

3 讨论

3.1 银杏叶高效液相色谱图可分离出 90 多个峰, 如果按照国家药典委员会关于“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知”进行谱峰分析, 计算共有峰相对保留时间和相对峰面积, 面积小的峰就会作为非共有峰或未被识别出来, 这样部分信息会被丢失, 而采用计算机辅助相似性评价系统软件进行全谱相似度计算, 对每一个采集点信息进行处理, 能全面反映谱峰之间的相似关系。

3.2 在方法学考察中, 本研究对精密度、稳定性、重现性实验数据应用相似度软件处理, 结果相似度均应在 0.90 以上, 符合指纹图谱研究技术要求。

3.3 将不同树龄银杏叶在不同采收期采集的 35 批样品进行相似度分析, 剔除相似度小于 0.90 的样品, 建立相似度大于 0.90 的样品共有模式, 作为

邳州银杏叶的标准指纹图谱, 以此作为银杏叶投料标准。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol. 1. 2005.
- [2] Ju J M, Duan J A, Qian D W, et al. A study on the changing rules for total flavonoids and total terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves in different planting models and growing seasons [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2003, 23 (3): 195-198.
- [3] Qian D W, Ju J M, Zhu L Y, et al. Study on changing rules for total flavonoids and total terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves at different ages of tree and collecting seasons [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (11): 1025-1027.
- [4] Qian D W, Ju J M, Zhu L Y, et al. Analysis of total flavonoids and total terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves in Pizhou [J]. *Res Pract GAP* (GAP 研究与实践), 2002, 2 (1): 36-38.
- [5] You S, Wang L, Jiang Y H, et al. Research on fingerprint chromatography of *Ginkgo biloba* leaves injection [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (3): 216-218.

近红外漫反射光谱技术测定牛膝中蜕皮甾酮

白 雁¹, 余振喜¹, 孙素琴², 朱风云¹, 王 东¹, 陈志红¹

(1. 河南中医学院, 河南 郑州 450008; 2. 清华大学 分析中心, 北京 100084)

摘要:目的 利用近红外漫反射光谱技术和偏最小二乘法测定牛膝中蜕皮甾酮。方法 近红外漫反射光谱技术和偏最小二乘法。结果 所建立预测方程样品的预测值和真实值之间的相关系数为 0.948 9, 该法的建立证明了近红外漫反射光谱技术应用于中药中化学成分测定的可行性。结论 同其他测定方法相比该法操作简单、速度快、效率高、无污染、费用低、无需复杂的前处理, 可以直接对大量未知样品进行测定。

关键词:牛膝; 蜕皮甾酮; 近红外漫反射光谱

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)09-1391-04

Determination of ecdysterone in *Radix Achyranthis Bidentatae* by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy

BAI Yan¹, YU Zhen-xi¹, SUN Su-qin², ZHU Feng-yun¹, WANG Dong¹, CHEN Zhi-hong¹

(1. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Analyzing Centre of Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: **Objective** To determine ecdysterone content in *Radix Achyranthis Bidentatae* by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy (NIRDRS) combined with partial least squares (PLS). **Methods** NIRDRS and PLS. **Results** The correlation coefficient of the quantitative mathematics model between the prediction and the true values was 0.948 9. It is feasible to applying the above established method to determination of chemical constituents in Chinese materia medica. **Conclusion** Compared with other methods, the method is simple, rapid, high efficient, low expenditure, no pollution and with preparation undone and is suit for large quantity of unknown samples.

Key words: *Radix Achyranthis Bidentatae*; ecdysterone; near-infrared diffuse reflectance spectroscopy (NIRDRS)

牛膝又名百倍、鸡胶骨,为苋科多年生草本植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根。牛膝为常用中药,应用历史比较悠久,其味甘、苦、酸,性平,归肝肾经,具有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经、引血下行之功效,民间多用于治疗瘀血、痼肿、经闭、尿血、癰疽、痿痹、腰膝骨痛、四肢拘挛等症^[1]。

近红外漫反射光谱 (near-infrared diffuse reflectance spectroscopy, 简称 NIRDRS) 技术具有样品制备简单、分析速度快、费用较低、应用范围广、可以实现非破坏性和无污染性测试等优点^[2]。近年来,已在农业、食品、石油化工^[3]和生物化学^[4]等行业得到了较为广泛的应用。虽然近红外光谱分析技术已成功地应用于化学药品的质量分析和控制^[5,6],但定量分析中药中有效成分的研究却很少报道。本实验采用近红外漫反射光谱技术结合化学计量学中的偏最小二乘法测定了牛膝中蜕皮甾酮,结果基本令人满意,从而为近红外漫反射光谱技术应用于大量中药样品中某一大类有效成分(如总黄酮类、总蒽醌类)的测定提供了很有意义的借鉴作用。

1 实验部分

1.1 仪器设备和测试条件:采用 Perkin-Elmer 公司的 Spectrum One 近红外光谱仪。积分球漫反射,近红外光源,Pbs 检测器,扫描范围 10 000~4 000 cm^{-1} ,扫描信号累加 32 次,分辨率 8 cm^{-1} ,OPD 速度 0.2 cm/s ,增益为 1,以金箔为参比,每个样品重复 5 次,求平均光谱。

1.2 样品来源及制备:牛膝采于各产地,经河南中医学院生药教研室主任陈随清博士鉴定为苋科多年生草本植物牛膝 *A. bidentata* Bl. 的干燥根。将牛膝样品在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒重,粉碎,过 100 目筛,取 3 g 过筛后的样品粉末放入石英样品杯中,混合均匀,轻轻压平,放在样品架上进行测定。

1.3 软件及数据处理:采用 Perkin-Elmer 公司的 Quant⁺ 多组分定量分析软件,以其中的 PLS 建立数学模型并进行预测分析。

2 结果与讨论

2.1 牛膝样品的近红外漫反射光谱图:近红外光谱的采集,必须保证在相同的实验条件下进行,装样深度和扫描参数的不同对实验结果将会有较大的影响,只有在严格控制实验条件的基础上,才能获得较好的图谱。本实验采用与仪器配套的石英样品杯装样,以减小由于玻璃杯吸收而造成的信噪比降低,尽量保证样品的松紧度一致,以减少样品不均匀所产生的散射,降低各种主观因素所产生的误差,得到了

比较好的谱图(图 1)。可知,各个产地的牛膝特征图谱非常相似,这是因为牛膝药材所含的化学成分比较复杂,在 10 000~4 000 cm^{-1} ,这些化合物中都有能引起 NIR 吸收的 C-H、N-H 和 O-H 键,另一方面,由于植物类中药含有许多相同的化学成分(如淀粉、纤维素、多糖苷),这些相同成分的吸收峰往往掩盖了代表特征成分的吸收峰,使得 NIR 图非常相似。但是,由于受不同自然条件的影响,不同样品中所含化学成分及其组成会存在差异,因而其近红外光谱也不尽相同,这种差异使得将 NIRDRS 技术应用于牛膝药材的定量分析成分可能。不过由于各样品特征信息隐藏于光谱中,不能再常规的方法对谱图进行解析,因此必须借助化学计量学,经过数学处理,提取特征信息后才能进行分析计算。

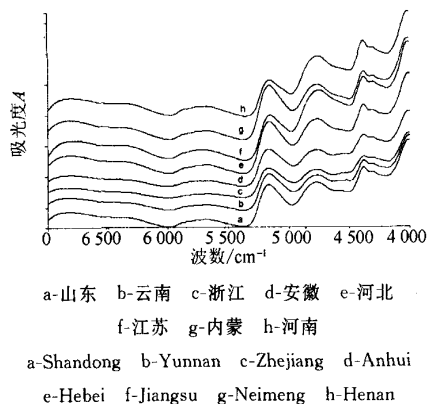


图 1 不同产地牛膝的近红外光谱图

Fig. 1 NIRDR spectra of *Radix Achyranthis Bidentatae* from different habitats

2.2 数学模型的建立:近红外定量分析需要待测成分已知的标准样品集(训练集),根据标准样品集中样品的近红外光谱,运用化学计量学方法建立光谱特征值与待测成分量之间的数学关系(简称数学模型)。当测定未知样品时,只需测定该样品的近红外光谱,然后用已建好的数学模型预测出待测成分的质量分数^[7]。本实验,牛膝中蜕皮甾酮的实际质量分数(化学值)采用高效液相色谱法测得^[8],所得结果见表 1 (1~26 为 2001 年栽培牛膝,27~37 为 2000 或 1999 年栽培牛膝,38~41 为 2001 年野生牛膝,42 为两年生牛膝种根;* 代表预测集样本,其余为训练集样本)。

近红外定量分析中建立预测方程常用的计算方法主要有^[9]:逐步回归法(stepwise regression, SRG)。该法在近红外定量中的应用较早,主要是从多个变量(波长)中选择出一组对待测组分影响显著的波长,目的是使浓度的计算达到较高的精确度,每个

表1 HPLC法对牛膝中蜕皮甾酮的测定结果
Table 1 Determination of ecdysterone in *Radix Achyranthis Bidentatae* by HPLC

序号	产地	蜕皮甾酮 /%	序号	产地	蜕皮甾酮 /%	序号	产地	蜕皮甾酮 /%
1	河南温县	0.145 6	15	河北安国	0.116 2	29	河南济源	0.063 4
2*	河南温县	0.124 5	16	河北安国	0.115 1	30*	河南孟县	0.059 7
3	河南温县	0.114 7	17	内蒙赤峰	0.166 6	31	河南沁阳	0.056 7
4	河南武陟	0.106 5	18*	内蒙赤峰	0.126 5	32*	河南修武	0.055 4
5*	河南武陟	0.102 6	19	内蒙赤峰	0.063 7	33	河南郑州	0.036 4
6	河南武陟	0.095 8	20	山东曲阜	0.077 3	34	河北安国	0.079 8
7	河南武陟	0.103 0	21*	山东曲阜	0.074 1	35	河北安国	0.074 2
8*	河南武陟	0.090 3	22	山东菏泽	0.102 3	36	山东泰安	0.062 5
9*	河南武陟	0.083 7	23*	山东菏泽	0.064 8	37	安徽亳州	0.055 1
10	河南武陟	0.075 2	24	山东菏泽	0.049 5	38	贵州贵定	0.203 4
11	河南武陟	0.075 1	25	安徽亳州	0.074 2	39*	浙江临安	0.188 5
12	河南郑州	0.075 3	26	云南昆明	0.051 0	40	安徽凤阳	0.122 1
13	河北安国	0.125 7	27	河南博爱	0.120 7	41	河南博爱	0.098 7
14*	河北安国	0.118 0	28*	河南济源	0.075 9	42	河南温县	0.130 8

波长都遵循引入 F 检验-剔除-再引入的过程,直到波长无法剔除时为止,同时建立这些波长处光谱参数与浓度之间的线性方程。该方法的缺陷是,只用几个波长点对应的吸光度的值与样品组分量之间建立数学模型,如果光谱中有噪音存在,则该模型就会变得不稳定。因此,这一方法已逐渐被淘汰。主成分回归法(principal components regression, PCR)。该法对波长不进行选择,而是将各个波长点光谱参数进行线性组合,构成相互独立的主成分,然后用样品光谱的主成分(潜变量)与样品组分量建立线性关系,并进行回归的一种方法,其优点在于比逐渐回归利用了更多的光谱信息,是一种常用于定性分析的数学模型。

偏最小二乘法(partial least squares, PLS)。该法较主成分回归法更进一步,是一种相对较新的多元数据处理技术,它在考虑全谱区各波长点的光谱参数的同时,还兼顾到被分析样品内部各成分之间的关系,将两者分别分解,它可以建立同时对多个组分进行预测的回归模型,非常适合多元体系中各变量存在相关性的分析,因此是目前近红外分析中应用较广的算法。

红外光谱中除了包含样品的信息外,还包含有测量的因素。因为光谱比较敏感,外界的影响因素容易叠加到光谱上,从而引起偏差,因此为了得到最佳的结果,需要对光谱数据进行预处理。经常采用的预处理方法有:1)导数处理(derivative)。导数光谱可以增强原谱的信号,如在原谱中的宽峰经过二阶导数处理后,会变得很尖锐,这样有利于在复杂的峰形中更好地确定出峰的准确位置,从而达到鉴别光谱的目的。因此,在定量分析中,导数谱的作用是尽量

降低重叠峰的影响,其中,一阶导数可以消除基线的偏移,二阶导数可以消除基线的线性倾斜。2)多元散射校正(multiplicative scatter correction, MSC)。近红外漫反射光谱中含有多种光的成分:漫反射光、镜面反射光、干涉光、衍射光、吸收光。而影响近红外定量分析标准的重要因素有两个:光的散射和仪器的非线性响应。由于样品漫反射表面的特征不同,产生的附加散射叠加到光谱上,引起样品的光谱之间相差很大,主要表现在光谱的偏移和倾斜上,所以必须用附加散射校正技术进行校正。在进行多元散射校正时,每张标准光谱的散射程度均按照平均光谱的散射进行归一化处理,由此保证每张标准光谱具有相同的散射,同样在预测未知样品时,散射也相同。3)标准正态变量校正(standard normal variate, SNV)。SNV是一种先进的反射校正方法,它可以有效地消除由于散射和样品颗粒度不均匀所引起的多重干扰,这些干扰在近红外漫反射光谱中显得特别突出。无论是否存在De-trending,都可以使用SNV校正方法。De-ternding会引起基线偏移的偏差以及近红外漫反射光谱中经常见到的基线的弯曲。4)平滑(smooth)。平滑的主要功能是为了提高光谱的信噪比,但这也可能会使吸收峰的峰形变宽。在Quant+软件中,采用的是Savitzky-Golay函数对红外光谱进行平滑处理。经平滑处理后,光谱中的随机高频噪音被降低分散,但却不能被完全消除。

根据HPLC的数据,笔者分别对上述3种定量分析算法进行了比较,并决定采用PLS法对牛膝中蜕皮甾酮进行定量分析。实验中随机选取42个样品中的30个样本组成训练集(标样集),所选的样品涵盖了所测量的范围(0.036 4%~0.203 4%),能代表组分的浓度信息。采用牛膝样品的近红外光谱和牛膝中蜕皮甾酮量的化学值之间建立数学模型,选用PLS法进行计算。同时,通过不同组合的反复比较,最终选择7 200~4 000 cm^{-1} ,对谱图进行平滑(9点)、求一阶导数(13点)、多元散射校正(5 300~4 200 cm^{-1})等方法对谱图进行预处理。利用该数学模型预测30个训练集牛膝样品中蜕皮甾酮量(预测值),所得预测值与化学值之间的对应关系如图2,其决定系数 $R^2=0.997\ 9$,模型标准差(Standard error of estimate, SEE)为0.002 3,预测标准差(Standard error of prediction, SEP)为0.003 1,说明该模型的建立比较成功。其中 R^2 为决定系数,是用来评价数学模型好坏的参数。

2.3 预测集牛膝样品中蜕皮甾酮量的预测:将建模

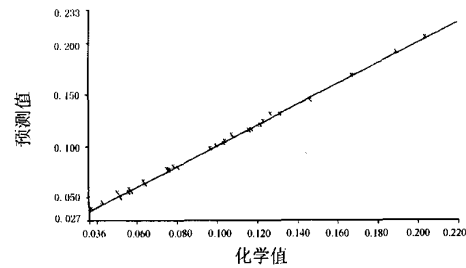


图 2 训练集中蜕皮甾酮预测值与化学值的对应关系
Fig. 2 Correlation plot between prediction and true values in "training samples"

剩余的 12 个样品作为预测集,来检验数学模型的好坏。用所建立的数学模型对预测集牛膝中蜕皮甾酮进行了预测,其结果见表 2,预测集样品的预测值与其自身化学值的对应关系见图 3,其相关系数为 0.948 9。从预测结果来看,样品近红外光谱与牛膝中蜕皮甾酮量之间存在一定的相关性,因此将该方法用于牛膝中蜕皮甾酮的测定基本可行,进一步研究还需扩大标准样品集的数量,以获得结果更可靠的数学模型。但也发现,预测值与化学值的相关系数仅为 0.948 9,不太令人满意,预测结果的偏差也较大,这主要是因为牛膝中蜕皮甾酮的量比较低,从而造成其近红外光谱的信噪比较低,灵敏度下降。如果将该法应用于中药材中某一大类有效成分(如总黄酮类、总蒽醌类、总皂苷类等量较高中药材)的测定,其测定结果的准确性应该有很大的提高。

表 2 预测集牛膝中蜕皮甾酮的预测结果
Table 2 Predicting results of ecdysterone in "predicting samples"

序号	化学值	预测值	偏差
2	0.124 5	0.106 2	-0.018 3
5	0.102 6	0.110 0	0.007 4
8	0.090 3	0.107 4	0.017 1
9	0.083 7	0.100 8	0.017 1
14	0.118 0	0.113 0	-0.005 0
18	0.126 5	0.152 1	0.025 6
21	0.074 1	0.081 5	0.007 4
23	0.064 8	0.042 0	-0.022 8
28	0.075 9	0.102 7	0.026 8
30	0.059 7	0.070 5	0.010 8
32	0.055 4	0.057 0	0.001 6
39	0.188 5	0.189 5	0.001 0

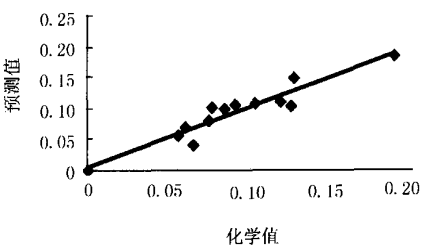


图 3 预测集样品预测值与化学值对应关系
Fig. 3 Correlation plot between prediction and true values in "predicting samples"

3 结论

利用近红外漫反射光谱技术结合化学计量学中的偏最小二乘法用于中药中化学成分的测定是可行的。同其他测定方法相比,该法操作简单,测定速度快,效率高,无污染,费用低,无需复杂的前处理及化学反应过程,可以直接对大量未知样品进行测定,为近红外漫反射光谱技术用于中药有效成分的定量分析提供了可能。

References:

[1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1985.

[2] Wu J G. *The Technology and Application of Neoteric FTIR Spectroscopy* (近代傅里叶变换红外光谱技术及应用) [M]. Beijing: Science Literature Press, 1994.

[3] Xu G T, Yuan H F, Lu W Z. Near-infrared spectroscopy and the progress of application [J]. *Spectroscopy Spectral Anal* (光谱学与光谱分析), 1992, 20(2): 134-142.

[4] Wang L L, Roitberg I A, Meuse C B, et al. Raman and FTIR spectroscopies of fluorescein in solutions [J]. *Spectrochim Acta (A)*, 2001, 57: 1781-1791.

[5] Xiang B R, Li R, Wu Y J, et al. Application of near-infrared spectroscopy in pharomic field [J]. *Computers Applied Chem* (计算机与应用化学), 1999, 15(6): 327-328.

[6] Du D G, Sun S Q, Zhou Q, et al. Quantitative analysis of rutin and vitamin C by NIR FTIR [J]. *Spectroscopy Spectral Anal* (光谱学与光谱分析), 2000, 20(4): 474-476.

[7] Qiao L, Zhao H H, Li X W. Application of NIRS in content of ariginie aspirin [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18(5): 297.

[8] Zhang C Y, Liang S W, Zhang G Q. Determination of ecdysterone in *Achyranthes bidentata* from different locations [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36(10): 699.

[9] Zhao H H. *Researches on the Stability of Predicting Equation to Quantitative Analysis by Near-infrared Spectroscopy* (近红外定量分析预测方程稳定性的研究) [C]. Beijing: Agricultural University of China, 1997.