

近红外光谱法快速测定枇杷叶中齐墩果酸的含量

李蕾蕾, 黄洁燕, 周文婷, 姬生国*

(广东药学院 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立枇杷叶药材中齐墩果酸含量的近红外光谱定量模型, 快速测定枇杷叶中齐墩果酸含量。方法: 用高效液相色谱法测定 140 批枇杷叶中齐墩果酸含量, 采用标准归一化法(SNV)、一阶导数法预处理近红外光谱, 结合偏最小二乘法建立枇杷叶中齐墩果酸含量的定量模型, 并进行了内部交叉验证和 18 个枇杷叶样品的外部预测验证。结果: 所建立的齐墩果酸近红外光谱定量分析模型, 内部交叉验证决定系数达到 0.939 23, 校正均方差为 0.106, 预测均方差为 0.131, 内部交叉验证均方差为 0.216 75。结论: 该方法快速、准确, 为枇杷叶中化学成分快速定量和质量控制提供了方法和依据。

[关键词] 枇杷叶; 高效液相色谱; 齐墩果酸含量; 近红外光谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0086-04

[doi] 10.11653/syfy2014050086

Rapid Determination of Oleanolic Acid Content in *Eriobotrya japonica* by Near-Infrared Spectroscopy

LI Lei-lei, HUANG Jie-yan, ZHOU Wen-ting, JI Sheng-guo*

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for the determination of oleanolic acid content in *Eriobotrya japonica* by near-infrared spectroscopy. **Method:** The oleanolic acid content of 140 samples was determined by the method of HPLC. NIR spectrograms were measured, the standard normal variate (SNV) and first derivative were used as spectral preprocessing options, and calibration model of the oleanolic acid content was established by the partial least squares regression analysis. The models were verified by internal cross validation and external predictive validation with 18 loquat samples. **Result:** The correlation coefficients, the root-mean-square error of calibration, the root-mean-square error of prediction and the root-mean-square error of cross-validation of the calibration model for ethanol extracts content were 0.939 23, 0.106, 0.131 and 0.216 75. **Conclusion:** The results show that the method is fast, accurate, and can be used as a rapid qualitative of chemical composition and quality control methods of *E. japonica*.

[Key words] *Eriobotrya japonica*; HPLC; oleanolic content; NIRS

枇杷叶来源于蔷薇科枇杷属植物枇杷的干燥叶, 其中的三萜酸类成分表现出抗肿瘤、抗病毒、抗

炎和抗-HIV 等活性^[1]。近红外光谱分析技术(NIRS)具有光谱信息量丰富、图谱稳定性高、取得图谱比较容易、不需要对样品做任何化学处理的优点^[2]。本课题组已经利用该技术对广陈皮、广藿香进行了定性及定量模型的建立^[3-9], 本文利用近红外光谱分析技术建立枇杷叶中齐墩果酸含量的近红外定量模型, 以期实现枇杷叶药材的快速、准确的齐墩果酸含量测定。

1 材料

2012 年 2 月和 11 月期间分别采集于广东、湖

[收稿日期] 20130703(001)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2009B030801044)

[第一作者] 李蕾蕾, 硕士研究生, 从事中药资源开发与道地性研究, Tel: 020-39352327, E-mail: 837127578@qq.com

[通讯作者] * 姬生国, 博士, 教授, 从事中药资源、中药质量标准及中药新药研究以及分子生药学研究, Tel: 020-39352327, E-mail: shengguo_ji@163.com

北、河南、四川、浙江等省,经广东药学院中药学院姬生国教授鉴定,为蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶。枇杷叶药材经低温烘干后,粉碎过 60 目筛,保存于自封袋中,置于干燥器中备用。

傅立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 (Nicolet 6700 型,美国 Thermo 公司)。1120 型全自动高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), ODS- C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m, 美国迪马公司), BIY211b 型电子天平 (日本岛津公司), KQ-500DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 试剂除流动相为色谱纯外其余均为分析纯。齐墩果酸对照品 (批号 MUST-11090502), 购于成都曼思特生物科技有限公司。

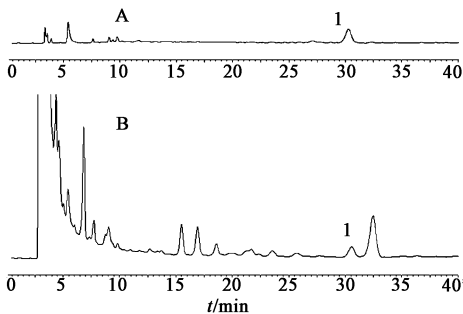
2 方法与结果

2.1 枇杷叶中齐墩果酸含量的测定方法^[10]

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称定样品 1 g, 置具塞锥形瓶中, 加乙醇 50 mL, 称重, 超声提取 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 补足质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品 5.66 mg, 加甲醇溶解, 制成每 1 mL 含齐墩果酸对照品 0.566 mg 溶液, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱条件 ODS- C_{18} 色谱柱, 流动相甲醇-0.9% 磷酸二氢钠 (86:14), 流速 0.8 mL \cdot min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μ L。保留时间约为 31 min。见图 1。



A. 对照品溶液; B. 样品溶液; 1. 齐墩果酸

图 1 齐墩果酸对照品、枇杷叶供试品 HPLC

2.1.4 线性考察试验 精密吸取对照品贮备液 2.0, 1.0, 1.0, 2.0, 1.0, 1.0 mL, 分别加入甲醇定容至 5, 5, 10, 25, 25, 50 mL, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过。按 2.1.3 项下进样测定, 以对照品峰面积为纵坐标 (Y), 浓度为横坐标 (X),

得回归方程 $Y = 1.0 \times 10^8 X + 262\ 047$ ($r = 1$), 表明齐墩果酸对照品在质量浓度为 0.011 3 ~ 0.566 g \cdot L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μ L, 按 2.1.3 项下连续进样测定 6 次, 计算齐墩果酸含量 RSD 2.3%, 说明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密称定样品约 1.0 g, 按 2.1.1 项下制成供试品溶液, 按 2.1.3 项下于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 分别进样测定, 计算齐墩果酸含量 RSD 0.07%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批样品 6 份, 每份 1.0 g, 精密称定, 分别按 2.1.1 项下方法制备成供试品溶液, 按 2.1.3 项下方法进样测定, 计算齐墩果酸含量 RSD 1.3%。表明该方法的重复性良好。

2.1.8 回收率试验 精密称取 6 份已知含量的样品 0.4 g。精密加入 0.483 mg 齐墩果酸对照品, 按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.3 项下方法进样测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 枇杷叶中齐墩果酸加样回收率试验

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.481 18	0.483	0.948 41	96.736		
2	0.481 18	0.483	0.941 12	95.226		
3	0.480 94	0.483	0.942 69	95.601		
4	0.480 22	0.483	0.946 59	96.558	96.97	1.63
5	0.480 34	0.483	0.958 44	98.984		
6	0.481 06	0.483	0.957 75	98.693		

2.1.9 样品含量测定 将所有样品按 2.1.1 项下供试品制备方法制备成供试品溶液, 按 2.1.3 项下含量测定方法进行测定, 记录色谱图, 计算各样品中齐墩果酸含量, 140 份枇杷叶中齐墩果酸含量在 1.556% ~ 3.146%, 且分布均匀, 符合正态分布。

2.2 近红外光谱的采集 取样品粉末 4 g, 混合均匀后放入石英样品杯, 轻轻振摇使分布均匀。采用积分球漫反射测样, 分辨率 8 cm⁻¹, 扫描 64 次, 扫描范围 12 000 ~ 4 000 cm⁻¹, 温度 (22 \pm 0.5) $^{\circ}$ C, 相对湿度 35% ~ 40%。每批样品重复装样并扫描 5 次, 求平均光谱。140 批样品的近红外光谱叠加图见图 2。

2.3 光谱预处理^[11] 在近红外光谱采集时, 有许多高频随机噪声、基线漂移、信号本底、样品颗粒大小和光散射等的噪声信息带入光谱中, 干扰近红外吸收强度和样品中各指标的关系, 并影响近红外模

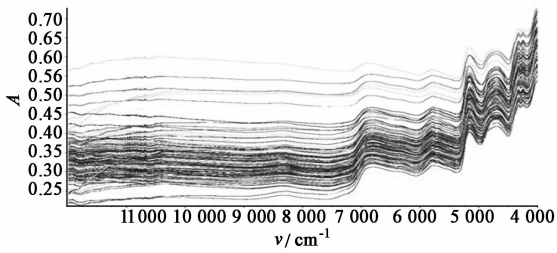


图 2 140 批枇杷叶样品的近红外光谱叠加图

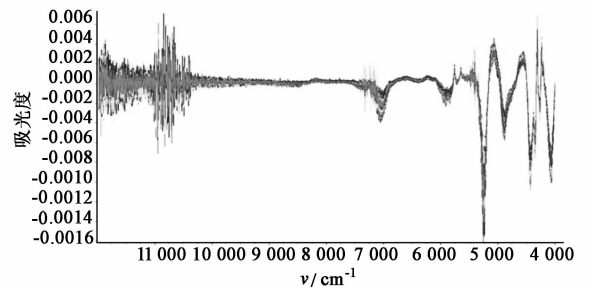


图 3 样品的一阶导数光谱图

型的可靠性和准确性,因此,必须对原始光谱进行预处理。本实验结合多元散射校正(MSC)、标准归一化法(SNV)、一阶或二阶导数和平滑进行光谱预处理。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对模型建立的影响。其中, R^2 越接近 1,说明样品分析值与近红外预测值相关性越好;RMSEC, RMSEP 越小,说明模型的预测性能越好。最终由 TQ Analyst 软件筛选出最优化的模型,参数见表 2。

表 2 不同预处理方法对模型性能的影响

光谱预处理方法	R^2	RMSEC	RMSEP
Constant(无)	0.609 28	0.246	0.245
SNV(标准归一化)	0.837 63	0.169	0.169
MSC(多元散射校正)	0.834 65	0.171	0.169
First Derivative(一阶导数)	0.901 13	0.134	0.184
SNV + First Derivative	0.939 23	0.106	0.131
MSC + First Derivative	0.934 78	0.110	0.127
SNV + First Derivative + SG 卷积平滑	0.919 89	0.121	0.137
SNV + First Derivative + ND 平滑	0.681 11	0.227	0.179

2.4 建模波段的选择^[12] 通过对光谱进行一阶导数处理,从处理后的光谱图可以看出不同批次样品的近红外光谱十分接近,无法直接判定熊果酸的含量与个别波长点的吸光度之间的相关性,不可能从某一个波长点来确定其含量,必须在一定的区间内建立数学模型来确定近红外光谱与含量间的定量关系。由于采用全谱建模工作量大、噪音干扰多,多采用优选特征波段进行建模。以 R^2 , RMSEC, RMSEP 等为综合指标,考察不同建模波段对模型的影响,通过与其他波段的对比,可以看出在 7 589 ~ 5 950 cm^{-1} 样品吸收强度存在差异,信息量丰富,噪音干扰小,能反映出样品的性质和组成间的关联,确定此波段为最佳建模区间,见图 3、表 3。

2.5 主因子数(factor)的选定^[13] 选用偏最小二乘法(PLS)建立定量模型,为了充分利用光谱信号

表 3 不同建模区间对模型性能的影响

建模区间/ cm^{-1}	R^2	RMSEC	RMSEP
11 272 ~ 4 046	0.788 57	0.190	0.158
9 921 ~ 4 484	0.934 50	0.110	0.132
7 589 ~ 5 950	0.939 23	0.106	0.131
7 892 ~ 6 025; 5 615 ~ 4 196	0.832 79	0.171	0.160

的有效信息,同时避免过度拟合现象,需对主因子的阶数进行合理选择。以校正集内部交叉验证均方差(RMSECV)为优化参数, RMSECV 越小,模型的预测精度越高,当 RMSECV 值最小时,所选主因子数最佳。本实验 RMSECV 最小值为 0.216 75,对应的最佳主因子数为 8。见图 4。

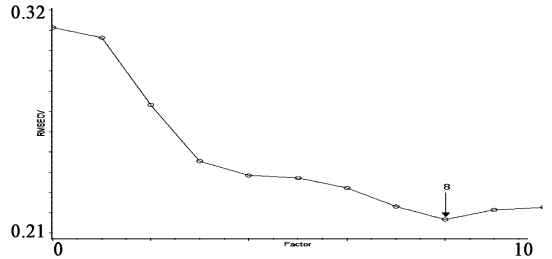


图 4 RMSECV 值随主成分的变化

2.6 校正模型的建立 运用 TQ8.0 定量分析软件中 PLS 法建立校正模型,图 5 为 140 份校正集样品交互验证得到的 NIR 预测值与参考值之间的相关图,可以看出,校正集样品均匀地分布在回归线的两侧。经内部交叉验证得 RMSEC = 0.106, $R^2 = 0.939 23$ 。图 6 为校正集样本与预测集样本的 NIR 预测值与参考值之间的绝对偏差图,可以看出, NIR 测定值与药典法测定值之间的绝对偏差在 ± 0.4 。

2.7 校正模型和验证 近红外光谱经过 SNV + First Derivative 处理后,在 7 589 ~ 5 950 cm^{-1} ,选择前 8 个主成分建立了最优校正模型。该模型的 $R^2 = 0.939 23$, RMSEC = 0.106, RMSEP = 0.131。以预测值与实测值的比值为预测回收率,18 批验证集样品的平均预测回收率为 98.887%。见表 4。

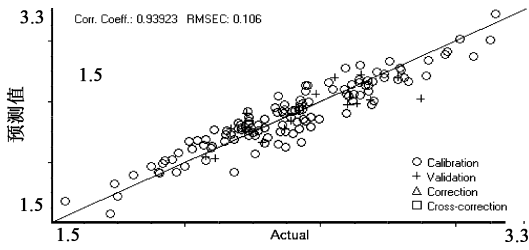


图5 校正集样品交互验证得到的 NIR 预测值
与参考值的相关

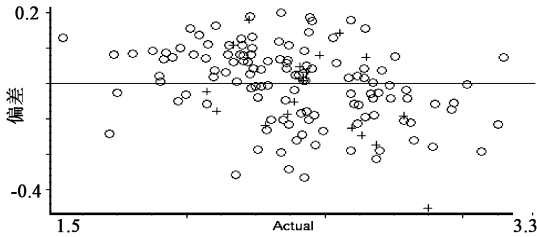


图6 校正集样本与预测集样本的 NIR 预测值
与参考值之间的绝对偏差

表4 验证集样品的预测

No.	实测值 /%	预测值 /%	绝对偏差 /%	平均回收率 /%
1	2.11	2.031	-0.079	98.887
2	2.228	2.408	0.18	
3	2.433	2.464	0.031	
4	2.17	2.278	0.108	
5	2.074	2.05	-0.024	
6	2.482	2.562	0.08	
7	2.787	2.696	-0.091	
8	2.648	2.722	0.074	
9	2.685	2.512	-0.173	
10	2.422	2.431	0.009	
11	2.39	2.338	-0.052	
12	2.872	2.519	-0.353	
13	2.365	2.278	-0.087	
14	2.287	2.168	-0.119	
15	2.411	2.459	0.048	
16	2.599	2.474	-0.125	
17	2.633	2.487	-0.146	
18	2.552	2.694	0.142	

3 讨论

应用近红外光谱法结合偏最小二乘法对枇杷叶

药材中的齐墩果酸的含量建立定量分析模型,以 HPLC 测量值为对照值,通过优化光谱预处理方法和建模区间,建立 NIR 光谱与对照值的校正模型。该方法操作简便、测定速度快、对药材没有损害,可作为枇杷叶药材中齐墩果酸含量的快速检测方法,有望应用于枇杷叶及其制剂的快速、有效的质量控制和大批量产品检测。

[参考文献]

- [1] 李迺娜,周国栋,孔令义. 枇杷叶的化学成分[J]. 中国天然药物,2009, 7(3):190.
- [2] 严衍禄. 红外光谱分析基础与应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005:35.
- [3] 蔡佳良,郭念欣,姬生国. 不同干燥方法对广藿香中百秋李醇含量影响的近红外光谱分析[J]. 云南中医中药杂志,2013, 34(1):53.
- [4] 蔡佳良,李蕾蕾,姬生国. 近红外光谱法快速测定广藿香中水分含量[J]. 医药导报,2012, 31(11):1468.
- [5] 蔡佳良,黄洁燕,邓婉婷,等. 近红外光谱法快速测定广藿香中醇溶性浸出物含量[J]. 中国药学杂志,2012,47(24):2026.
- [6] 蔡佳良,黄洁燕,李蕾蕾,等. 运用近红外光谱法建立广藿香含叶量定量分析模型[J]. 中国现代应用药学,2013, 30(3):260.
- [7] 蔡佳良,郭念欣,黄洁燕,等. 近红外光谱法建立测定广藿香中百秋李醇的定量模型[J]. 中国中药杂志,2012, 37(14):2113.
- [8] 郭念欣,蔡佳良,姬生国. 近红外光谱技术在陈皮道地性分析中的应用[J]. 中国药房,2013, 24(15):1394.
- [9] 郭念欣,蔡佳良,李蕾蕾,等. 运用近红外技术建立藿香正气胶囊中厚朴酚的定量模型[J]. 中国实验方剂学杂志,2013, 19(8):146.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:190.
- [11] 周芸,张晓玲,吴永江,等. 近红外漫反射光谱法快速测定莲房原花青素及多酚含量[J]. 中国药学杂志,2013, 48(3):220.
- [12] 王星,白雁,陈志红,等. 近红外光谱法测定连翘中连翘酯苷含量[J]. 中国中药杂志,2009, 34(16):2071.
- [13] 宋丽丽,范丙义,徐晓杰,等. 近红外光谱法用于六味地黄丸模拟样品中熊果酸的含量测定[J]. 中国中药杂志,2006, 31(19):1590.

[责任编辑 顾雪竹]