07	-0.24	
34	6.31	6.49	0.18	
35	6.33	5.43	-0.90	
36	6.42	6.74	0.32	
37	6.63	7.36	0.73	
38	6.84	6.93	0.09	
39	6.98	5.56	-1.42	
40	7.20	8.15	0.95	
41	7.41	7.30	-0.11	
42	7.48	7.36	-0.12	
43	7.59	8.42	0.83	
44	8.49	8.72	0.23	

本研究通过近红外光谱学结合化学计量学对陈皮中橙皮苷含量进行线性拟合,从而建立了橙皮苷的定量分析模型。验证集的预测值准确,表明所建模型稳定、可靠、预测精度较高,再次肯定了近红外分析方法稳定、快速、准确的特征。

由于陈皮的贮藏年份不同、产地不同,其中橙皮苷的含量也存在高低不同。但本研究样品的选择符合2010年版《中国药典》(一部)中陈皮药材的质量标准要求,因此所建近红外光谱定量模型中充分包含了影响样品品质的各个因素,具有广泛性和代表性,涵盖的信息量大,故本定量模型可作为陈皮品质评价的依据。

参考文献

- [1] 严衍禄,张录达,景茂,等.傅里叶变换近红外漫反射光谱分析应用基础的研究[J].北京农业大学学报,1990,16(增刊):5.
- [2] 严衍禄.近红外光谱分析基础与应用[M].北京:中国轻工业出版社,2005:175.
- [3] 田华,黄开合,袁胜浩.近红外光谱技术及其在中药质量分析中的应用[J].中国药房,2011,22(3):281.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:132.
- [5] 邵湘宁,刘庆林.陈皮药对的临床应用[J].湖南中医杂志,2004,30(3):33.
- [6] 张志海,王彩云,杨天鸣,等.陈皮的化学成分及药理作用研究进展[J].西北药学杂志,2005,20(1):471.
- [7] 李红芳,李丹明,瞿颂义,等.枳实和陈皮对兔离体主动脉平滑肌条作用机理探讨[J].中成药,2001,23(9):6581.
- [8] 陆婉珍.现代近红外光谱分析技术[M].2版.北京:中国石化出版社,2007:430-441.
- [9] 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,2009:138.

(收稿日期:2012-09-01 修回日期:2012-11-21)