

短瓣金莲花指标成分的红外光谱快速分析

耿淑琴¹, 樊肇胜², 刘豪¹, 曾胜¹, 张艳玲^{1*}, 董阿力德尔图¹, 周群², 孙素琴²

1. 内蒙古大学化学化工学院, 内蒙古 呼和浩特 010021

2. 清华大学化学系, 北京 100084

摘要 将现代红外光谱分析技术与化学计量学方法相结合, 建立利用红外光谱对短瓣金莲花药材的指标成分进行快速定量分析的方法。以高效液相色谱法获得短瓣金莲花指标成分(荜草苷、牡荆苷)的含量作为参考数据, 以傅里叶变换红外光谱技术获取其红外光谱图, 在此基础上利用化学计量学方法将指标成分与红外光谱图数据关联, 构建指标成分的快速预测模型。以不同比例甲醇-水作为溶剂, 采用室温浸提、加热回流、超声辅助工艺提取获得36个短瓣金莲花药材提取物。利用高效液相色谱法测试短瓣金莲花提取物的荜草苷和牡荆苷含量, 并以傅里叶变换红外光谱仪辅以水平衰减全反射附件测试各样品的红外光谱图。分别选取29个提取物样品作为检验集, 其余为校正集, 采用TQ Analyst EZ Edition软件进行建模。以交叉验证相关系数(R^2)和交叉验证误差均方根(RMSEC)为指标选择光谱预处理方法、定量分析方法和建模波段, 用预测误差均方根(RMSEP)考核模型的预测效果。通过筛选得到优化的光谱预处理方法为标准正态分布校正(SNV)和二阶导数(13点平滑), 定量分析方法为偏最小二乘(PLS)方法, 荜草苷和牡荆苷的最佳波段分别为2050~650和1900~650 cm^{-1} 。以PLS法构建的荜草苷和牡荆苷模型的相关系数分别为0.9198和0.9708, 模型预测结果的相对偏差分别在-2.0%~3.2%和-3.4%~4.7%之间。鉴于红外光谱技术所具有的测试迅速、微观宏观指纹特性、定性定量皆可分析、对环境无污染等特点, 利用红外光谱法可对中药提取物的指标成分进行快速、准确、环保、高效的分析, 为中药的质量控制提供了新的思路和解决方案。

关键词 红外光谱; 快速分析; 短瓣金莲花; 荜草苷; 牡荆苷

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)11-3624-05

引言

短瓣金莲花(*Trollius ledebouri* Reichb)系毛茛科金莲花属植物, 主要分布于我国黑龙江及内蒙古东北部地区, 以花入药, 具有清热解毒、消肿、明目的功效, 主要用于治疗急性扁桃体炎、急性中耳炎、急性淋巴管炎等症^[1-2]。现代药理研究表明, 短瓣金莲花具有抗菌、抗炎镇痛、抗氧化等活性^[3-4]。文献报道短瓣金莲花含有黄酮(苷)类、酚酸类、香豆素类、苯乙素类、挥发油等多种化学成分^[5-8]。目前对该药材质量标准的研究多是以高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定其指标成分, 如荜草苷、牡荆苷等^[9]。高效液相色谱法是目前广泛使用的高效分离分析技术, 然而该法费用较高, 分离方法的建立及测试往往费

时繁琐, 所需大量流动相(甲醇、乙腈等)具有毒性, 而且利用该法定性分析时通常需要借助于标准物质才能完成。因此, 需要一种快速、有效、可行的方法对中药提取物进行整体系统的分析及逐一鉴别。

红外光谱可在其波长范围内提供不同分子特征的光谱信息, 经典的红外光谱多是对单一成分或简单组分进行定性和定量分析^[10]。而要利用红外光谱对食品、药品等复杂体系进行定性和定量分析, 必须与化学计量学的方法结合。化学计量学是一门新兴学科, 它可以应用数学、统计学与信息理论、计算机科学的方法和手段, 最有效地获取体系有用的特征数据, 并通过解析测量数据最大限度地从中提取有关物质的定性、定量、形态、结构等信息^[11]。此外, 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)技术具有指纹特性强、取样量小、操作简便、测试迅速、对环境

收稿日期: 2018-09-28, 修订日期: 2019-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760710), 内蒙古自然科学基金项目(2016MS08121), 内蒙古自治区高等学校科学技术研究项目(NJZZ13015)和内蒙古大学高层次人才引进科研启动项目(Z20100108)资助

作者简介: 耿淑琴, 1993年生, 内蒙古大学化学化工学院硕士研究生 e-mail: gshq010@163.com

* 通讯联系人 e-mail: zhylthu@126.com

无污染等特点。因此,现代红外光谱分析技术结合化学计量学方法,能够为中药、食品等复杂体系的化学成分研究提供直接、快速、有效的手段。目前该技术在中药材、中药饮片、中药制剂以及食品等复杂体系的研究中已有了大量的应用^[12-15]。

以水平衰减全反射(horizontal attenuated total reflection, HATR)附件测试短瓣金莲花不同提取物样品的红外光谱图,借助高效液相色谱法测试各样品的荜草苷和牡荆苷含量,并结合化学计量学方法构建短瓣金莲花的荜草苷和牡荆苷模型,以建立利用红外光谱法对该药材的指标成分进行直接、快速分析的方法。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

短瓣金莲花(*Trollius ledebouri* Reichb)药材购于亳州市京皖中药饮片厂(产地:东北)。石油醚(bp. 30~60 °C)、无水乙醇、95%乙醇、甲醇、磷酸,购自天津市北联精细化学品开发有限公司,均为分析纯;色谱甲醇,天津市风船化学试剂科技有限公司。纯水由 Milli-Q Direct 8 超纯水系统产生。荜草苷(以 97.9%计)、牡荆苷(以 94.9%计)标准品,中国食品药品检定研究院。

Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Fisher); U-3000 高效液相色谱仪(美国戴安); RE-52 旋转蒸发器(上海亚荣); SHB-III 循环水式真空泵(巩义予华); DZF-6090 真空干燥箱(上海一恒); Milli-Q Direct 8 超纯水器(美国 Millipore); PTHW 型调温电热套(巩义予华); VFD-1000 冷冻干燥机(北京博医康); SK6210LHC 双频加热型超声波清洗器(上海科导)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

将短瓣金莲花干燥、粉碎,分别称取适量,采用室温浸提、加热回流和超声辅助 3 种提取工艺,石油醚(b. p. 30~60 °C)脱脂后,依次分别用 100%, 95%, 90%, ..., 20%, 10% 甲醇-水和去离子水提取,各 3 次,提取液过滤、减压浓缩并冷冻干燥,得到 36 个提取物。

1.2.2 HPLC 测定荜草苷和牡荆苷含量

色谱柱: Agilent Technologies ZORBAX SB-C18 4.6 × 250 mm, 5 μm; 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱, 0 min 时甲醇-0.1% 磷酸溶液 10:90, 17 min 时甲醇-0.1% 磷酸溶液 35:65, 40 min 时甲醇-0.1% 磷酸 80:20; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 340 nm; 柱温为 35 °C; 进样量 10 μL。

用 60% 甲醇配制一系列浓度的混标溶液,荜草苷标准品溶液的浓度分别为 150.0, 75.0, 37.5, 18.8 和 9.4 μg · mL⁻¹, 牡荆苷标准品溶液的浓度分别为 170.0, 85.0, 42.5, 21.2 和 10.6 μg · mL⁻¹; 用 60% 甲醇配制短瓣金莲花各提取物的溶液(0.1 mg · mL⁻¹)。以上样品均用 0.45 μm 有机系滤膜过滤后待用。

1.2.3 红外光谱采集

Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪辅以水平衰减全反射(horizontal attenuated total reflectance, HATR)附件,光谱范围 4 000~650 cm⁻¹; DTGS 检测器,分辨率 4 cm⁻¹, 扫描次数 64 次, OPD 速度为 0.2 cm⁻¹ · s⁻¹, 扫描时实时扣除水和 CO₂ 的干扰。

1.2.4 红外光谱方法学考察

1.2.4.1 精密度试验

取同一样品溶液,用 HATR 附件连续测定 5 次。采用 OMNIC 8.2.388 软件中谱图质量检测功能比较 5 张红外光谱图,谱图间相关系数分别为 0.995 6, 0.998 2, 0.998 6, 0.998 1, 1.000 0, RSD=0.16%。

1.2.4.2 重复性试验

同一份样品,分别取样 5 次,用 HATR 附件测定。采用 OMNIC 8.2.388 软件中谱图质量检测功能比较 5 张红外光谱图,谱图间关系数分别为 1.000 0, 0.996 0, 0.997 0, 0.998 4, 0.998 4, RSD=0.15%。

1.2.5 建模方法

采用仪器自带 TQ Analyst EZ Edition 软件进行建模。根据 HPLC 定量分析荜草苷和牡荆苷的结果,分别选取 7 个提取物样品作为检验集,其余为校正集。以交叉验证相关系数(R²)和交叉验证误差均方根(root mean square error of cross-validation, RMSEC)为指标比较不同光谱预处理方法和不同波段对模型效果的影响,对未知样本的预测效果用预测误差均方根(root mean square error of prediction, RMSEP)考核。

2 结果与讨论

2.1 短瓣金莲花不同提取物的荜草苷和牡荆苷含量

将荜草苷和牡荆苷标准品溶液使用高效液相色谱仪分析 3 次,使用该仪器自带软件计算色谱峰积分面积取平均值。以峰面积为横坐标,浓度为纵坐标绘制标准曲线方程分别为,牡荆苷: $y=0.1007x+0.0096$, $R^2=0.9994$; 荜草苷: $y=0.2001x-0.32$, $R^2=0.9997$ 。

将短瓣金莲花各提取物采用相同色谱条件进行测试分析,得到各个荜草苷和牡荆苷含量,见表 1。

2.2 定量分析方法和预处理方法的选择

首先选择不同的定量分析方法:朗伯比尔定律(simple Beer's law)、偏最小二乘法(partial least squares, PLS)和主成分回归法(principal component regression, PCR); 然后选择不同的光谱预处理方法:导数处理(derivative)、多元散射校正(multiplicative scatter correction, MSC)和标准正态变量校正(standard normal distribution verification, SNV)。通过筛选不同的定量分析方法和光谱预处理方法,最终得到了优化的荜草苷和牡荆苷定量分析校正模型,采用 PLS 方法建立模型,标准正态分布 SNV 校正和二阶导数(13 点平滑)预处理。

2.3 波段的选择

PLS 方法可以选择全波段范围作为定量分析区间,亦可以选择部分波段作为定量分析区间。二者各有利弊:全波段范围可以包含全部的样品信息,但是所含背景信息也较多,

表 1 短瓣金莲花各提取物的荜草苷和牡荆苷含量

Table 1 Contents of orientin and vitexin in the different extracts of *Trollius ledebouri*

提取溶剂	荜草苷含量/(mg·g ⁻¹)			牡荆苷含量/(mg·g ⁻¹)		
	室温浸提	加热回流	超声辅助	室温浸提	加热回流	超声辅助
去离子水	59.38	87.92	70.58	18.87	26.20	21.75
10%甲醇-水	68.38	63.73	81.67	23.05	22.03	27.41
20%甲醇-水	72.63	65.83	68.78	19.25	24.26	23.79
30%甲醇-水	71.98	73.38	61.78	20.73	25.63	24.63
40%甲醇-水	71.03	72.03	81.77	22.77	22.68	21.84
50%甲醇-水	73.58	66.48	86.37	22.03	22.03	27.32
60%甲醇-水	70.18	83.52	72.98	23.88	27.04	22.77
70%甲醇-水	71.23	72.33	77.52	23.24	21.94	24.44
80%甲醇-水	84.92	98.01	58.53	26.67	26.95	23.70
90%甲醇-水	84.42	85.17	68.68	24.07	26.11	20.73
95%甲醇-水	88.02	75.78	78.72	25.28	26.58	23.24
100%甲醇-水	97.11	110.91	99.91	26.95	33.90	27.97

会影响样品光谱;选取部分波段虽不能包含全部的样品信息,但是样品的吸收受其他因素的干扰较小。所以,在建立定量模型时要反复实验以确定最佳的波段范围。表 2 和表 3 分别为荜草苷和牡荆苷二阶导数和 SNV 预处理的方法选取不同波段时的建模效果。可见,荜草苷二阶导数和 SNV 预处理方法的最佳波段为 2 050~650 cm⁻¹;牡荆苷二阶导数+SNV 预处理方法的最佳波段为 1 900~650 cm⁻¹。

表 2 不同波段范围对荜草苷建模结果的影响

Table 2 Influence of IR spectra wavelength ranges on the model of orientin

波段范围/cm ⁻¹	R ²	RMSEC	RMSEP
4 000~650	0.919 9	3.71	1.81
3 720~650	0.920 1	3.71	1.81
2 000~1000	0.606 8	7.53	6.75
2 000~650	0.918 2	3.75	1.65
2 100~650	0.918 1	3.75	7.93
2 050~650	0.9517	2.91	1.65

表 3 不同波段范围牡荆苷建模结果的影响

Table 3 Influence of IR spectra wavelength ranges on the model of vitexin

波段范围/cm ⁻¹	R ²	RMSEC	RMSEP
4 000~650	0.856 9	2.53	1.91
3 720~650	0.941 2	1.66	1.04
2 000~1 000	0.895 1	2.19	1.44
2 000~650	0.973 0	1.13	0.691
1 900~650	0.973 0	1.13	0.683
2 050~650	0.973 0	1.13	0.688

2.4 校正模型的建立

根据前述优化方案,以 PLS 方法建立了模型。荜草苷校正模型的 R² 为 0.919 8, RMSEC 为 3.75, 预测误差均方根 RMSEP 为 1.65;牡荆苷校正模型的 R² 为 0.970 8, RMSEC 为 1.18, 预测误差均方根 RMSEP 为 0.704。

利用建立的荜草苷和牡荆苷模型对检验集进行预测,结果如表 4 和表 5 所示。荜草苷模型预测结果的相对偏差在 -2.0%~3.2%之间,牡荆苷模型预测结果的相对偏差在 -3.4%~4.7%之间。

表 4 荜草苷模型的预测结果

Table 4 Prediction results for the model of orientin

验证集	HPLC 测量值 (/mg·g ⁻¹)	红外预测值 (/mg·g ⁻¹)	相对偏差/%
常温-去离子水提取物	59.38	58.44	-1.6
超声 90%甲醇提取物	68.68	68.06	-0.9
常温 30%甲醇提取物	71.98	72.86	1.2
常温 50%甲醇提取物	73.58	73.45	-0.2
回流 60%甲醇提取物	83.52	86.18	3.2
常温 95%甲醇提取物	88.02	89.27	1.4
超声 100%甲醇提取物	99.91	97.90	-2.0

表 5 牡荆苷模型的预测结果

Table 5 Prediction results for the model of vitexin

验证集	HPLC 测量值 (/mg·g ⁻¹)	红外预测值 (/mg·g ⁻¹)	相对偏差/%
常温 20%甲醇提取物	19.25	20.15	4.7
常温 50%甲醇提取物	22.03	22.38	1.6
常温 10%甲醇提取物	23.05	22.85	-0.87
常温 90%甲醇提取物	24.07	24.44	1.6
回流 90%甲醇提取物	26.11	25.22	-3.4
回流 60%甲醇提取物	27.04	26.95	-0.33
超声 100%甲醇提取物	27.97	27.16	-2.9

3 结 论

建立了一种利用红外光谱技术预测中药材指标成分的方法,从得到的模型可以看出短瓣金莲花药材提取物的红外光谱与指标成分之间存在很好的相关性, R² > 0.91;且模型预测结果的相对偏差在 ±5%之内。红外光谱技术具有指纹特

性强、取样量小、操作简便、测试迅速、对环境无污染、定量准确等特点。本文只对短瓣金莲花药材中的两种指标成分进行了预测。在获取大量相关数据的基础上,该方法可对某种药材的多个成分及整体特征甚至药效、药理等进行预测评

价,不失为一种很好的中药材质量控制的手段。能够为中药、食品等复杂体系的化学成分研究提供直接、快速、有效的研究手段,可以缩短研究周期,提高研究效率。

References

- [1] Yuan Ming, Wang Ru-feng, Wu Xiu-wen, et al. Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(5): 449.
- [2] LEI Rong, FENG Li, LIU Yong-li, et al(雷 蓉, 冯 丽, 刘永利, 等). Journal of Chinese Medicinal Materials(中药材), 2015, 38(5): 1085.
- [3] Liu Y P, Tong J M, Li P, et al. The Journal of International Medical Research, 2018, 46(4): 1380.
- [4] FAN Zhao-sheng, CHENG Jia, WANG Li-jun, et al(樊肇胜, 程 佳, 王利军, 等). Food Science(食品科学), 2014, 35(17): 12.
- [5] Song Zhiling, Hashi Yuki, Sun Hongyang, et al. Fitoterapia, 2013, 91(8): 272.
- [6] Liao Man, Cheng Xiaoye, Zhang Xia, et al. Journal of Chromatographic Science, 2018, 56(7): 619.
- [7] Wu Lizhen, Zhang Xiaopo, Xu Xudong, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 75(5): 55.
- [8] ZHANG Dong-qing, ZHANG Yan-ling, DONG Alideertu, et al(张冬青, 张艳玲, 董阿力德尔图, 等). Chinese Traditional Patent Medicine(中成药), 2016, 38(11): 2448.
- [9] REN Xiao-lei, HUO Jin-hai, WEI Wen-feng, et al(任晓蕾, 霍金海, 魏文峰, 等). Journal of Chinese Medicinal Materials(中药材), 2015, 38(6): 1220.
- [10] Sun Suqin, Zhou Qun, Chen Jianbo. Infrared Spectroscopy for Complex Mixtures-Application in Food and Traditional Chinese Medicine. Beijing: Chemical Industry Press, 2011. 9.
- [11] CHU Xiao-li(褚小立). Molecular Spectroscopy Analytical Technology Combined with Chemometrics and its Applications(化学计量学方法与分子光谱分析技术). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2011. 31.
- [12] YU Yang, LI Jun, LI Bao-guo(于 洋, 李 军, 李宝国). Chinese Traditional Patent Medicine(中成药), 2018, 40(5): 1139.
- [13] WU Zhe, ZHANG Ji, ZUO Zhi-tian, et al(吴 喆, 张 霁, 左智天, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2018, 38(4): 1101.
- [14] Yu X H, Xia P F, Li D, et al. Chinese Journal Modern Applied Pharmacy(中国现代应用药学), 2014, 35(17): 1016.
- [15] Chen J B, Sun S Q, Zhou Q. Analytical Methods, 2016, 8(47): 8329.

Rapid Analysis of the Quality Control Components of *Trollius ledebouri* by Infrared Spectroscopy

GENG Shu-qin¹, FAN Zhao-sheng², LIU Hao¹, ZENG Sheng¹, ZHANG Yan-ling^{1*}, DONG Alideertu¹, ZHOU Qun², SUN Su-qin²

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China

2. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract Combined with chemometrics methods, rapid quantitative analysis of the quality control components of *Trollius ledebouri* was developed by modern infrared spectroscopy. The reference data of the representative components, orientin and vitexin, were obtained by HPLC method, and the infrared spectra were obtained by Fourier transform infrared spectroscopy. On this basis, the index components were correlated with the infrared spectra data by chemometrics methods, and the fast prediction models of the index components were established. Thirty-six extracts of *Trollius ledebouri* were obtained by room temperature extraction, heating reflux and ultrasound-assisted extraction with different ratios of methanol-water as solvent. The contents of orientin and vitexin in the extracts of *Trollius ledebouri* were determined by HPLC method, and the infrared spectra of the samples were measured by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) aided by horizontal attenuated total reflectance (HATR) accessory. TQ Analyst EZ Edition software was used to establish the models, in which 29 extract samples were as test set and the rest as calibration set. Cross validation correlation coefficient (R^2) and cross validation error mean square root (RMSEC) were used as indexes to select spectral pretreatment method, quantitative analysis method and modeling wave range, and root mean square error of prediction (RMSEP) was used to evaluate the prediction effect of the model. The optimized spectral pretreatment methods were standard normal distribution verification (SNV) correction and second derivative (13-point smoothing)

of standard normal distribution. The quantitative analysis method was PLS. And the optimal wave range of orientin and vitexin were 2 050~650 and 1 900~650 cm^{-1} , respectively. The correlation coefficients of orientin and vitexin models constructed by PLS method were 0.919 8 and 0.970 8, respectively. The relative deviations of the predicted results were $-2.0\% \sim 3.2\%$ and $-3.4\% \sim 4.7\%$, respectively. Since the possessing has unique advantages, such as rapid measurement, fingerprint characteristics, qualitative and quantitative analysis, being environment friendly, the infrared spectroscopy can be used to indicate the representative ingredients of Chinese herbal extracts quickly, accurately, environment friendly and efficiently, thus providing a new idea and a feasible solution for the quality control of traditional Chinese herbal medicines.

Keywords Infrared spectroscopy; Fast analysis; *Trollius ledebouri* Reichb; Orientin; Vitexin

(Received Sep. 28, 2018; accepted Jan. 6, 2019)

* Corresponding author