

怀地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷含量快速分析模型的建立

耿晓桐¹, 王丰青², 谢彩侠^{1*}, 陶晓赛¹, 李雅静¹, 雷敬卫¹

¹河南中医药大学, 郑州 450046; ²河南农业大学, 郑州 450000

摘要:本文旨在建立地黄叶片中总环烯醚萜苷及苯乙醇苷定量分析模型。利用紫外-可见分光光度法测定不同种植地黄生育期内的128份地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷的含量,并将其作为基础值,结合地黄叶片的近红外光谱图,利用TQ8.0分析软件结合偏最小二乘法(PLS),分别建立地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷的定量分析模型。地黄叶片中总苯乙醇苷定量校正模型决定系数(R^2)为0.998 2,校正均方根偏差($RMSEC$)为0.089 9,预测均方决定差($RMSEP$)为0.142,交叉验证均方根偏差($RMSECV$)为0.707 2;总环烯醚萜苷定量校正模型的内部交叉验证决定系数(R^2)为0.972 1,校正均方差($RMSEC$)为0.259,预测均方决定差($RMSEP$)为0.095 4,交叉验证均方根偏差($RMSECV$)为0.869 4。预测值与实测值差异无统计学意义。该定量模型可用于怀地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷含量的快速测定。

关键词:怀地黄;近红外光谱法;总环烯醚萜苷;总苯乙醇苷;快速测定

中图分类号:R284.1; R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0786-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.008

Establishment of rapid analytical models for total iridoid glycosides and total phenethyl alcohol glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa*

GENG Xiao-tong¹, WANG Feng-qing², XIE Cai-xia^{1*}, TAO Xiao-sai¹, LI Ya-jing¹, LEI Jing-wei¹

¹Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

²Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China

Abstract:This paper aimed to establish a quantitative analysis model for total iridoid glycosides and phenylethanoid glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa*. The content of total iridoid glycosides and phenylethanoside in 128 samples of *Rehmannia glutinosa* leaves with different texture and different growth stages were determined by UV-Vis spectrophotometry, and it was used as the base value, combined with the near infrared spectra of leaves of *Rehmannia glutinosa*. The quantitative analysis models of total iridoid glycosides and phenylethanoside in leaves of *Rehmannia glutinosa* were established by using TQ 8.0 analysis software and partial least squares (PLS). The internal cross validation determination coefficient (R^2) was 0.998 19, the correction mean variance ($RMSEC$) was 0.089 9, the root mean determination coefficient (R^2) and the correction mean variance ($RMSEC$) of the quantitative calibration model for total iridoid glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa* were 0.972 1 and 0.125 9 respectively. The root mean square error predication was 0.095 4 and the root mean square error of cross validation($RMSECV$) was 0.869 4. There was no significant difference between the predicted value and the actual value. The quantitative model can be used to determine the content of total iridoid glycosides and total phenylethanol glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa*.

Key words:*Rehmannia glutinosa*; near-infrared spectroscopy; total iridoid glycosides; total phenylethanoid glycosides; rapid determination

地黄栽培历史最长,俗称“怀地黄”,为我国“四大怀药”之一,也是我国具有特殊地理标志的常用大宗药材之一。

地黄中主要含有环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、紫罗兰酮类、糖类等化合物,地黄叶片作为地黄植株重要的部位,在地黄整个生长发育期内的生物量较高,而且含有多种化学成分^[2]。研究表明,地黄叶片中部分苯乙醇苷和环烯醚萜苷类成分含量高于地黄块根^[3,4],作为商品药材,地黄叶被收载于1988年版《北京市中药材标准》^[5]。近几年,随着地黄的临床应用和研究的不断深入,地黄在方剂中的使用频率明显增多。另外,由于市场上具有清凉滋补的地黄保健食品的开发,使地黄的市场需求量不断增加,但由于地黄的连作障碍和土地资源有限等原因导致地黄资源相对紧缺,因此地黄叶的开发利用开始逐渐被研究者所关注。

中药药效的发挥往往是多个有效部位群整体协同作用的结果,总环烯醚萜苷和总苯乙醇苷作为地黄中重要的两类有效成分^[6],其含量的高低在一定程度上可以反映地黄叶片质量的优劣,因此建立一种可以快速检测总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷含量的方法对于地黄叶片的质量评价及资源利用具有重要的意义。目前常规测定中药中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷含量所采用的方法有紫外可见分光光度法、HPLC法^[7,8]、UPLC-MS法^[9]、聚酰胺吸附法^[10]、一阶导数光谱法^[11]等,但地黄样品用于测定总苯乙醇苷及总环烯醚萜苷的含量测定基本均用紫外分光光度法^[12,13],综合考虑到紫外分光光度法处理较为复杂、误差来源较多、试剂用量较大,污染较为严重,近红外光谱法作为一种无损、快速、绿色的分析方法已经广泛的应用于中药的质量分析中^[14,15],而地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷含量快速测定方法的研究未见报道。基于此,本研究以不同种质的怀地黄为研究对象,采集其生育期内的地黄叶片,利用紫外可见分光光度法结合化学计量学软件建立怀地黄叶片中总环烯醚萜苷和总苯乙醇苷含量的测定方法,以实现地黄叶片质量的快速评价和合理利用。

1 仪器与试药

1.1 仪器

万分之一电子天平(METTLER TOLEDO 梅特勒-托利多仪器上海有限公司)、HH-S2 双孔智能水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司)、Nicolet 6700型傅立叶变换近红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet

公司)、紫外-可见分光光度计(EVOLUTHION 260 BIO, Thermo)、石英比色皿(宜兴市银星分析器件厂)。

1.2 试剂

毛蕊花糖苷(四川省维克奇生物科技有限公司,批号:MUST-17020715)、梓醇(成都曼思特生物科技有限公司,批号:MUST-17102510)、甲醇(分析纯,天津市致远化学试剂有限公司)、无水乙醇(天津市致远化学试剂有限公司,分析纯)、2,4-二硝基苯肼(天津市大茂化学试剂厂)、盐酸(烟台市双双化工有限公司)、氢氧化钠(天津市恒兴化学试剂制造有限公司)、蒸馏水(郑州山溪泉蒸馏水有限公司)。

1.3 实验样品

实验以金九、白变、山东、BJ-1、QH-1、85-5等六个常见地黄种质的叶片为研究对象,每次每个种质随机选取5株作为一个样品,每次每个种质共收集10株,即两份样品。从6月~12月整个生育期内收集了六个种质地黄叶片共128份。将地黄叶片洗净,在真空干燥箱中55℃烘干,经高速万能粉碎机粉碎后过50目筛,保存于干燥器中备用。

2 结果与分析

2.1 怀地黄叶片近红外光谱的采集

取适量怀地黄叶片粉末平铺于近红外光谱仪的样品杯中,采用积分球漫反射法,在光谱范围12 000~4 000 cm⁻¹、分辨率8 cm⁻¹、扫描次数64的条件下获取128份地黄叶片样品近红外光谱图。每份样品重复扫描3次,取其平均光谱作为每份样品的最终光谱,叶片的近红外原始光谱叠加图见图1。

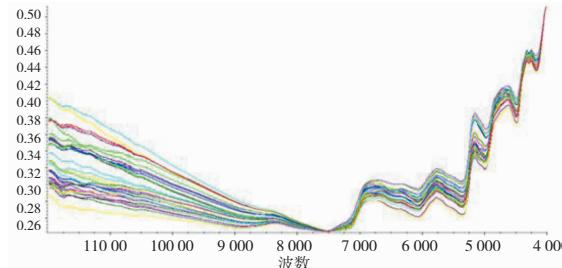


图1 128份地黄叶片的近红外原始光谱叠加图

Fig. 1 128 near infrared primordial spectral superposition of *Rehmannia glutinosa* leaves

2.2 地黄叶片中总环烯醚萜苷含量的测定^[4]

2.2.1 供试品溶液的制备

精确称量地黄叶片粉末1g,加70%乙醇10mL超声45min,补足重量,过滤后定容至50mL容量瓶

中,摇匀。精密量取 2.5 mL 于 50 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇定容,摇匀,即得地黄叶片的供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备

精确称量梓醇对照品 5.21 mg 置于 25 mL 量瓶中,加 70% 乙醇溶液定容即得。

2.2.3 样品的含量测定

采用外标法进行含量测定,精密量取地黄叶片的供试品溶液 1 mL,置于 10 mL 容量瓶中,加入 1 mol/L 盐酸溶液 2 mL,摇匀,90 ℃ 水浴 15 min,室温静置放冷,加二硝基苯肼乙醇溶液 0.5 mL,摇匀,90 ℃ 水浴 25 min,室温静置 15 min 放冷,再加入 1 mol/L NaOH 70% 乙醇溶液 3 mL,摇匀,室温静置 1 h。以 70% 乙醇作为空白对照,测定 462 nm 下的吸光度。每份样品重复三次,结果取三次平均值为一组数据,共测得两份数据,以保证数据的准确性。地黄叶片中总环烯醚萜苷的含量测定结果见表 1。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 标准曲线的制备

分别精密量取 2.2.2 项下梓醇对照液 1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇定容,即对照品浓度分别为 0.031 3、0.041 7、0.052 1、0.062 5、0.083 4 mg/mL。制备方法同供试品,在 462 nm 波长下测定吸光度,重复测定三次,取其平均值。以吸光度 (A) 为纵坐标,对照品浓度 (C) 为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $y = 10.609x - 0.091 8, R^2 = 0.995 5$,结果表明梓醇浓度在 0.031 3 ~ 0.083 4 mg/mL 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

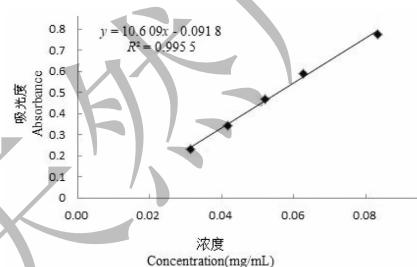


图 2 地黄叶片总环烯醚萜苷类含量标准曲线

Fig. 2 Standard curve of total iridoid glycosides in *Rehmannia glutinosa* leaves

2.2.4.2 精密度试验

取同一供试品溶液按 2.2.3 项下方法连续测定 5 次,记录吸光度, RSD 为 1.14%。说明仪器的精密度良好。

2.2.4.3 稳定性试验

取同一供试品溶液按 2.2.3 项下方法于 0、30、60、90、120 min 连续测定 5 次,记录吸光度。RSD 为 0.71%。说明供试品溶液在 2 h 内稳定。

2.2.4.4 重复性试验

称量同一样品 5 份,按照 2.2.1 项下方法制得供试品,按照 2.2.3 项下方法测定吸光度, RSD 为 2.08%。说明该方法重复性好。

2.3 地黄叶片中总苯乙醇苷含量的测定^[16]

2.3.1 供试品溶液的制备

称取地黄叶片粉末约 1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 60% 甲醇 50 mL,称定重量。超声处理 30 min 后放至室温,补足重量,摇匀,过滤。精密量取续滤液 1 mL,至 50 mL 容量瓶中,60% 甲醇定容即得地黄叶片的供试品溶液。

2.3.2 对照品溶液的制备

取毛蕊花糖苷对照品 1.21 mg 于 10 mL 容量瓶中,甲醇定容即得。

2.3.3 样品的含量测定

采用外标法进行含量测定,取地黄叶片的供试品溶液于比色皿中,用紫外分光光度计在 334 nm 处测量吸光度,每份样品重复三次,取三次结果的平均值为一组数据,每份样品共测得两组数据,以确保数据的准确度。地黄叶片中总苯乙醇苷的含量测定结果见表 2。

2.3.4 方法学考察

2.3.4.1 标准曲线的制备

精密吸取 2.3.2 项下毛蕊花糖苷对照品储备液 0.5、0.6、0.7、1.0、1.2、1.8 mL 分别置于 5 mL 容量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,即对照品浓度分别为 0.012 1、0.014 5、0.016 9、0.024 2、0.029 0、0.043 5 mg/mL。同时以相应的溶剂作空白,于 334 nm 波长处测定各对照品溶液的吸光度,重复测定三次,取其平均值。以吸光度 (A) 为纵坐标,对照品浓度 (C) 为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $y = 25.94x + 0.078 1, R^2 = 0.992 5$ 。结果表明,毛蕊花糖苷质量浓度与吸光度在 0.012 1 ~ 0.043 5 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.3.4.2 精密度试验

取同一供试品溶液按 2.3.3 项下方法连续测定 5 次,记录吸光度, RSD 为 2.04%。说明仪器的精密度良好。

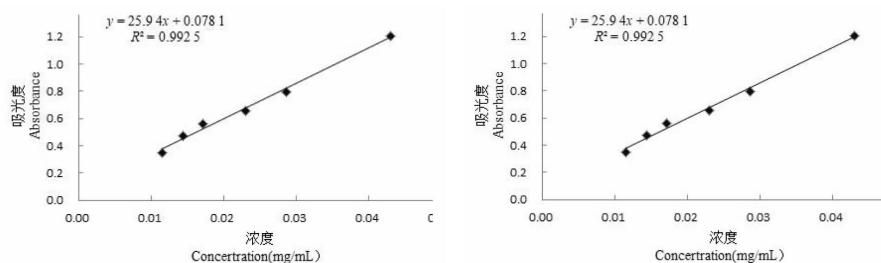


图3 地黄叶片总苯乙醇苷类含量标准曲线

Fig. 3 Standard curve of total phenylethanol glycosides content in Rehmannia glutinosa leaves

2.3.4.3 稳定性试验

取同一供试品溶液按2.3.3项下方法于0、30、60、90、120 min连续测定5次,记录吸光度。RSD为1.25%。说明供试品溶液在2 h内稳定。

2.3.4.4 重复性试验

称量同一样品5份,按照2.3.1项下方法制得供试品,按照2.3.3项下方法测定吸光度,RSD为1.65%。说明该方法重复性好。

表1 地黄叶片中总环烯醚萜苷的含量测定结果(%)

Table 1 Results of determination of total iridoid glycosides in leaves of Rehmannia glutinosa (%)

样品编号 Sample serial number	总环烯醚萜苷 Total iridoid glycoside	样品编号 Sample serial number	总环烯醚萜苷 Total iridoid glycoside	样品编号 Sample serial number	总环烯醚萜苷 Total iridoid glycoside
1	4.399	44	3.225	87	2.533
2	3.195	45	5.060	88	2.225
3	5.107	46	5.375	89	1.801
4	5.886	47	3.007	90	1.898
5	5.152	48	4.018	91	3.914
6	5.240	49	4.114	92	4.445
7	6.207	50	4.076	93	4.650
8	6.449	51	3.346	94	4.704
9	6.302	52	4.267	95	3.428
10	6.199	53	4.226	96	3.465
11	6.840	54	3.858	97	4.097
12	7.173	55	5.630	98	3.871
13	4.709	56	5.837	99	4.776
14	4.778	57	3.393	100	4.697
15	4.562	58	4.219	101	5.303
16	4.974	59	3.233	102	5.297
17	3.089	60	3.732	103	6.251
18	2.750	61	3.393	104	5.701
19	5.844	62	3.229	105	3.707
20	5.502	63	3.730	106	3.201
21	4.551	64	3.922	107	4.983
22	4.517	65	4.065	108	4.886
23	4.225	66	4.612	109	5.776
24	4.313	67	4.137	110	5.443

续表1(Continued Tab. 1)

样品编号 Sample serial number	总环烯醚萜苷 Total iridoid glycoside	样品编号 Sample serial number	总环烯醚萜苷 Total iridoid glycoside	样品编号 Sample serial number	总环烯醚萜苷 Total iridoid glycoside
25	3.739	68	3.643	111	4.125
26	3.751	69	3.943	112	4.578
27	3.294	70	3.925	113	3.862
28	4.485	71	2.860	114	3.789
29	1.183	72	2.910	115	4.746
30	1.516	73	4.056	116	4.671
31	4.486	74	4.165	117	4.325
32	3.942	75	3.270	118	4.042
33	3.002	76	3.292	119	3.862
34	2.986	77	4.294	120	3.755
35	4.382	78	4.640	121	4.228
36	4.238	79	3.518	122	3.847
37	4.891	80	3.232	123	4.054
38	4.558	81	2.528	124	4.017
39	3.283	82	2.697	125	4.257
40	2.824	83	2.558	126	4.467
41	2.445	84	2.778	127	3.880
42	2.740	85	5.102	128	4.172
43	3.765	86	4.480		

表2 地黄叶片中总苯乙醇苷含量测定结果(%)

Table 2 Results of determination of total phenethyl alcohol glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa* (%)

样品编号 Sample serial number	总苯乙醇苷 Total iridoid glycoside	样品编号 Sample serial number	总苯乙醇苷 Total iridoid glycoside	样品编号 Sample serial number	总苯乙醇苷 Total iridoid glycoside
1	5.009	44	5.291	87	2.815
2	5.375	45	3.639	88	2.851
3	4.730	46	3.614	89	1.859
4	4.839	47	3.043	90	1.939
5	5.946	48	2.966	91	4.862
6	5.497	49	3.380	92	4.694
7	5.695	50	3.756	93	3.637
8	5.763	51	3.307	94	3.605
9	2.303	52	3.364	95	2.476
10	2.268	53	3.403	96	2.553
11	3.257	54	3.413	97	1.945
12	3.212	55	4.383	98	1.955
13	4.674	56	4.376	99	3.159
14	4.561	57	2.427	100	3.165
15	4.087	58	2.346	101	4.204

续表2(Continued Tab. 2)

样品编号 Sample serial number	总苯乙醇苷 Total iridoid glycoside	样品编号 Sample serial number	总苯乙醇苷 Total iridoid glycoside	样品编号 Sample serial number	总苯乙醇苷 Total iridoid glycoside
16	4.097	59	2.494	102	4.162
17	3.122	60	2.591	103	7.409
18	3.045	61	2.717	104	7.197
19	5.275	62	2.842	105	2.681
20	5.291	63	5.176	106	2.668
21	3.942	64	5.147	107	6.089
22	3.917	65	5.033	108	6.095
23	1.940	66	5.187	109	3.562
24	1.917	67	2.832	110	3.527
25	6.001	68	2.780	111	6.881
26	6.197	69	3.633	112	6.955
27	3.063	70	3.540	113	2.406
28	3.197	71	1.420	114	2.409
29	4.875	72	1.465	115	3.288
30	4.175	73	4.109	116	3.385
31	4.039	74	3.801	117	6.880
32	3.943	75	3.520	118	6.954
33	1.782	76	3.541	119	4.822
34	1.849	77	3.399	120	4.787
35	3.464	78	3.795	121	4.778
36	3.362	79	3.890	122	4.884
37	6.235	80	3.999	123	4.926
38	5.994	81	1.783	124	4.958
39	4.432	82	1.824	125	2.535
40	4.413	83	0.985	126	2.593
41	2.443	84	0.979	127	1.598
42	2.456	85	4.922	128	1.974
43	5.091	86	5.127		

注:1-24 为 85-5 地黄生育期内的样品,25-48 为 BJ-1 地黄生育期内的样品,49-72 为白变地黄在生育期的样品,73-96 为金九地黄在生育期内的样品,97-112 为山东地黄生育期内的样品,113-128 为 QH-1 地黄在生育期内的样品。

Note: 1-24 is 85-5 Rehmannia glutinosa growing period sample. 25-48 is BJ-1 Rehmannia glutinosa growing period sample. 49-72 is Baibian Rehmannia glutinosa growing period sample. 73-96 is the sample of Jinjiu Rehmannia glutinosa in the growing period. 97-112 is the sample of Shandong Rehmannia glutinosa in the growing period, and 113-128 is the sample of QH-1 Rehmannia glutinosa in the growing period.

2.4 地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷近红外定量分析模型的建立

2.4.1 校正集和验证集样品的选择

根据“2.2”项下地黄叶片中总环烯醚萜苷含量及“2.3”项下地黄叶片中总苯乙醇苷含量的分布,按照校正集和验证集样品数为 4:1 的比例,验证

集样品的含量范围在校正集的含量范围之内的原则,总环烯醚萜苷模型随机选取 102 个地黄叶片样品作为校正集、24 个地黄叶片样品作为验证集,总苯乙醇苷模型随机选取 103 个地黄叶片样品作为校正集、25 个叶片样品作为验证集,分别建立地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷的定量分析校正模

型,校正集和验证集的样品信息见表3、表4。

表3 地黄叶片校正集和验证集样品总环烯醚萜苷分布范围

Table 3 Distribution of total iridoid glycosides in calibration and validation samples of *Rehmannia glutinosa* leaves

样品 Sample	样品数 Number of samples	总环烯醚萜苷 Total Iridoid glycoside(%)	平均含量 Average content(%)
校正集	103	1.18~3.7.173	4.15
验证集	25	1.89~8.6.199	4.07

表4 地黄叶片校正集和验证集样品总苯乙醇苷分布范围

Table 4 Distribution of total phenethyl glucoside in calibration and validation samples of *Rehmannia glutinosa* leaves

样品 Sample	样品数 Number of samples	总苯乙醇苷 Total phenylethanose(%)	平均含量 Average content(%)
正集	102	0.985~7.409	3.89
验证集	24	0.978~5.291	3.42

2.4.2 光谱预处理方法的选择

不同种质生育期内的地黄叶片由于发育程度、物理性质及测定条件等的差异,会引起光谱基线的漂移以及斜率的变化,进而影响模型的预测性能。当模型的内部交叉验证决定系数(R^2)接近于1,校

正均方根偏差($RMSEC$)和预测均方决定差($RMSEP$)差别较小时模型的预测能力较强,因此我们以上述参数为指标,考察了不同光谱预处理方法对模型性能的影响,以选择最优的预处理方法,结果见表5、表6。

表5 不同光谱预处理方法对地黄叶片总环烯醚萜苷定量校正模型性能的影响

Table 5 Effect of different spectral pretreatment methods on quantitative calibration model of total iridoid glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa*

光谱预处理方法	R^2	RMSEP	RMSEC
多元散射校正 MSC	0.951 8	0.303 0	0.339 0
标准归一化 SNV	0.957 3	0.265 0	0.319 0
一阶导数 First derivative	0.972 1	0.095 4	0.259 0
二阶导数 Second derivative	0.964 3	0.156 0	0.292 0
SNV + First derivative	0.966 4	0.130 0	0.284 0
MSC + First derivative	0.961 7	0.200 0	0.303 0
MSC + Second derivative	0.968 5	0.167 0	0.275 0
SNV + Second derivative	0.961 4	0.183 0	0.304 0
MSC + SD + 卷积平滑 SG	0.968 8	0.184 0	0.273 0
MSC + SD + 直接差分法 ND	0.923 9	0.443 0	0.422 0

表6 不同光谱预处理方法对地黄叶片总苯乙醇苷定量校正模型性能的影响

Table 6 Effect of different spectral pretreatment methods on quantitative calibration model of total phenylethanose glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa*

光谱预处理方法	R^2	RMSEP	RMSEC
MSC	0.997 0	0.160	0.116 0
SNV	0.997 7	0.170	0.101 0
MSC + FD	0.998 0	0.211	0.095 3
MSC + SD	0.998 2	0.142	0.089 9
SNV + FD	0.997 5	0.268	0.106 0
MSC + FD + SG	0.998 1	0.258	0.091 4
SNV + FD + ND	0.996 3	0.243	0.129 0

结果表明地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷原始光谱分别选用 *constant + FD*、*MSC + SD* 的光谱预处理方法可以获得预测性能较好的模型。

2.4.3 建模区间的选取

近红外光谱主要反映基团伸缩振动产生的倍频峰、组频峰的信息,由于倍频峰及组频峰峰强较弱不

易区分,各峰重叠严重,因此冗余信息以及噪音干扰较大。为了获取与待测组分含量相关的最大信息量,以建立最优的预测模型,我们对不同波段范围所建模型的性能进行考察,以筛选最优建模区间,结果见表 7、表 8。

表 7 光谱范围对地黄叶片总环烯醚萜苷定量校正模型性能的影响

Table 7 Effect of spectral range on the quantitative calibration model of total iridoid glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa*

光谱范围 Spectral range (cm ⁻¹)	R ²	RMSECV
11 998. 9 ~ 33 999. 6 3	0.972 1	0.869 4
8 072. 12 ~ 4 034. 35	0.930 2	0.676 6
6 615. 30 ~ 4 317. 49	0.968 1	0.628 9
11 793. 64 ~ 7 906. 57	0.959 0	0.849 7
9 482. 59 ~ 5317. 40	0.970 3	0.714 8

表 8 光谱范围对地黄叶片总苯乙醇苷定量校正模型性能的影响

Table 8 Effect of spectral range on the quantitative calibration model of total phenylethanol glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa*

光谱范围 Spectral range (cm ⁻¹)	R ²	RMSECV
11 998. 9 3 ~ 3 999. 63	0.998 2	0.707 2
11 239. 1 0 ~ 6 476. 24	0.990 4	0.817 9
10 687. 7 8 ~ 8 184. 69	0.997 1	0.769 7
10 406. 0 1 ~ 9 272. 07	0.998 1	0.655 4

通过 TQ 8.0 软件分析各波段范围所对应的 R²、RMSECV 值可知,地黄叶片总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷定量分析模型的最佳建模区间均为 11 998. 9 3 ~ 3 999. 63 cm⁻¹。

2.4.4 主因子数的选择

在相同的校正集样品下,主因子数的选择对模

型的稳定性和 NIR 预测结果有较大影响,主成分数过少或过多均影响模型的预测准确性。本研究以 RMSECV 为评价模型性能参数,选择 RMSECV 最小时的因子数即为最佳主因子数。结果见图 4。由图知,地黄叶片总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷定量校正模型的最佳主因子数分别为 7 和 9。

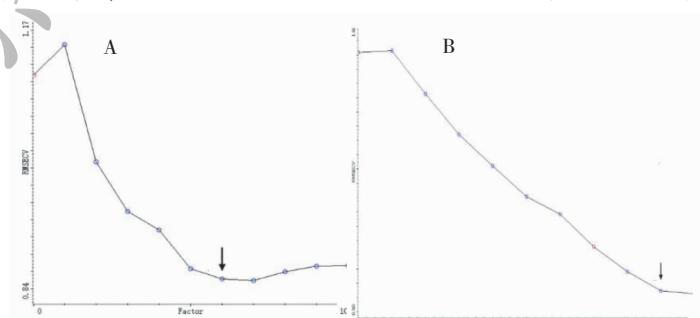


图 4 主因子数对 RMSECV 的影响

Fig. 4 Effects of principal factor numbers on RMSECV

注:A. 总环烯醚萜苷;B. 总苯乙醇苷。

Note: A. Total iridoid glycosides; B. Total phenylethanol glycoside.

2.4.5 地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷定量模型的建立

分别以 103 个地黄叶片总环烯醚萜苷样品和 102 个地黄叶片总苯乙醇苷样品为校正集, 利用 TQ 8.0 分析软件结合 PLS 法, 分别选择最佳的光谱预

处理方法、建模波段和主因子数建立地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷的定量分析模型。地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷 NIR 预测值与参考值的相关图及偏差图见图 5、图 6。

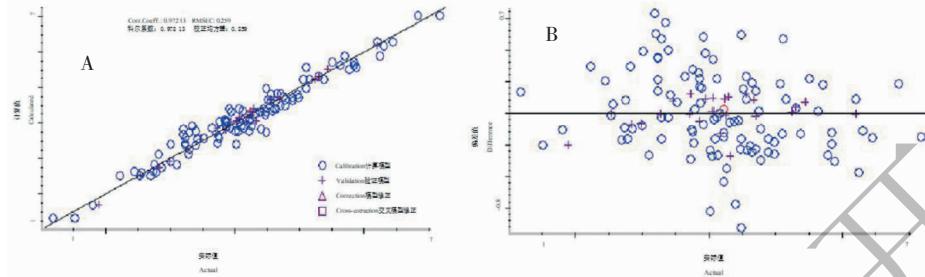


图 5 地黄叶片中总环烯醚萜苷含量 NIR 预测值与参考值之间的相关图与偏差图

Fig. 5 Correlation and deviation between NIR predicted value and reference values of total iridoid glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa*

注:A 相关图;B 偏差图。

Note: A. correlation ; B. deviation.

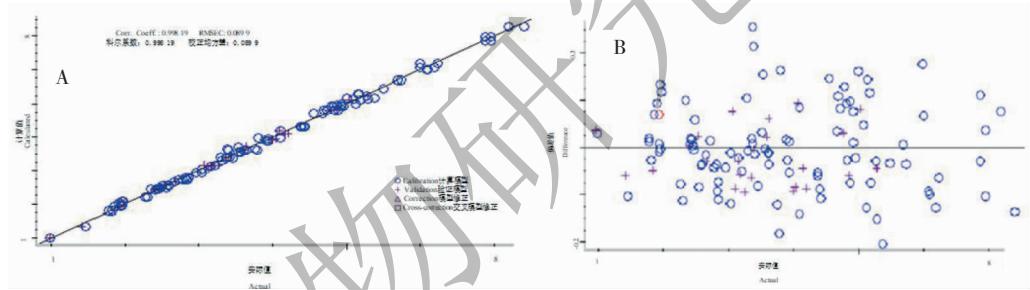


图 6 地黄叶片中总苯乙醇苷含量 NIR 预测值与参考值之间的相关图与偏差图

Fig. 6 Correlation and deviation between NIR predicted value and reference values of total phenethyl glucoside in leaves of *Rehmannia glutinosa*

注:A 相关图;B 偏差图。

Note: A. correlation ; B. deviation.

2.4.6 地黄叶片中总环烯醚萜苷和总苯乙醇苷定量模型的验证

分别将 24 份总环烯醚萜苷验证集样品和 25 份总苯乙醇苷验证集样品的近红外光谱图输入到相应的近红外定量模型中, 将总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷含量的 NIR 预测值与实测值进行比较, 结果见表 9、表 10。由表知, NIR 模型预测总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷的含量结果与常规的 UV 法测定的数据比较接近, 绝对及相对偏差较小; 且总环烯醚萜苷配对样本 t 检验结果显示 $t = 0.240, P = 0.813 > 0.05$, 总苯乙醇苷配对样本 t 检验结果显示 $t = 1.296, P = 0.207 > 0.05$ 。以上结果表明预测值与实测值的差异无统计学

意义, 说明两个模型的预测性能较好, 可以用于地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷的含量测定。

3 讨论

近红外光谱技术作为一种间接的分析方法, 它主要运用化学计量学软件从样品复杂的背景与谱峰重叠的近红外光谱图中提取和样品性质相关的信息, 建立光谱特征与样品性质等之间关系的数学模型, 可用于物质的定量及定性分析。一般情况下, 在待测组分含量高、样品数量多、样品代表广泛、基础数据测定准确、仪器性能稳定的条件下所建立的模型性能相对较好。本研究结果表明, 总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷作为地黄重要的有效成分, 在地黄叶

表 9 24 份总环烯醚萜苷验证集样品的 NIR 预测结果(%)

Table 9 NIR predicted values of 24 validation samples for total iridoid glycosides (%)

样品编号 Sample serial number	测定值 Measured value	预测值 Predictive value	绝对偏差 Absolute deviation	相对偏差 Relative deviation	P
6	5.240	5.243	0.003	0.001	
10	6.199	6.188	-0.011	-0.002	
21	4.551	4.670	0.119	0.026	
33	2.986	2.920	-0.066	-0.022	
35	4.238	4.328	0.090	0.021	
50	4.076	4.088	0.012	0.003	
63	3.730	3.851	0.121	0.032	
69	3.943	4.034	0.091	0.023	
72	2.832	2.760	-0.072	-0.025	
74	4.065	4.163	0.098	0.024	
76	3.270	3.264	-0.006	-0.002	
78	4.294	4.396	0.102	0.024	0.813
83	2.528	2.524	-0.004	-0.002	
89	1.898	1.698	-0.200	-0.105	
95	3.465	3.539	0.074	0.021	
100	4.697	4.677	-0.020	-0.004	
102	5.297	5.331	0.034	0.006	
105	3.707	3.699	-0.008	-0.002	
110	5.443	5.510	0.067	0.012	
113	3.862	3.881	0.019	0.005	
116	4.671	4.754	0.083	0.018	
118	4.042	4.052	0.010	0.002	
117	4.325	4.052	-0.273	-0.063	
125	4.257	4.240	-0.017	-0.004	
128	4.172	4.042	-0.130	-0.031	

表 10 25 份总苯乙醇苷验证集样品的 NIR 预测结果(%)

Table 10 NIR predicted values of 24 validation samples for total phenylethanol glycosides (%)

样品编号 Sample serial number	测定值 Measured value	预测值 Predictive value	绝对偏差 Absolute deviation	相对偏差 Relative deviation	P
11	3.257	3.161	-0.096	-0.030	0.207
15	4.087	4.181	0.094	0.023	
17	3.122	3.034	-0.088	-0.028	
20	5.291	5.246	-0.045	-0.009	
27	3.063	3.139	0.076	0.025	
28	3.197	3.139	-0.058	-0.018	
31	4.039	3.956	-0.083	-0.020	
34	1.849	1.800	-0.049	-0.26	

续表 10(Continued Tab. 10)

样品编号 Sample serial number	测定值 Measured value	预测值 Predictive value	绝对偏差 Absolute deviation	相对偏差 Relative deviation	P
52	3.364	3.300	-0.064	-0.020	
53	3.403	3.399	-0.004	-0.001	
65	5.033	5.112	0.079	0.016	
69	3.633	3.694	0.061	0.017	
71	1.420	1.361	-0.059	-0.042	
77	3.999	3.907	-0.092	-0.023	
84	0.979	1.014	0.035	0.036	
91	4.862	4.802	-0.060	-0.012	
94	3.605	3.625	0.020	0.006	
100	3.165	3.137	-0.028	-0.009	
101	4.204	4.116	-0.088	-0.020	
102	4.162	4.116	-0.046	-0.011	
105	2.681	2.653	-0.028	-0.010	
114	2.409	2.413	0.004	0.002	
121	4.778	4.808	0.030	0.006	
125	2.535	2.557	0.022	0.009	

片中含量较高,比较适合于利用近红外光谱法进行快速测定。另外,不同种质生育期内地黄叶片中苯乙醇苷类和环烯醚萜苷类成分差异较大,为了保证样品的代表性,我们以道地产区的金九、白变、山东、BJ-1、QH-1、85-5 等六个常见地黄种质在不同生育期内的地黄叶片为研究对象,经过基础数据测定、建模条件的优选,建立了可以相对准确的预测怀地黄中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷含量的近红外地定量分析模型,为怀地黄叶片的快速质量评价提供一种可参考的方法。

地黄种植区域广泛,因受自然环境、生产种植、采收加工、杂交和变异及人文环境等多因素影响,最终形成了一系列地黄栽培种及其变种,而且不同种质和产地的地黄叶片色泽、厚度、化学质量特征及近红外光谱特征都存在一定的差异。本研究主要利用怀地黄产区不同种质及生育期的地黄叶片的相关信息,通过对光谱背景的处理,初步建立了怀地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷的定量分析模型,但模型中并没有包括不同产地的地黄叶片信息,因此模型的使用范围还受到一定的限制,后期还有待于继续丰富地黄叶片样本,进一步完善和优化模型,为快速检测地黄叶片的质量以合理开发利用地黄叶片资源提供一种简便可行的方法。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:124.
- 2 Zhang LJ, Zhou ZM, Tu WQ, et al. Simultaneous determination of five glycosides in Rehmanniae Radix by HPLC [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29(1): 87-90.
- 3 Wang FQ, Wang LN, Zhi JY, et al. Changes in dynamic accumulation of acteoside from different *Rehmannia glutinosa* cultivars [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(24): 78-83.
- 4 Ji XQ, Sun P, Qi JJ, et al. Study on distribution and dynamic accumulation of catalpol and total iridoid in fresh *Rehmannia glutinosa* [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39:466-470.
- 5 Li YC. A compendium of standard varieties of *Medicinal Materials* (药材标准品种大全) [M]. Chengdu: Sichuan Chengdu Science and Technology Press, 2001:29.
- 6 Li HW, Meng XL. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Rehmannia glutinosa* [J]. Drug Eva Res (药物评价研究), 2015, 8:218-228.

(下转第 901 页)