

便携式近红外测定龙胆中水溶性浸出物及龙胆苦苷含量

吴晓燕,侯晓琳,宿 莹,刘 战,姜雨昕,孙 金,翁丽丽*

长春中医药大学药学院中药鉴定教研室,长春 130117

摘要:利用近红外光谱技术,分别建立快速分析龙胆药材中水溶性浸出物及龙胆苦苷含量的定量分析模型。采用高效液相色谱法测定龙胆中龙胆苦苷含量,依据《中华人民共和国药典》2015 版四部通则 2201 项下“水溶性浸出物测定法”测定龙胆中水溶性浸出物。采集 90 批龙胆样品的近红外光谱图,结合偏最小二乘法,分别建立最优定量分析模型。所建立的 2 个模型相关系数(R^2)分别为 0.933 3 和 0.950 5,校正均方差(RMSEC)分别为 0.732 7 和 0.252 3,预测均方差(RMSEP)分别为 0.690 6 和 0.234 2;用验证集样品进行模型验证,平均相对偏差分别为 0.06% 和 0.30%。结果表明,近红外光谱法可用于龙胆中水溶性浸出物及活性成分的定量分析,其处理简单、操作简便、快速无损,且结果较准确。该方法在龙胆药材的质量控制及在线监测等方面具有广阔的应用前景。

关键词:近红外光谱法;龙胆;水溶性浸出物;龙胆苦苷

中图分类号:R282.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)8-1363-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.8.012

Determination of water-soluble extracts and gentiopicroside in Gentianae Radix et Rhizoma by portable near-infrared spectrometers

WU Xiao-yan, HOU Xiao-lin, SU Ying, LIU Zhan, JIANG Yu-xin, SUN Jin, WENG Li-li*

Department of Traditional Chinese Medicine Identification, School of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China

Abstract: The objective of this study was to establish a quantitative analysis model for the content of water-soluble extracts and gentiopicroside in Gentianae Radix et Rhizoma by near-infrared spectroscopy (NIR). The content of gentiopicroside in Gentianae Radix et Rhizoma was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The content of water-soluble extracts in Gentianae Radix et Rhizoma was determined according to the 2201 general rules of four general rules of Chinese Pharmacopoeia (2015 edition). The near-infrared spectra of 90 batches of Gentianae Radix et Rhizoma samples were collected and the optimal quantitative analysis models were established by partial least square method (PLS). The correlation coefficient (R^2) in the two models were 0.933 3 and 0.950 5, respectively. The root mean square error of calibration (RMSEC) were 0.732 7 and 0.252 3, and the root mean square error of prediction (RMSEP) were 0.690 6 and 0.234 2, respectively. The average relative deviation was 0.06% and 0.30%, respectively. The results showed that the near-infrared spectroscopy can be used for quantitative analysis of water-soluble extracts and active components in Gentianae Radix et Rhizoma. The method is simple, easy to operate, fast and non-destructive, and the results are accurate. The method has a broad application prospect in quality control and online monitoring of Gentianae Radix et Rhizoma.

Key words: near-infrared spectroscopy; Gentianae Radix et Rhizoma; water-soluble extracts; gentiopicroside

龙胆为龙胆科植物条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag.、龙胆 *G. scabra* Bge.、三花龙胆 *G. triflora* Pall. 或坚龙胆 *G. rigescens* Franch. 的干燥根及根茎。龙胆为常用大宗药材,龙胆中最主要的药效成分为

环烯醚萜苷类,包括龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、马钱苷酸等^[1],具有抗病毒、抗肿瘤、保肝利胆等多种生物活性,可用于胆囊炎、肝炎及高血压等疾病的防治^[2],疗效显著,也是常用中成药的原料药。龙胆在我国分布广泛,药用资源开发潜力巨大,具有非常重要的药用价值。近年来,随着研究的深入,对龙胆的需求也不断扩大。利用现代的先进科技手段,能尽最大可能保障和控制龙胆的质量,从而筛选

优良药材资源,以更好地利用其价值。

在控制中药质量的方法中,传统的方法,如高效或超高效液相色谱法、气相色谱法、紫外可见光分光度法等都需要花费较多的时间用于提取、分离及进样检测^[3]。而近红外光谱分析技术具有分析速度快、对样品破坏性小、无需繁琐的预处理、绿色无化学污染等优点,将该技术与化学计量学方法结合可以实现对样品的快速、无损、定性或定量分析^[4-5],可以在现场进行质量评价,因此弥补了中药材采收或收购现场质量把关的不足,节省了检测时间,提高了工作效率。

现代研究表明龙胆的有效成分主要是龙胆苦苷,为水溶性成分,在传统的净制过程中会有大量有效成分流失等问题^[6],故水溶性浸出物与龙胆苦苷含量均为控制龙胆药材质量的重要指标。龙胆水溶性浸出物及龙胆苦苷含量的传统测定方法结果准确,但在种植龙胆的山区存在检测的仪器不方便、可操作性低等现象,在测定过程中也存在着操作繁琐、工作量大、耗时长等问题^[7],不能满足大批量的现场快速分析要求,易受到环境制约。本研究采用NIR法分别对龙胆药材水溶性浸出物含量及龙胆苦苷含量进行定量分析,以期利用近红外分析方法的快速、便捷的优势对龙胆药材质量控制提供参考。实验中用到的Micro PHAZIR Rx手持式近红外光谱仪体积小、重量轻,便携安全,无需制备样品,可在几秒钟内执行快速的现场分析,在生产种植基地也具有极好的适用性。

1 仪器与试剂

Micro PHAZIR Rx手持式近红外光谱仪(赛默飞世尔科技中国有限公司);岛津高效液相色谱Prominence-ILC-2030(岛津企业管理中国有限公司);HH-S2恒温水浴锅(600 W,50 Hz;上海越众仪器设备有限公司);KDM型调温电热套(山东鄄城华鲁电热仪器有限公司);FA1004电子天平($d = 0.000\ 01\ g$;上海佑科仪器仪表有限公司);KQ3200E超声波清洗器(500 W,40 KHz;昆山市超声仪器有限公司);Water Purifier实验室专用超纯水机(上海和泰仪器有限公司);DHG-9053A电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

甲醇(色谱级,北京化工厂),水为超纯水。

90批龙胆药材均由吉林省北药材加工有限公司提供,产地分别为吉林、辽宁、黑龙江,经长春中医药大学翁丽丽教授鉴定均为龙胆科植物龙胆的干燥

根及根茎;龙胆苦苷对照品(规格:20 mg,纯度,97.6%;批号:110770-201515;购自中国食品药品检定研究院)。

2 实验方法

2.1 水溶性浸出物含量测定

照《中华人民共和国药典》2015年版一部“浸出物测定法”项下“水溶性浸出物测定法”,对90批龙胆药材进行测定^[8]。

2.2 龙胆苦苷含量测定

照《中华人民共和国药典》2015年版一部高效液相色谱法(通则0512),对90批龙胆药材进行测定。

2.2.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,色谱柱型号:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 × 250 mm, 5 μm);以甲醇-水(25:75)为流动相;流速1.0 mL/min;柱温25 °C;进样量10 μL;检测波长为270 nm。理论板数按龙胆苦苷峰计算应不低于3 000。

2.2.2 对照品溶液制备

取龙胆苦苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含0.2 mg的溶液,即得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备

取龙胆药材粉末(过四号筛)0.5 g,精密称定,精密加入甲醇20 mL,称定重量,加热回流15 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀、滤过,滤液备用,精密量取续滤液2 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.2.4 测定法

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各10 μL注入超高效液相色谱仪,测定,用外标法计算含量,即得。

2.3 近红外光谱采集

称取约5 g龙胆药材粉末(过四号筛),放入石英样品杯中,均匀铺平,采用积分球漫反射采集光谱,采集光谱波长范围为1 600 ~ 2 400 nm,温度为23 ~ 27 °C,相对湿度为30% ~ 40%;以空气为参比扣除背景采集光谱图,每批龙胆样品重复扫描5次,计算平均光谱,样品的近红外光谱叠加图见图1。

2.4 水溶性浸出物、龙胆苦苷含量近红外定量分析模型的建立

采用主成分分析法(principal components analysis,PCA)对龙胆样品光谱进行聚类分析,利用光谱文件扫描数据计算打分,统计样品间差异情况,按马

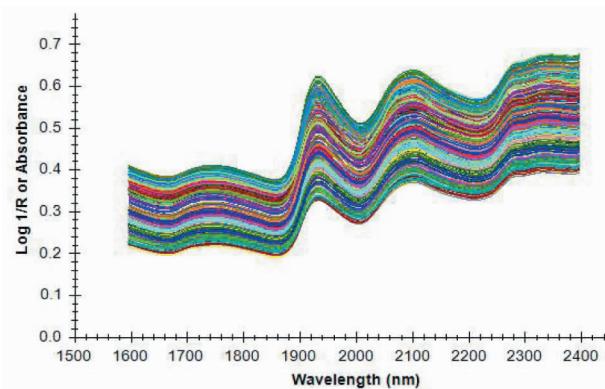


图 1 90 批龙胆近红外光谱叠加图

Fig. 1 Near-infrared spectra superposition diagram of 90 batches of Gentianae Radix et Rhizoma samples

氏距离大于 3.0 的样本判定为异常, 剩余样本划分成校正集和验证集, 保证验证集样品所测水溶性浸出物及龙胆苦苷含量的化学值含量范围均不超过校正集, 分别建立水溶性浸出物、龙胆苦苷含量的近红外模型。

本实验借助 Method Generator(Version 4.0.0.0) 分析软件对光谱进行预处理, 采用偏最小二乘法 (PLS) 建立模型, 以校正集内部交叉验证决定系数 (R^2)、校正均方差 (RMSEC)、预测均方差 (RMSEP)

和主因子数为指标参数来评价模型预测的准确性和稳定性。

3 结果与讨论

3.1 样品集的划分及化学值测定结果

经主成分分析法对龙胆样品光谱进行聚类分析, 90 批样品马氏距离均小于 3, 判定无异常数据。从 90 批龙胆药材样品中随机选择 70 批作为校正集, 剩余 20 批作为验证集。保证验证集样品所测水溶性浸出物及龙胆苦苷含量的化学值含量范围均不

表 1 样品中水溶性浸出物与龙胆苦苷的含量($\bar{x} \pm s$)Table 1 The content of water-soluble extracts and gentiopicroside of samples ($\bar{x} \pm s$)

项目 Project	样品集 Sample set	样品量 Number of sample	最大值 Maximum(%)	最小值 Minimum(%)	含量 Content(%)
水溶性浸出物 Water-soluble extracts	校正集 Calibration set	70	57.35	46.15	51.71 ± 2.24
	验证集 Validation set	20	55.21	48.39	51.97 ± 1.83
龙胆苦苷 Gentiopicroside	校正集 Calibration set	70	7.14	3.64	5.41 ± 1.14
	验证集 Validation set	20	6.77	4.11	5.56 ± 0.87

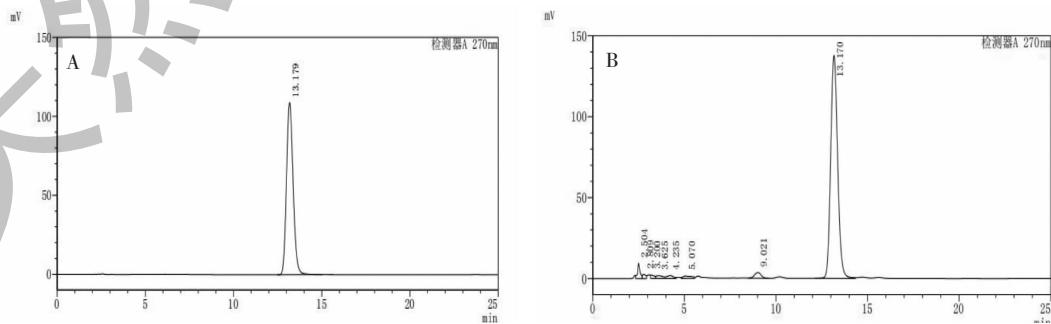


图 2 高效液相色谱图

Fig. 2 High performance liquid chromatography

注:A. 龙胆苦苷对照品高效液相色谱图;B. 供试品高效液相色谱图。Note: A. High performance liquid chromatography of gentiopicroside reference substance; B. High performance liquid chromatography of the tested product.

超过校正集,分别建立近红外模型,校正集和验证集水溶性浸出物、龙胆苦苷含量分布情况见表1。由表1可以看出,校正集、验证集数据分散程度较高、代表性较强,验证集样本水溶性浸出物、龙胆苦苷的平均值、标准差与校正集也接近,说明验证集设置较合理。

3.2 光谱预处理

在样品的光谱采集过程中,由于环境的温湿度、样品颗粒均匀度及仪器自身等因素都会引起近红外

光谱的不稳定和基线的偏移^[9],因此对近红外光谱预处理是有必要的。常用的光谱预处理方法有未处理(NONE)、标准正态变量进行交换处理(SNV)、一阶导数法(FD)、二阶导数法(SD)、Normalize Range(NR)、Savitzky-Golay(SG)平滑等^[10]。当RMSEC、RMSEP越小,表明模型的预测性能越好,当R²值越接近1时,表明所建立的模型预测值与样品实测值的相关性越好^[11]。采用软件自带的几种不同的预处理方法对R²、RMSEC、RMSEP的影响结果见表2。

表2 不同预处理方法对近红外模型R²、RMSEC、RMSEP的影响

Table 2 Effects of different pretreatment methods on R², RMSEC and RMSEP of NIR model

预处理方法 Pretreatment method	水溶性浸出物 Water-soluble extracts			龙胆苦苷 Gentiopicroside		
	R ²	RMSEC	RMSEP	R ²	RMSEC	RMSEP
NONE	0.904 2	0.878 3	0.848 8	0.939 0	0.280 2	0.287 6
SG	0.902 1	0.887 8	0.852 5	0.939 8	0.278 3	0.290 5
SNV	0.921 9	0.793 0	0.767 9	0.947 9	0.258 9	0.265 5
SG + FD	0.916 3	0.821 2	0.785 9	0.946 1	0.263 3	0.242 5
SG + SD	0.860 0	1.061 7	1.122 8	0.942 5	0.272 1	0.276 2
SG + NR	0.918 9	0.808 0	0.773 6	0.944 6	0.267 1	0.266 3
SG + FD + NR	0.933 3	0.732 7	0.699 6	0.950 5	0.252 3	0.234 2
SG + SD + NR	0.882 2	0.974 1	1.046 4	0.946 8	0.261 5	0.289 6

通过比较不同预处理方法,确定龙胆水溶性浸出物近红外模型及龙胆苦苷含量近红外模型的光谱预处理方法均为SG+FD+NR。

3.3 主因子数选择

采用PLS方法建立定量分析模型时,主因子数是优化模型的关键步骤,主因子数的选择反映的是未知样本被测组分产生的光谱变化,直接影响到模型实际预测能力^[12]。一般情况下,RMSECV越小,

所建立的模型预测精度越高。主成分数选取过大,容易引入不必要的信息,出现过拟合而带进过多噪音;但若主成分数选取过小,则会引起模型预测性能欠拟合,原始光谱中有用信息缺失^[13-15]。实验中,水溶性浸出物模型RMSECV最小值为1.060 5,与之对应的主因子数为6,龙胆苦苷含量模型的RMSECV最小值为0.351 4,与之对应的最佳主因子数为8,所建模型拟合度均较好。

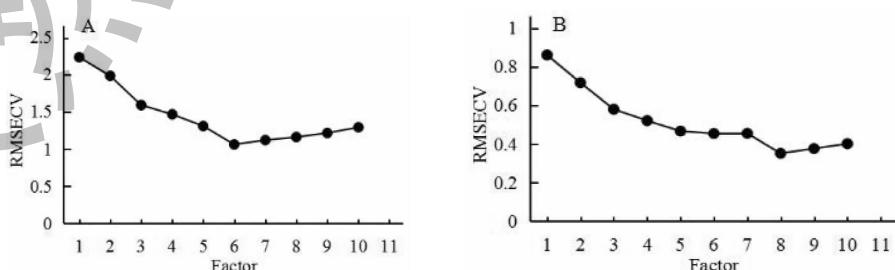


图3 主因子数对RMSECV的影响

Fig. 3 Effect of main factors on RMSECV

注:A. 水溶性浸出物;B. 龙胆苦苷。Note: A. Water-soluble extracts; B. Gentiopicroside.

3.4 定量模型的验证

按照上述的实验方法校正模型最优化参数,分

别建立龙胆药材水溶性浸出物含量及龙胆苦苷含量的PLS模型。待测定的20批样品,按照“2.3”方法

采集光谱,将光谱图输入校正模型中,结果见图4。其中龙胆水溶性浸出物近红外模型相关系数 R^2 为0.933 3,校正均方差RMSEC为0.732 7,预测均方

差RMSEP为0.690 6。龙胆苦苷含量近红外模型相关系数 R^2 为0.950 5,校正均方差RMSEC为0.252 3,预测均方差RMSEP为0.234 2。

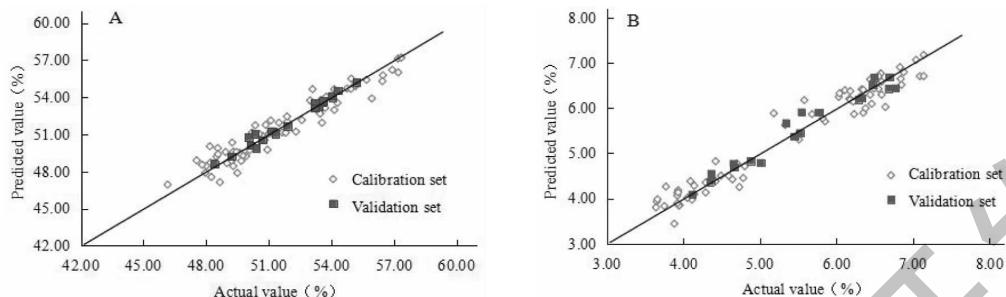


图4 实测值和预测值相关图

Fig. 4 Correlation diagram between measured values and predicted values

注:A. 水溶性浸出物;B. 龙胆苦苷含量。Note: A. Water-soluble extracts; B. The content of gentiopicroside.

20批验证集样品参考值与模型预测值具体结果如表3、表4,经计算,水溶性浸出物、龙胆苦苷绝

对偏差均在10%以内,平均相对偏差分别为0.06%、0.30%,模型预测性能良好。

表3 验证集样品平均回收率(水溶性浸出物)

Table 3 Average recovery of validation set(water-soluble extracts)

编号 No.	测定值 Measured value (%)	预测值 Predictive value (%)	绝对偏差 Absolute deviation (%)	相对偏差 Relative deviation (%)	平均相对偏差 Average relative deviation (%)
1	50.03	50.61	-0.58	-1.15	0.06
3	50.15	50.21	-0.06	-0.12	
7	50.4	49.85	0.55	1.10	
13	48.39	48.33	0.06	0.12	
17	54.05	53.91	0.16	0.30	
23	51.2	51.1	0.10	0.20	
27	53.58	53.46	0.12	0.22	
33	54.04	54.2	-0.16	-0.30	
37	50.69	50.77	-0.08	-0.16	
43	51.1	51.04	0.06	0.12	
47	51.31	51.03	0.27	0.53	
53	54.3	54.34	-0.04	-0.07	
57	50.34	51.12	-0.78	-1.54	
63	51.9	51.61	0.29	0.56	
67	53.41	53.36	0.05	0.09	
73	55.21	55.28	-0.07	-0.13	
77	53.21	53.54	-0.33	-0.62	
83	49.21	49.16	0.05	0.10	
87	53.22	53.16	0.06	0.11	
90	53.6	53.85	-0.25	-0.47	

表 4 验证集样品平均回收率(龙胆苦苷含量)

Table 4 Average recovery of validation set (the content of gentiopicroside)

编号 No.	测定值 Measured value (%)	预测值 Predictive value (%)	绝对偏差 Aabsolute deviation (%)	相对偏差 Relative deviation (%)	平均相对偏差 Average relative deviation (%)
1	5.54	5.93	-0.39	-6.80	0.30
3	6.29	6.26	0.03	0.48	
7	5.77	5.84	-0.07	-1.21	
13	5.76	5.68	0.08	1.40	
17	6.47	6.52	-0.05	-0.77	
23	6.33	6.12	0.21	3.37	
27	6.68	6.37	0.31	4.75	
33	6.49	6.60	-0.11	-1.68	
37	5.52	5.32	-0.20	-3.59	
43	5.45	5.35	0.10	1.85	
47	5.34	5.69	-0.35	-6.35	
53	4.36	4.55	-0.19	-4.26	
57	4.11	4.08	0.03	0.73	
63	5.01	4.75	0.26	5.33	
67	4.88	4.83	0.05	1.03	
73	4.66	4.70	-0.04	-0.85	
77	4.35	4.41	-0.06	-1.37	
83	4.65	4.72	-0.07	-1.49	
87	6.77	6.43	0.34	5.15	
90	6.69	6.81	-0.12	-1.78	

4 结论

本实验根据《中华人民共和国药典》2015年版一部标准,采用传统热浸法及高效液相色谱法与近红外光谱法相结合的方式,建立了利用NIR快速测定龙胆药材中水溶性浸出物及龙胆苦苷含量的模型,模型通过SNV、FD、SD、NR等方法的组合尝试筛选出适合的预处理方法,并采用PLS方法分别对龙胆水溶性浸出物及龙胆苦苷含量建立定量分析模型。经验证集样品进行模型验证,平均相对偏差分别为0.06%、0.30%,其结果均达到较好的水平,可见所建模型预测性较好,能够满足实际快检应用中的需要。在实际工作中只需要扫描样品的近红外光谱图,将其分别代入模型即可预测出龙胆水溶性浸出物及龙胆苦苷的含量。

与传统的高效液相色谱法相比,近红外光谱法具有操作过程方便快捷,无需预处理,一次测定仅需几分钟即可完成,并且结果较准确的特点,可广泛应

用于龙胆原药材质量控制中的快速、批量检测,在龙胆药材的质量控制及在线监测等方面具有广阔的应用前景,为采购药材提供一种随时检测分析的便捷方法,同时也对种植、生产、使用单位快速了解龙胆质量也具有重要意义。

近红外光谱技术能够实现企业在生产过程中的快速检测龙胆水溶性浸出物及龙胆苦苷含量,降低人工成本。但这种快捷、简便、低成本的快速现场检测方法,其准确度、精密度较传统检测方法而言会有所降低^[16]。便携式近红外作为一种快速测定方法,其稳定性也一定程度上受外界因素制约。后期可以考虑通过不断增加样本量及样品筛选,在保证模型的精确性的情况下,不断提高模型的预测性、稳定性和适用性,推广近红外光谱技术在中药材大规模生产过程中的作为一种快速检测方法的应用。近年来,我国越来越重视近红外分析仪器在中药品质分析中的应用,相信未来手持式近红外光谱仪也会不

断提高宽光谱范围、高分辨率、高信噪比,朝着高性能、低成本的方向一直发展。

参考文献

- 1 Zhang JH, Yin HB, Zhang JK, et al. Herbal textual analysis of Gentianae Radix et Rhizoma [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(13): 163-169.
- 2 Fu ZX. Analysis of quality standard system of Gentianae Radix et Rhizoma [J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2014, 10(18): 27-28.
- 3 Jia CC, Li JN, Li R, et al. Development and prospect of the rapid analysis technology for traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38: 1476-1483.
- 4 Li Z, Zhou LH, Ye ZL, et al. Research progress on application of near-infrared reflectance spectroscopy in pharmaceutical analysis [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2016, 39: 686-692.
- 5 Geng XT, Wang FQ, Xie CX, et al. Establishment of rapid analytical models for total iridoid glycosides and total phenethyl alcohol glycosides in leaves of *Rehmannia glutinosa* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 786-796.
- 6 Wu LH. Application and inheritance of traditional Chinese medicine Gentianae Radix et Rhizoma [J]. World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med Mater Med(世界科学技术-中医药现代化), 2011, 13: 340-347.
- 7 Zhou YF, Yang ZX, Dong LY, et al. Rapid determination of moisture and ethanol extract content in Notoginseng Radix et Rhizoma by NIRS [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2018, 41: 1994-1996.
- 8 Chinese pharmacopoeia commission. 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: 96.
- 9 Wu LM, Yang Q, Zhou S, et al. Rapid determination of polydatin, resveratrol and emodin in Rhizoma Polygoni Cuspidati by NIRS [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32: 1583-1586.
- 10 Zhang DW, Bai Y, Xie CX, et al. Rapid determination of specnuezhenide in Fructus Ligustris Lucidum by near infrared spectroscopy [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27: 1379-1384.
- 11 Chen MJ, Chen HP, Ding L, et al. Establishment of near-infrared quantitative analysis model for three flavonoids in Citri Reticulatae Pericarizarpium [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2016, 27: 1614-1619.
- 12 Bai Y, Fan MY, Lei JW, et al. Rapid quantitative determination of ethanol-extract in Aurantii Fructus Immaturus by near-infrared spectroscopy [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(1): 73-76.
- 13 Zhang XD, Ma JF, Luo JM, et al. Rapid determination of active constituents of *Platycodon grondiflornm* by micro-infrared spectrometer [J]. World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med Mater Med(世界科学技术-中医药现代化), 2018, 20: 637-643.
- 14 Cai JL, Huang JY, Deng WT, et al. Rapid determination of ethanol extracts content of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. by near-infrared spectroscopy [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2012, 47: 2026-2028.
- 15 Fu XH, Hu JH, Li JC, et al. Qualitative and quantitative detection of *Poria cocos* by near infrared reflectance spectroscopy [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40: 280-286.
- 16 Xue X, Xiong H, Liu MN, et al. Quantitative analysis of chromones in Saposhnikoviae Radix by near-infrared spectroscopy [J]. World Chin Med(世界中医药), 2019, 14: 571-576.