

基于 HPLC 和 NIRS 建立快速检测 盾叶薯蓣中 3 种皂苷含量的方法

陶晓赛¹, 陈志红^{1,2}, 谢彩侠^{1,2*}, 张娟^{1,2*}, 龚海燕^{1,2}, 刘庆普^{1,2}, 雷敬卫^{1,2}

¹河南中医药大学药学院; ²河南省中药质量控制与评价工程技术研究中心, 郑州 450046

摘要: 建立一种快速检测盾叶薯蓣中三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷和薯蓣皂苷含量的方法。本研究以全国 8 个产地的盾叶薯蓣药材为研究对象, 首先, 利用 HPLC-ELSD 建立同时测定盾叶薯蓣中三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷及薯蓣皂苷含量的方法, 并对不同产地的盾叶薯蓣药材进行三种皂苷的含量测定; 其次, 扫描盾叶薯蓣药材样品的近红外光谱, 分别将盾叶薯蓣药材校正集样品的三种皂苷含量作为参考值, 结合其近红外光谱图, 以内部交叉验证决定系数 (R^2)、校正均方根偏差 (RMSEC)、预测均方根偏差 (RMSEP) 及预测性能指数 (PI) 作为评价所建定量检测模型性能的指标, 利用 TQ8.0 分析软件结合偏最小二乘法 (PLS), 通过光谱预处理方法筛选、建模波段及主成分数的确定分别建立盾叶薯蓣药材中三种皂苷含量的快速检测模型; 最后, 分别利用验证集样品对所建三种皂苷检测模型的预测准确性进行检验。盾叶薯蓣样品中三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷和薯蓣皂苷含量测定方法经考察符合定量分析的要求; 盾叶薯蓣药材中三角叶薯蓣皂苷定量检测模型的 R^2 为 0.981 17、RMSEC 为 0.086 3、RMSEP 为 0.063 8、PI 为 90.5; 盾叶新苷定量检测模型的 R^2 为 0.982 64、RMSEC 为 0.042 0、RMSEP 为 0.027 4、PI 为 91.1; 薯蓣皂苷定量检测模型的 R^2 为 0.943 64、RMSEC 为 0.009 90、RMSEP 为 0.005 41、PI 为 85.8; 经统计学检验, 三个模型对三种皂苷的预测值与实测值之间无显著性差异。该方法可以相对快速、准确测定盾叶薯蓣中三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷及薯蓣皂苷的含量, 为盾叶薯蓣药材质量的快速评价提供依据。

关键词: HPLC; NIRS; 盾叶薯蓣; 偏最小二乘法; 三角叶薯蓣皂苷; 盾叶新苷; 薯蓣皂苷

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)2-0305-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.2.015

Establishing a method for rapid detection of three saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright based on HPLC and NIRS

TAO Xiao-sai¹, CHEN Zhi-hong^{1,2}, XIE Cai-xia^{1,2*},

ZHANG Juan^{1,2*}, GONG Hai-yan^{1,2}, LIU Qing-pu^{1,2}, LEI Jing-wei^{1,2}

¹School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine; ²Henan Province Traditional

Chinese Medicine Quality Control and Evaluation Engineering Technology Research Center, Zhengzhou 450046, China

Abstract: To establish a rapid method for the determination of deltonin, zingiberensis newsaponin and dioscin in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. The research objects were the medicinal materials of *D. zingiberensis* from 8 producing areas in China. Firstly, using HPLC-ELSD established the method of simultaneously determining the contents of deltonin, zingiberensis newsaponin and dioscin, which could be used to determine the contents of three saponins in *D. zingiberensis* from different habitats. Secondly, the samples were scanned for obtaining their near infrared spectrums, the contents of three saponins in the calibration set samples of *D. zingiberensis* were taken as reference values respectively, combined with their near-infrared spectrums, the internal cross-validation determination coefficient (R^2), corrected root mean square deviation (RMSEC), predicted root mean square deviation (RMSEP) and predicted performance index (PI) were used as indicators to evaluate the performance of the quantitative test model. TQ 8.0 analysis software were combined with partial least squares (PLS) to estab-

收稿日期: 2019-08-17 接受日期: 2019-12-17

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1700705); 河南省高等学校重点科研项目 (20A360016)

* 通信作者 Tel: 86-013673651577; E-mail: nanyangxcx@126.com, nanyang_xcx@163.com

lish a rapid detection model for the content of three saponins in *D. zingiberensis* through screening the spectrum pretreatment method, determining the modeling band and principal component number. Finally, the validation set samples was used to test the prediction accuracy of the three saponin detection models respectively, the content determination methods of deltonin, zingiberensis newsaponin and dioscin in *D. zingiberensis* samples met the requirements of quantitative analysis after investigation. The R^2 , RMSEC, RMSEP and PI of the quantitative detection model for deltonin in *D. zingiberensis* were 0.981 17, 0.086 3, 0.063 8 and 90.5 respectively. The R^2 , RMSEC, RMSEP and PI of the quantitative detection model of zingiberensis newsaponin were 0.982 64, 0.042 0, 0.027 4 and 91.1 respectively. The R^2 of dioscin quantitative detection model was 0.943 64, RMSEC was 0.009 90, RMSEP was 0.005 41, PI was 85.8; Statistical tests showed that there was no significant difference between the predicted and measured values of the three saponins in the three models. The method can be used to determine the contents of deltonin, zingiberensis newsaponin and dioscin in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright relatively quickly and accurately, which provide the basis for rapid quality evaluation of *D. zingiberensis*.

Key words: HPLC; NIRS; *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; PLS; deltonin; zingiberensis newsaponin; dioscin

盾叶薯蓣(*D. Zingiberensis* C. H. Wright)为薯蓣科(Dioscoreaceae)薯蓣属植物,俗称黄姜、火头根等,根茎中含有薯蓣皂苷、三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷等大量的甾体皂苷类成分^[1],其含量的高低直接影响着药材质量的优劣^[2]。盾叶薯蓣为我国特有品种,根茎中含有的薯蓣皂苷元含量为1.1%~16.15%,是合成避孕药、甾体激素类药物的重要原料^[3]。盾叶薯蓣不仅作为提取原料,还作为治疗心脑血管疾病^[4]的临床用药。盾叶薯蓣作为提取薯蓣皂苷元重要的药源植物和治疗心脑血管疾病的临床用药极大促进了盾叶薯蓣相关产业的发展。

由于药材需求量大,目前盾叶薯蓣已实现了大面积栽培,全国河南、湖南、湖北、陕西、甘肃等10多个省市60多个县市在发展盾叶薯蓣产业,基地面积已逾10多万公顷^[5]。盾叶薯蓣为多年生药材,产地较多,研究发现生长环境及栽培年限对盾叶薯蓣药材的质量影响较大^[6],但关于不同产地盾叶薯蓣皂苷类成分的评价研究鲜有报道。另外,盾叶薯蓣中皂苷类成分的含量测定目前多采用HPLC法^[7-9],该方法分析过程中样品前处理较为复杂,分析时间较长,试剂用量较大,检测成本较高,不能实现盾叶薯蓣皂苷类成分的批量快速检测,因此,在盾叶薯蓣药材的收购过程中很难实现按质论价。NIRS是一种检测速度较快、操作简便、低消耗、绿色环保的分析方法,已广泛应用于中药材的质量控制中^[10-12]。基于此,本研究首先建立了同时测定盾叶薯蓣中薯蓣皂苷、三角叶薯蓣皂苷及盾叶新苷的HPLC-ELSD方法,然后对全国不同产地盾叶薯蓣中三种甾体皂苷的含量进行测定,同时结合NIRS技术建立快速评价盾叶薯蓣中三种皂苷含量的方法,为盾叶薯蓣药材的质量评价及收购过程中实现“按质论价”提供

科学方法。

1 材料

1.1 仪器

Nicolet 6700型傅立叶变换近红外光谱仪(美国Thermo公司);1200型HPLC仪(美国Agilent公司);ELSD 2000 ES型蒸发光散射检测器(德国Alltech公司);KQ-500B型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FW-100型高速万能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司);DZKW-4型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司);101-3AB型电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司);予华牌循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);Milli-Q Reference纯水机(上海和泰仪器有限公司);CPA225D型十万分之一电子天平;万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.2 试剂

乙腈(色谱纯)(TEDIA公司);甲醇(分析纯)(天津市富宇精细化工有限公司);无水乙醇(分析纯)(天津市致远化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯)(TEDIA公司);娃哈哈饮用纯净水(济南娃哈哈恒枫饮料有限公司);三角叶薯蓣皂苷(成都克洛玛生物科技有限公司,生产批号:CHB17051,纯度:HPLC \geq 98%);盾叶新苷(成都克洛玛生物科技有限公司,生产批号:CHB170718,纯度:HPLC \geq 98%);薯蓣皂苷(成都曼思特生物科技有限公司,生产批号:MUST-17090203,纯度:HPLC \geq 98.78%)。所有对照品均符合含量测定要求。

1.3 样品

实验用样品分别从陕西安康市、陕西商洛市、湖北十堰市、湖北丹江口、湖南怀化沙湾乡、甘肃陇南、湖北宜昌市、河南南阳市采集盾叶薯蓣药材共101

批,经河南中医药大学陈随清教授鉴定为盾叶薯蓣 (*D. zingiberensis*) 的根茎。去除泥沙等杂质,切片,

于鼓风干燥箱中 55 ℃ 烘干至恒重,粉碎后过 65 目药典筛,置于干燥器内备用。样品信息见表 1。

表 1 盾叶薯蓣样品信息

Table 1 Sample informations of *D. zingiberensis*

样品编号 No.	样品信息 Sample information	样品编号 No.	样品信息 Sample information	样品编号 No.	样品信息 Sample information
S1 ~ S5	陕西安康 1 年生	S36 ~ S40	湖北十堰 3 年生	S69 ~ S72	河南南阳 2 年生
S6 ~ S10	陕西安康 2 年生	S41 ~ S45	湖北十堰 4 年生	S73 ~ S75	河南南阳 2 年生
S11 ~ S15	陕西安康 3 年生	S46 ~ S50	湖北十堰 5 年生	S76 ~ S80	湖北宜昌 1 年生
S16 ~ S20	陕西商洛 4 年生	S51 ~ S55	湖南怀化沙湾乡	S81 ~ S85	湖北宜昌 2 年生
S21 ~ S25	陕西商洛 5 年生	S56 ~ S60	湖北丹江口 3 年生	S86 ~ S91	湖北宜昌 3 年生
S26 ~ S30	湖北十堰 1 年生	S61 ~ S64	甘肃陇南 3 年生	S92 ~ S96	湖北宜昌 4 年生
S31 ~ S35	湖北十堰 2 年生	S65 ~ S68	河南南阳 1 年生	S97 ~ S101	湖北宜昌 5 年生

2 方法与结果

2.1 不同产地盾叶薯蓣中三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷及薯蓣皂苷的含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 C_{18} (4.6 × 250 mm, 5 μm); 以乙腈:水 (60:40) 为流动相; 流速为 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量为 2 μL。蒸发光散射检测器 (ELSD) 参数: 气体流量 2.5 L/min, 漂移管温度 115 ℃, 增益值为 2。

2.1.2 对照品溶液制备

精密称定三角叶薯蓣皂苷 1.38 mg、盾叶新苷 1.93 mg、薯蓣皂苷 1.69 mg, 分别置于 5 mL 容量瓶中, 并用甲醇定容至刻度, 制备浓度分别为 0.276、0.386、0.338 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

称取约 2.0 g 盾叶薯蓣根茎粉末, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 80% 乙醇溶液 50 mL, 称重, 85

℃ 加热回流提取 40 min, 放冷, 补足失重; 摇匀, 过滤, 精密移取 15 mL 续滤液于蒸发皿中, 浓缩至近干, 残渣用甲醇溶解, 转移并定容至 5 mL 容量瓶, 摇匀、滤过, 即得。

2.1.4 线性关系考察

用“2.1.2”项下制备的对照品溶液, 将三角叶薯蓣皂苷对照品分别制成 0.027 6、0.069、0.138、0.276、0.345、0.414 mg/mL 的梯度浓度; 盾叶新苷对照品分别制成 0.193、0.386、0.965、1.54 4、1.93 0、2.31 6 mg/mL 的梯度浓度; 薯蓣皂苷分别制成 0.067 6、0.101 4、0.135 2、0.338、0.507、0.845 mg/mL 的梯度浓度; 按照“2.1.1”项下的色谱条件, 分别进样测定三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷及薯蓣皂苷的峰面积, 以峰面积积分值的对数值为纵坐标 (Y), 以对照品浓度的对数值为横坐标 (X 进行线性回归, 并绘制标准曲线, 结果如表 2 所示。

表 2 线性关系考察

Table 2 Investigation of linear relationship

成分 Component	回归方程 Regression equation	相关系数 R^2 Correlation coefficient R^2	线性范围 Linearity range (mg/mL)
三角叶薯蓣皂苷 Deltonin	$Y = 0.986 4X + 5.682 7$	0.999 2	0.027 6 ~ 0.414
盾叶新苷 Zingiberensis newsaponin	$Y = 1.45 36X + 7.395 4$	0.999 7	0.193 ~ 2.316
薯蓣皂苷 Dioscin	$Y = 0.371 5X + 6.976 9$	0.999 3	0.067 6 ~ 0.845

2.1.5 精密度考察

精密吸取对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果三角叶薯蓣皂

苷、盾叶新苷、薯蓣皂苷的峰面积 RSD 值分别为 2.2%、2.7%、2.9%。表明仪器的精密度良好。

2.1.6 稳定性考察

将同一供试品溶液分别在样品制备后 0、4、8、12、24 h 按“2.1.1”项下色谱条件进样,记录峰面积,结果三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷、薯蓣皂苷的峰面积 RSD 值分别为 2.3%、2.7%、2.7%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性考察

精密称取同一批宜昌样品 6 份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样,记录峰面积,计算含量。结果三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷、薯蓣皂苷含量的 RSD 值分别为

2.4%、0.5%、2.8%,说明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率考察

称取南阳 2 年生样品 6 份,每份约 1.0 g,精密称定,分别置于锥形瓶中并精密加入适量三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷、薯蓣皂苷对照品溶液,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样,记录峰面积并计算平均加样回收率及 RSD,结果见表 3、4、5。由表 3、表 4、表 5 可知,三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷、薯蓣皂苷的平均回收率分别为 99.80%、101.4%、99.30%,RSD 分别为 0.3%、0.6%、1.3%。

表 3 三角叶薯蓣皂苷加样回收率考察结果

Table 3 Test results of sample recovery rate of deltonin

称样量 Weighing sample quantity (g)	样品含量 Content in sample (mg)	对照品加入量 Standard added (mg)	测得量 Founded (mg)	加样回收率 Sample recovery (%)	平均加样回收率 Average sample recovery (%)	RSD (%)
1.000 5	9.695	9.69	19.356	99.70	99.80	0.3
1.000 3	9.693	9.69	19.373	99.90		
1.000 2	9.692	9.69	19.392	100.1		
0.999 6	9.685	9.69	19.336	99.60		
0.999 5	9.685	9.69	19.307	99.30		
1.000 4	9.694	9.69	19.394	100.1		

表 4 盾叶新苷加样回收率考察结果

Table 4 Test results of sample recovery rate of zingiberensis newsaponin

称样量 Weighing sample quantity (g)	样品含量 Content in sample (mg)	对照品加入量 Standard added (mg)	测得量 Founded (mg)	加样回收率 Sample recovery (%)	平均加样回收率 Average sample recovery (%)	RSD (%)
1.000 5	4.922	4.92	9.901	101.2	101.4	0.6
1.000 3	4.921	4.92	9.890	101.0		
1.000 2	4.921	4.92	9.939	102.0		
0.999 6	4.918	4.92	9.946	102.2		
0.999 5	4.918	4.92	9.877	100.8		
1.000 4	4.922	4.92	9.901	101.2		

表 5 薯蓣皂苷加样回收率考察结果

Table 5 Test results of sample recovery rate of dioscin

称样量 Weighing sample quantity (g)	样品含量 Content in sample (mg)	对照品加入量 Standard added (mg)	测得量 Founded (mg)	加样回收率 Sample recovery (%)	平均加样回收率 Average sample recovery (%)	RSD (%)
1.000 5	0.820	0.80	1.634	101.7	99.30	1.3
1.000 3	0.820	0.80	1.606	98.30		
1.000 2	0.820	0.80	1.618	99.70		
0.999 6	0.820	0.80	1.606	98.20		
0.999 5	0.820	0.80	1.614	99.30		
1.000 4	0.820	0.80	1.610	98.70		

2.1.9 样品含量测定

取各样品按“2.1.3”项下制备供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件分别测定 101 盾叶薯蓣样

品中三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷和薯蓣皂苷的含量,对照品及样品 HPLC 色谱图见图 1,含量测定结果见表 6。

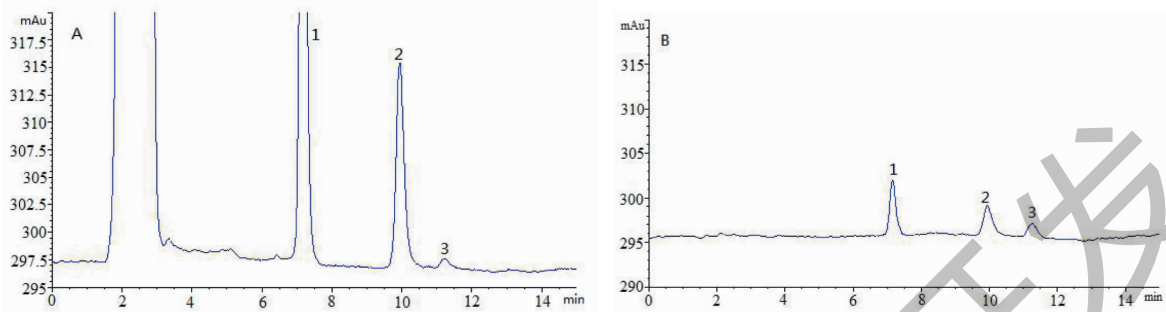


图 1 盾叶薯蓣样品 (A) 和对照品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of *D. zingiberensis* sample (A) and reference substance (B)

注:1. 盾叶新苷;2. 三角叶薯蓣皂苷;3. 薯蓣皂苷。Note:1. Zingiberensis newsaponin;2. Deltonin;3. Dioscin.

表 6 101 份盾叶薯蓣样品中三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷、薯蓣皂苷含量测定结果

Table 6 Determination results of deltonin, zingiberensis newsaponin and dioscin in 101 samples of *D. zingiberensis* (%)

样品编号 No.	三角叶薯蓣皂苷 Deltonin	盾叶新苷 Zingiberensis newsaponin	薯蓣皂苷 Dioscin	样品编号 No.	三角叶薯蓣皂苷 Deltonin	盾叶新苷 Zingiberensis newsaponin	薯蓣皂苷 Dioscin
S1	2.738	1.327	0.143	S52	1.074	0.857	0.133
S2	2.250	1.287	0.106	S53	1.074	0.890	0.133
S3	1.767	1.314	0.126	S54	1.332	0.827	0.173
S4	1.975	1.223	0.095	S55	1.311	1.171	0.164
S5	1.906	1.520	0.098	S56	0.691	0.514	0.072
S6	1.215	1.135	0.075	S57	0.585	0.471	0.061
S7	1.009	0.911	0.066	S58	0.774	0.506	0.093
S8	1.177	1.107	0.067	S59	0.795	0.589	0.077
S9	1.603	1.021	0.068	S60	0.754	0.513	0.092
S10	0.782	0.804	0.084	S61	0.898	1.008	0.022
S11	1.292	0.813	0.122	S62	1.448	0.726	0.108
S12	1.726	1.010	0.105	S63	1.166	0.553	0.060
S13	1.229	0.833	0.086	S64	1.469	0.522	0.095
S14	1.155	0.800	0.117	S65	0.714	0.443	0.069
S15	1.012	0.617	0.089	S66	0.739	0.455	0.049
S16	0.731	0.410	0.088	S67	0.568	0.504	0.091
S17	1.176	0.528	0.098	S68	1.587	0.963	0.130
S18	0.639	0.633	0.109	S69	0.751	1.377	0.080
S19	0.610	0.642	0.054	S70	1.779	0.670	0.106
S20	0.591	0.607	0.062	S71	1.193	0.532	0.110
S21	0.758	0.781	0.054	S72	1.026	0.449	0.082
S22	0.763	0.680	0.116	S73	0.814	0.566	0.104
S23	0.441	0.667	0.066	S74	1.120	0.496	0.046

续表 6 (Continued Tab. 6)

样品编号 No.	三角叶薯蓣皂苷 Deltonin	盾叶新苷 Zingiberensis newsaponin	薯蓣皂苷 Dioscin	样品编号 No.	三角叶薯蓣皂苷 Deltonin	盾叶新苷 Zingiberensis newsaponin	薯蓣皂苷 Dioscin
S24	0.897	0.785	0.074	S75	1.719	0.719	0.119
S25	0.503	0.505	0.031	S76	0.512	0.622	0.109
S26	0.290	0.591	0.072	S77	0.400	0.514	0.118
S27	0.461	0.581	0.116	S78	0.356	0.872	0.056
S28	0.319	0.393	0.086	S79	0.398	0.529	0.065
S29	0.400	0.507	0.102	S80	0.401	0.639	0.080
S30	0.410	0.530	0.103	S81	0.545	0.437	0.069
S31	0.460	0.522	0.110	S82	0.598	0.690	0.109
S32	0.448	0.522	0.109	S83	0.413	0.401	0.054
S33	0.389	0.594	0.080	S84	0.460	0.664	0.088
S34	0.290	0.531	0.072	S85	0.429	0.683	0.110
S35	0.316	0.562	0.099	S86	0.343	0.745	0.095
S36	0.414	0.566	0.111	S87	0.274	0.684	0.070
S37	0.506	0.703	0.122	S88	0.318	0.726	0.083
S38	0.473	0.714	0.097	S89	0.302	0.834	0.130
S39	0.630	0.703	0.093	S90	0.263	0.817	0.107
S40	0.597	0.697	0.116	S91	0.459	0.525	0.080
S41	0.705	0.667	0.116	S92	0.366	0.877	0.138
S42	0.703	0.799	0.137	S93	0.363	0.790	0.141
S43	1.039	0.908	0.129	S94	0.377	1.023	0.136
S44	0.518	0.644	0.093	S95	0.372	0.958	0.136
S45	1.086	0.812	0.116	S96	0.336	0.912	0.114
S46	0.563	0.589	0.109	S97	0.834	0.894	0.060
S47	1.228	0.662	0.104	S98	0.476	0.709	0.047
S48	1.068	0.693	0.117	S99	0.542	1.004	0.033
S49	1.239	0.741	0.109	S100	0.553	0.939	0.051
S50	0.920	0.661	0.099	S101	0.395	0.757	0.047
S51	0.710	0.810	0.150				

2.2 盾叶薯蓣样品 NIR 的采集

分别取盾叶薯蓣样品粉末适量平铺于近红外光谱石英样品杯中,采用积分球漫反射法,在分辨率 8 cm^{-1} 、扫描次数 64、扫描范围 $12\ 000\sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$ 、温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度 28% 的采集条件下,扫描 101 份盾叶薯蓣样品的 NIR,每份样品重复采集 3 次,取其平均光谱(见图 2)。

2.3 三角叶薯蓣皂苷 NIR 定量分析模型的建立

首先,根据 101 份盾叶薯蓣样品中三角叶薯蓣皂苷的 HPLC 含量测定结果,将特异值和含量接近的样品剔除,保留三角叶薯蓣皂苷模型建立所用的

有效样品。按照校正集与验证集样品比例约 4:1 及验证集样品含量范围在校正集样品含量范围内的原则从有效样品中选择模型建立所用的校正集样品和模型验证所需的验证集样品。然后,将盾叶薯蓣校正集样品中三角叶薯蓣皂苷的 HPLC 含量测定结果作为参考值分别输入 TQ Analyst 8.0 分析软件,结合校正集样品的 NIR,利用偏小二乘法(PLS),以 R^2 、RMSEC、RMSEP 及 PI 为评价指标,考察光谱预处理方法、光谱范围以及主因子数等对所建模型性能的影响,其中 R^2 越接近 1, RMSEP 和 RMSEC 值越接近于 0、PI 值越接近于 100 的模型适用性越强,

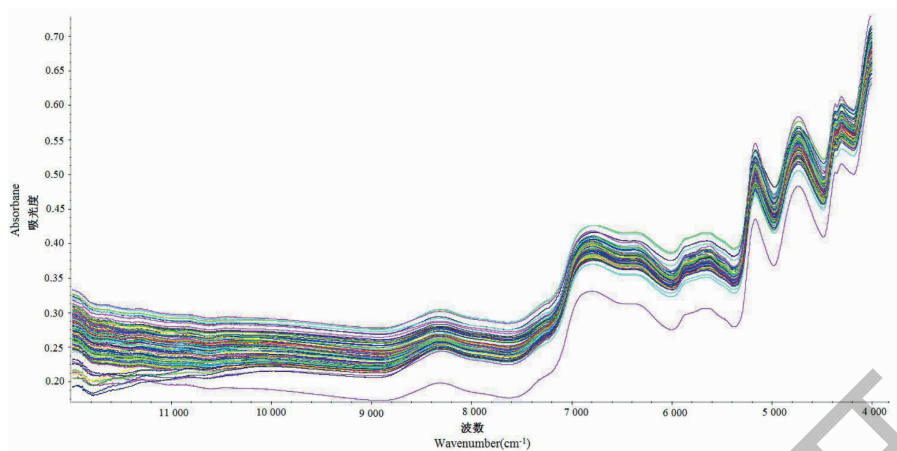


图 2 101 份盾叶薯蓣样品的 NIR 叠加图

Fig. 2 NIR overlay maps of 101 samples of *D. zingiberensis*

预测结果越准确。最后,用所建模型预测验证集样品的三角叶薯蓣皂苷含量,以预测值与参考值的平均相对偏差和 t 检验结果,验证所建模型的推广能力和预测能力。

2.3.1 校正集与验证集的选择

通过分析盾叶薯蓣样品中三角叶薯蓣皂苷含量的分布特点及校正集与验证集样品的选择原则,最终确定 98 份样品用于其定量模型的建立及验证,其中 78 份为校正集,20 份为验证集。校正集样品三角叶薯蓣皂苷的含量分布范围为 0.209% ~ 1.975%, 平均值 1.092%; 验证集 0.290% ~ 1.177%, 平均值 0.734%。

2.3.2 光谱预处理方法的选择

不同产地及年限的盾叶薯蓣样品由于颜色、表面纹理、密度等物理性质的差异,会干扰其近红外光

谱中与样品化学成分相关的光谱信息,而合适的光谱预处理方法可以有效消除物理因素的干扰,提高 NIR 与待测化学成分的相关性。本研究考察了不同光谱预处理方法对模型性能的影响(见表 7)。综合分析表 7 中不同光谱预处理方法的 R^2 、RMSEC、RMSEP 和 PI 值,选择 SNV + SD 为建立三角叶薯蓣皂苷定量分析模型的最佳光谱预处理方法,原始光谱经最佳光谱预处理方法后所得的近红外光谱见图 3。

2.3.3 建模波段范围的选择

合适的建模波段可以避免冗余信息对有效光谱信息的干扰,提高所建模型的预测准确性。不同建模波段下模型的性能结果(见表 8)显示,在 9 036.80 ~ 5 186.92 cm^{-1} 的波段范围内,所建三角叶薯蓣皂苷的定量分析模型整体性能较好。

表 7 不同光谱预处理方法对三角叶薯蓣皂苷定量分析模型性能的影响

Table 7 Effect of different spectral pretreatment methods on quantitative model of deltonin

光谱预处理方法 Spectral pretreatment method	R^2	RMSEC	RMSEP	PI
MSC + FD	0.902 27	0.193	0.144	78.5
MSC + SD	0.981 15	0.086 4	0.064 6	90.3
SNV + FD	0.949 17	0.141	0.101	84.9
SNV + SD	0.981 17	0.086 3	0.063 8	90.5
SNV + SD + SG	0.924 07	0.171	0.140	79.1
SNV + SD + ND	0.873 50	0.218	0.146	78.2
MSC + SD + ND	0.873 64	0.217	0.149	77.8
MSC + SD + SG	0.835 27	0.246	0.221	66.9

注:MSC:多元散射校正,FD:一阶导数,SD:二阶导数,SG:滤波法,ND:直接差分法

Note:MSC:Multiplicative signal correction,FD:First derivative,SD:Second derivative,SG:Savitzky-Golay filter,ND:Norris derivative filter

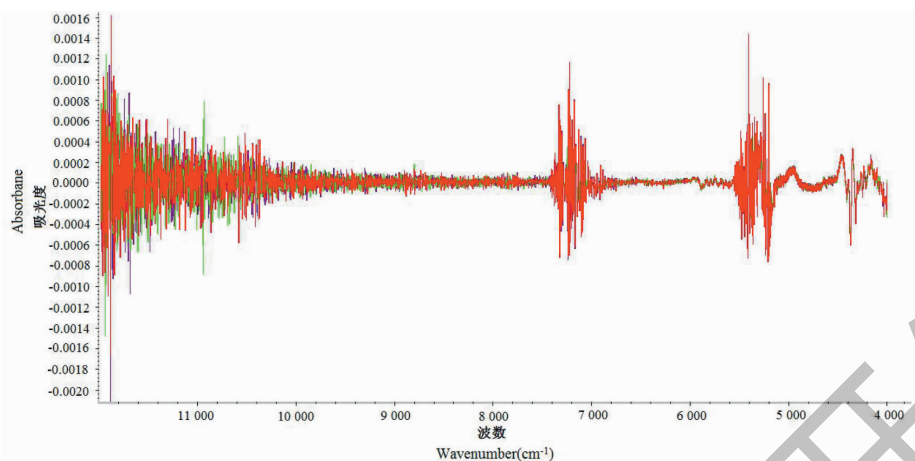


图3 Constant + FD 预处理后近红外光谱图

Fig. 3 Near infrared spectrum of Constant + FD after pretreatment

表8 不同的光谱范围对三角叶薯蓣皂苷模型性能的影响

Table 8 Influence of different spectral range on the performance of deltonin model

光谱范围 Spectral range (cm ⁻¹)	R ²	RMSEC	RMSEP	PI
9 036.80 ~ 5 186.92	0.981 17	0.086 3	0.063 8	90.5
9 698.57 ~ 4 771.37	0.987 91	0.069 3	0.102	84.8
11 152.99 ~ 8 125.43	0.965 71	0.116	0.195	70.9
6 737.80 ~ 4 103.53	0.987 55	0.070 3	0.171	74.4
8 362.13 ~ 6 090.90	0.996 67	0.036 4	0.163	75.6
9 734.90 ~ 4 179.82	0.987 37	0.070 8	0.107	84.0

2.3.4 主因子数的选择

主因子数作为模型建立的重要参数,其取值的多少直接影响模型的预测性能。主因子数过多,会将代表噪音的主因子引入模型中,导致计算结果出现“过拟合”的现象,主因子数过少,则不能完全反映样品被测组分产生的光谱变化,使模型的预测性能下降^[13]。本研究以 RMSECV 为优化参数,根据 RMSECV 值随主因子数的变化情况(见图4)选择合适的主因子数。结果显示,RMSECV 最小值所对应的主因子数为6,且随着主因子数的增加,RMSECV 值的变化趋于稳定,因此,选择6为建立三角叶薯蓣皂苷定量模型的最佳主因子数。

2.3.5 三角叶薯蓣皂苷 NIR 定量分析模型的建立

运用 TQ Analyst 8.0 分析软件结合 PLS 法,分别选择最优的光谱预处理方法、建模波段范围、最佳主因子数建立三角叶薯蓣皂苷的 NIR 定量分析模

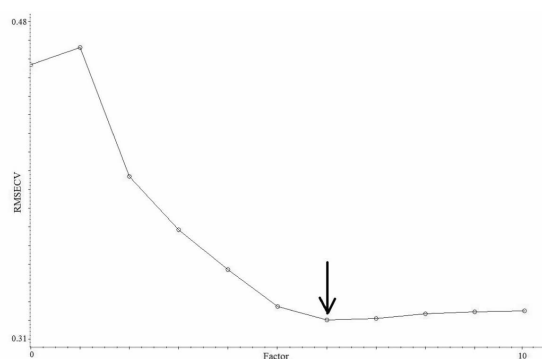


图4 三角叶薯蓣皂苷 NIR 模型主因子数对 RMSECV 的影响

Fig. 4 Effects of principal factor numbers of deltonin NIR model on RMSECV

型,三角叶薯蓣皂苷模型的 NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关图及偏差见图5。结果表明该模型的 R² 为 0.981 1、RMSEC 为 0.086 3、RMSEP 为 0.063 8、RMSECV 为 0.320 26、PI 为 90.5,模型性能较好。

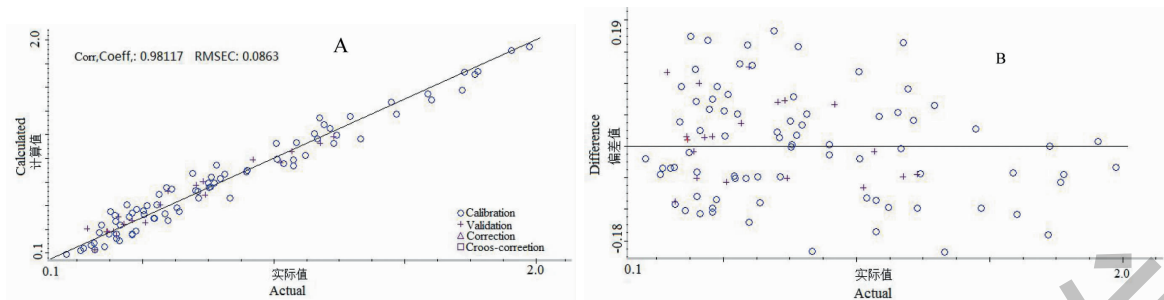


图 5 三角叶薯蓣皂苷 NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关图 (A) 及偏差图 (B)

Fig. 5 Correlation chart (A) and deviation chart (B) between NIR predicted value and HPLC reference value of deltonin

2.3.6 盾叶薯蓣中三角叶薯蓣皂苷定量分析模型的验证

将 20 份三角叶薯蓣皂苷验证集样品的近红外光谱图输入到所建立的定量分析模型中,将三角叶薯蓣皂苷的预测值与 HPLC 参考值进行比较 (见表 9)。结果表明,NIR 模型预测的三角叶薯蓣皂苷含

量测定结果与常规 HPLC 法测定结果接近,预测值和参考值的配对样本 t 检验结果显示 $t = -0.975, P = 0.342 > 0.05$,因此,预测值和参考值在统计学上无显著性差异。该实验结果表明所建立的模型预测性能较好,可以用于盾叶薯蓣中三角叶薯蓣皂苷的含量测定。

表 9 验证集样品三角叶薯蓣皂苷 NIR 预测值与 HPLC 参考值的比较

Table 9 Comparison of NIR predicted value and HPLC reference value of deltonin in verification set samples

样品编号 No.	参考值 Reference value	预测值 Predicted value	绝对偏差 Absolute deviation	相对偏差 Relative deviation	P
S8	1.177	1.128	-0.049	-0.042	0.342
S13	1.229	1.184	-0.045	-0.037	
S16	0.731	0.804	0.073	0.100	
S30	0.410	0.509	0.099	0.241	
S33	0.389	0.380	-0.009	-0.023	
S34	0.290	0.408	0.118	0.407	
S40	0.597	0.723	0.126	0.211	
S41	0.705	0.775	0.07	0.099	
S48	1.068	1.060	-0.008	-0.007	
S50	0.920	0.986	0.066	0.072	
S66	0.739	0.688	-0.051	-0.069	
S67	0.568	0.605	0.37	0.651	
S72	1.026	0.961	-0.065	-0.063	
S76	0.512	0.455	-0.057	-0.111	
S80	0.401	0.350	-0.051	-0.127	
S85	0.429	0.443	0.014	0.033	
S88	0.318	0.230	-0.088	-0.277	
S91	0.459	0.475	0.016	0.035	
S92	0.366	0.377	0.011	0.030	
S93	0.363	0.379	0.016	0.044	

2.4 盾叶新苷、薯蓣皂苷红外定量分析模型的建立

根据盾叶薯蓣样品中盾叶新苷和薯蓣皂苷的含量分布情况,选择 77 份为校正集、18 份为验证集用于盾叶新苷定量校正模型的建立及验证;选择 72 份为校正集、18 份为验证集用于薯蓣皂苷定量校正模型的建立及验证。按照“2.3”项下三角叶薯蓣皂苷定量模型的建立方法分别对两个模型建立过程中的光谱预处理方法、建模波段范围及主因子数等条件进行优化,确定建模条件,并对模型进行验证。结果表明,在光谱预处理方法为 SNV + SD + SG、建模波段为 8 147.69 ~ 5 320.49 cm^{-1} 、主因子数为 7 的建模条件下,盾叶新苷定量分析模型的 R^2 、RMSEC、RMSEP、RMSECV 及 PI 分别为:0.982 64、0.042 0、0.027 4、0.141 21、91.1;在光谱预处理方法为 MSC + SD、建模波段为 9 253.34 ~ 5 787.98 cm^{-1} 、主因子数为 4 的建模条件下,薯蓣皂苷定量分析模型的 R^2 、RMSEC、RMSEP、RMSECV 及 PI 分别为 0.943 64、0.009 90、0.005 41、0.024 14、85.8。经验证,两个模型的 NIR 预测值与 HPLC 参考值的绝对与相对偏差均较小,配对样本 t 检验结果的 P 值均大于 0.05,说明预测值与参考值在统计学上无显著性差异,因此所建立的模型可以用于盾叶新苷及薯蓣皂苷的含量测定。盾叶新苷、薯蓣皂苷 NIR 定量分析模型的 RMSECV 值随主因子数变化的曲线分别见

图 6、图 7, NIR 预测值与参考值的比较结果分别见表 10、表 11。

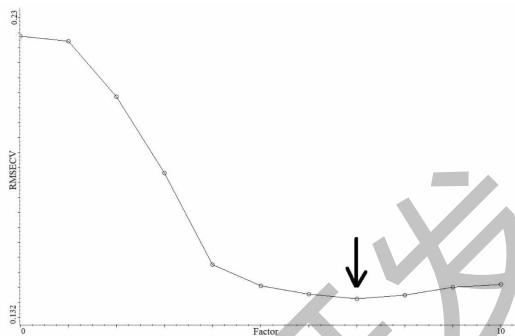


图 6 盾叶新苷 NIR 模型主因子数对 RMSECV 的影响

Fig. 6 Effects of principal factor numbers of zingiberensis newsaponin NIR model on RMSECV

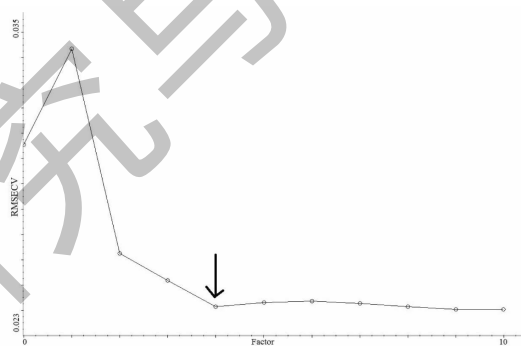


图 7 薯蓣皂苷 NIR 模型主因子数对 RMSECV 的影响

Fig. 7 Effects of principal factor numbers of dioscin NIR model on RMSECV

表 10 验证集样品盾叶新苷 NIR 预测值与 HPLC 参考值的比较

Table 10 Comparison of NIR predicted value and HPLC reference value of zingiberensis newsaponin in verification set samples

样品编号 No.	参考值 Reference value	预测值 Predicted value	绝对偏差 Absolute deviation	相对偏差 Relative deviation	P
S11	0.813	0.820	0.007	0.009	0.116
S15	0.617	0.653	0.036	0.058	
S22	0.680	0.700	0.020	0.029	
S27	0.581	0.577	-0.004	-0.007	
S30	0.530	0.515	-0.015	-0.028	
S31	0.522	0.499	-0.023	-0.044	
S39	0.703	0.726	0.023	0.033	
S40	0.697	0.758	0.061	0.088	
S50	0.661	0.688	0.027	0.041	
S54	0.827	0.798	-0.029	-0.035	
S58	0.506	0.539	0.033	0.065	
S67	0.504	0.504	0.000	0.000	

续表 10(Continued Tab. 10)

样品编号 No.	参考值 Reference value	预测值 Predicted value	绝对偏差 Absolute deviation	相对偏差 Relative deviation	<i>P</i>
S74	0.496	0.480	-0.016	-0.032	
S80	0.639	0.636	-0.003	-0.005	
S84	0.664	0.699	0.035	0.053	
S96	0.912	0.946	0.034	0.037	
S97	0.894	0.920	0.026	0.029	
S100	0.939	0.911	-0.028	-0.030	

表 11 薯蓣皂苷 NIR 模型预测值与参考值的比较

Table 11 Comparison of NIR predicted value and HPLC reference value of dioscin in verification set samples

样品编号 No.	参考值 Reference value	预测值 Predicted value	绝对偏差 Absolute deviation	相对偏差 Relative deviation	<i>P</i>
S9	0.068	0.063	-0.005	-0.074	0.089
S16	0.088	0.086	-0.002	-0.023	
S30	0.103	0.095	-0.008	-0.078	
S36	0.111	0.110	-0.001	-0.009	
S39	0.093	0.101	0.008	0.086	
S41	0.116	0.121	0.005	0.043	
S45	0.116	0.123	0.007	0.060	
S46	0.109	0.109	0.000	0.000	
S56	0.072	0.074	0.002	0.028	
S58	0.093	0.087	-0.006	-0.065	
S63	0.060	0.065	0.005	0.083	
S65	0.069	0.079	0.010	0.145	
S71	0.110	0.116	0.006	0.055	
S72	0.082	0.087	0.005	0.061	
S81	0.069	0.068	-0.001	-0.014	
S84	0.088	0.092	0.004	0.045	
S86	0.095	0.099	0.004	0.042	
S89	0.130	0.136	0.006	0.046	

3 讨论

药用植物次生代谢产物含量的高低从某种意义上来说是其种质与生态环境双重作用的结果^[14]。盾叶薯蓣是一种药效成分比较明确的药用植物,喜温暖,不耐严寒。根据中国薯蓣属植物资源调查资料,盾叶薯蓣适宜生长于海拔 100 ~ 1 500 m 的河谷、山地、落叶阔叶混交林的边缘或稀疏的常绿灌木林内^[15],而生态环境对盾叶薯蓣形态性状与有效成分积累等方面影响较大。Li 等^[16]研究认为,盾叶薯

蓣皂苷类成分的含量与居群环境存在一定的相关性,其中最主要的影响因素可能是海拔高度。本研究利用 HPLC-ELSD 法对全国主要产地盾叶薯蓣中三种皂苷类成分的含量进行分析,结果表明,不同产地样品中的 3 种甾体皂苷含量差别较大,其中陕西安康产盾叶薯蓣中三角叶薯蓣皂苷和盾叶新苷含量较高,湖南怀化产的薯蓣皂苷含量较高。虽然三种皂苷均属于甾体皂苷类成分,但其含量的变化规律并不一致,这可能是由于不同甾体皂苷生物合成途

径中的关键酶基因存在差异,而且相同关键酶基因的表达受生态环境的影响较大。

NIRS 是一种利用化学计量学软件从样品复杂的近红外光谱图中提取和样品待测性质相关的信息,建立图谱特征与待测性质之间关系的数学模型以实现快速预测样品特征的技术,它对样品的处理过程要求比较简单,因此可以在较短的时间内对样品的性状及质量做出初步的综合评价,是一种快速、无损的绿色分析方法。该方法的预测准确性取决于样品数量、待测性质的特征及待测性质参考值的测定准确性,其中样品的数量及代表性是决定所建模型预测性能好坏的前提。如果要对样品中某一化学成分的含量进行预测,则要求此化学成分具有较高的含量。本研究采集的盾叶薯蓣样品涵盖全国 8 个产地及不同的生长年限,具有一定的代表性,而且含量测定结果表明三种甾体皂苷的含量均相对较高,因此,可以利用近红外光谱法进行快速测定。经过基础数据的测定、建模条件的优选,本研究建立了可以相对快速、准确预测盾叶薯蓣根茎中三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷及薯蓣皂苷含量的近红外地定量分析模型,为盾叶薯蓣的质量快速评价提供一种可参考的方法,为盾叶薯蓣实现按质论价收购提供可能。

参考文献

- 1 Zhao QB, Huang W, Wu WF. Study on the water-insoluble steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* and cell growth inhibitive effects of steroidal saponins against human hepatocellular carcinoma hep G2 cells [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2010, 25:527.
- 2 Qing SH, Yuan LH, Yang NY, et al. Study on steroidal compounds from *Dioscorea zingiberensis* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2006, 29:1174-1176.
- 3 Yang RT, Tang SR, Pan FS. Advances in study of *Dioscorea zingiberensis* [J]. Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源), 2007, 26(4):1-5.
- 4 Ren H. Molecular mechanism of Diao Xinxuekang in protecting myocardial ischemia reperfusion injury [J]. Guangdong Voc Tech Edu Res(广东职业技术教育与研究), 2016, 1:41-44.
- 5 Liu R, Fang Y. Preliminary study on the distribution and utilization status of yellow yam [J]. Guangdong Chem Ind(广东化工), 2014, 41:144-145.
- 6 Xie CX, Zhu XL, Zuo CF, et al. Study of influence factors on

- content of effective component in *Dioscorea zingiberensis* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(10):90-93.
- 7 Wang YH, Kang AL, Fan BJ, et al. HPLC-ELSD simultaneous determination of three components in root of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29:739-742.
 - 8 Gai YN, Wang Q, Chen J, et al. Rapid quantitative detection of 4 saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright by LC-MS/MS [J]. Res Practice Chin Med(现代中药研究与实践), 2017, 31(2):54-56.
 - 9 Zhang XX, Liang JR, Su Q, et al. Simultaneous content determination of five saponins in the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright by HPLC-ELSD [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33:1235-1238.
 - 10 Tang Y, Wang WH, Liu JD, et al. Quality evaluation and geographic identification of American ginseng by near infrared spectroscopy [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2018, 41:540-545.
 - 11 Xie CX, Wang LN, Liu R, et al. Application of NIRS and HPLC fingerprint in quality evaluation of corn stigma [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36:356-361.
 - 12 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.
 - 13 Xie CX, Li YJ, ZHANG M, et al. Establishment of rapid method for analysis of content of rehmanioside A, rehmanioside D and leonuride in *Rehmanniae Radix* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(6):47-54.
 - 14 Jing WG. Studies on chemical constituents and quality standards of *Dioscorea panthaica* Prain et Burk [D]. Beijing: Institute of Chinese Materia Medica; China Academy Chinese Medical Sciences(北京:中国中医科学院中药研究所), 2007.
 - 15 Qin SY, Ding JC, Shu S, et al. Resource situation and protection countermeasures of *Dioscorea zingiberensis* in China [J]. Res Dev Market(资源开发与市场), 2004, 20:263-265.
 - 16 Li ZY, Yang CX, Chen GX, et al. Studies on the growth and morphological variation of leaves and saponin content of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright from different populations [J]. Life Sci Res(生命科学研究), 2003, 7(1):58-64.