

近红外光谱法快速测定野菊花药材中水分及蒙花苷含量

毛佩芝, 杨凯, 金叶, 刘雪松, 王龙虎^{*}(浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 应用近红外光谱技术建立一种野菊花药材中水分及有效成分含量的快速分析方法。方法 采集 45 批野菊花药材的近红外光谱, 分别用烘干法和 HPLC 测得药材中水分及蒙花苷含量值作为参考, 运用偏最小二乘法(PLS)建立野菊花药材水分及蒙花苷的定量模型, 并用未知样品进行验证。结果 野菊花药材水分和有效成分蒙花苷含量 PLS 模型得到的 NIR 预测值与实测值有较好的相关性, 模型的交互验证误差均方根(RMSECV)分别为 0.568 和 0.282; 相关系数 R^2 为 0.976 1 和 0.955 1; RESP 均控制在 10% 以内, 完全符合中药生产过程实时分析的精度要求。结论 研究表明近红外光谱技术能够快速测定野菊花药材水分和蒙花苷含量, 有助于药材入库的快速检验, 节省人力物力。

关键词: 近红外光谱; 野菊花; 水分测定; 含量测定; 蒙花苷

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)12-1428-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.004

Rapid Determination of Moisture and Linarin in Chrysanthemi Indici Flos by NIR Technique

MAO Peizhi, YANG Kai, JIN Ye, LIU Xuesong, WANG Longhu^{*}(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a rapid analytical method for determining moisture and linarin content in Chrysanthemi Indici Flos by near-infrared reflectance (NIR) technique. **METHODS** The NIR spectroscopy data of 45 batches of samples were collected, the data of moisture and linarin content as reference were obtained by drying method and HPLC, respectively. The quantitative model for both was established by partial least squares (PLS) and verified by unknown samples. **RESULTS** There is a good correlation between the predicted NIR values and the actual values. The root-mean-square error of cross-validation (RMSECV) of the quantitative calibration model of moisture and linarin was 0.568 and 0.282, respectively. The correlation coefficients R^2 was 0.976 1 and 0.955 1, respectively, and the RESP was both controlled within 10%, which were fully meeting the accuracy requirements of real time process analysis of TCM manufacturing. **CONCLUSION** NIR can achieve rapid determination of moisture and linarin in Chrysanthemi Indici Flos, which can determinate medicinal materials in storage rapidly and save manpower and material resources.

KEY WORDS: NIR; Chrysanthemi Indici Flos; moisture determination; content determination; linarin

野菊花(*Chrysanthemi Indici Flos*)为菊科植物野菊(*Chrysanthemum indicum* L.)的干燥头状花序, 味苦、辛, 微寒, 归肝、心经, 具有清热解毒、泻火平肝之功效, 用于疮痍肿痛, 目赤肿痛, 头痛眩晕。野菊花具有抗病原微生物、治疗心血管系统疾病、降压、降低血小板聚集、抗炎、免疫、抗氧化等作用, 此外, 还用于治疗肿瘤、高血压和高血脂等症, 对感冒、流行性脑膜炎也有一定的预防作用^[1]。野菊花药材中的化学成分较为复杂, 并且品种、来源、产地、生长年限等因素都会影响野菊花药材的质量。野菊花作为制剂中的一种原料药时, 需要建立该药材的质量评价指标, 以保证该制剂的质量与功效。传统的野菊花药材

质量检测方法——HPLC, 费时、费力, 难以广泛地应用于生产实践, 不能适应中药制剂的现代化发展的需要; 并且采用单一指标成分——蒙花苷来控制野菊花药材的质量, 也不能体现野菊花药材成分的复杂性^[2]。因此, 建立一种能够快速、全面地检测野菊花药材的方法, 对野菊花药材的大批量筛选和全面质量控制具有重要意义。近红外光谱分析技术是近年来新兴起的一种绿色分析技术, 具有快速分析样品、处理简单、无需试剂消耗等显著优点^[3-5], 已广泛用于中药活性成分的测定。本实验按照烘干法和 HPLC 测定野菊花药材中水分和蒙花苷含量的指标, 采用偏最小二乘回归建模方法, 将处理后的近红外光谱数据和关

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2012ZX09201201)

作者简介: 毛佩芝, 女, 主管药师 Tel: 15825558863 E-mail: maopeizhi@163.com
(0571)88208621 E-mail: wang2000@zju.edu.cn

^{*}通信作者: 王龙虎, 男, 博士, 研究员 Tel:

键指标测定值相关联,建立各质控指标的定量分析模型,为大批量野菊花样品中指标性成分的含量测定提供一种新的方法,同时也为野菊花药材的在线检测和快速评价提供参考依据。

1 仪器与材料

Bruker MATRIX-F 近红外光谱仪(德国布鲁克); Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); DFY-200 摇摆式高速万能中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司); 精宏 DZF-6021 真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); FA2004 电子天平(上海越平科学仪器有限公司)

野菊花药材(华润三九医药股份有限公司,批号: A20130622008-15, A20130627001-5, A20130822001-12, A20130913001-20, 由浙江大学药学院徐娟华副教授鉴定); 蒙花苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 111528-200605,纯度: 99.5%), 甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 样品采集及处理

收集不同批次的野菊花原药材共 45 批,粉碎后过 80 目筛,备用。

测定蒙花苷含量之前需要对样品进行提取,提取方法为甲醇直接超声处理^[6]: 取约 0.25 g 野菊花药材粉末,于具塞锥形瓶中,加入 70% 甲醇 50 mL,超声 1.5 h,冷却至室温,过滤后备用。

2.2 近红外光谱采集

采集样本的近红外漫反射光谱,光谱扫描范围 4 000~10 000 cm^{-1} ,扫描次数为 32 次,分辨率为 8 cm^{-1} ,以空气为背景。样本的原始近红外光谱见图 1。

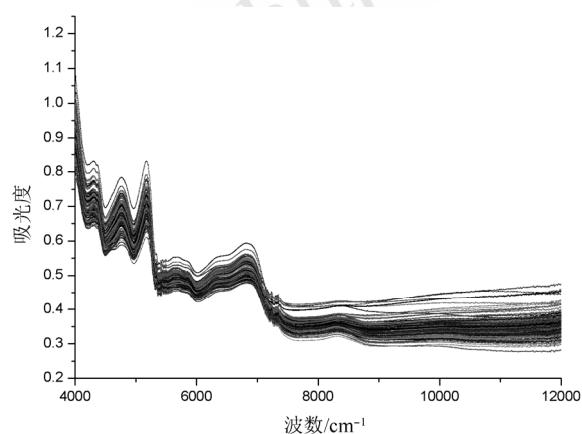


图 1 45 批野菊花原药材原始近红外光谱
Fig. 1 NIR spectra of 45 batches of samples

2.3 野菊花中水分含量测定

原有 45 批野菊花原药材水分含量范围较小,约为 9%~11%,不利于建立全面有效的近红外水分测定模型。采用烘干法对原有野菊花样品进行处理,扩大线性范围至 4%~15%。

水分含量的测定采用烘干法,取 2~5 g 野菊花原药材粉末于烘干至恒重的称量瓶,于 105 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干 6 h,移至干燥器中冷却 30 min,精密称定,再在相同温度下干燥 1 h,冷却,称重,至连续 2 次相差不超过 5 mg,计算水分含量。

2.4 野菊花中蒙花苷含量测定

野菊花提取液样品进样用 0.45 μm 滤膜过滤后,采用 HPLC 进行定量分析^[7]。

色谱条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm),柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$,流动相为 0.5% 磷酸水溶液和乙腈的混合溶液(70:30),流速为 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长为 334 nm。

2.5 数据处理方法与模型评价

运用相关系数法,选择合适的波段,运用偏最小二乘法(PLS)建立 NIR 光谱的校正模型。以交互验证误差均方根(RMSECV)为指标,运用留-交互验证法确定最佳 PLS 主因子数。模型对校正集样本和验证集样本的预测误差分别用校正集预测误差均方根(RMSEC)和验证集预测误差均方根(RMSEP)来考察。

3 结果与分析

3.1 野菊花中水分测定结果

采用烘干法测定了 144 批野菊花水分的含量,用于建立水分含量预测模型的野菊花中水分的含量范围为 7.41%~15.9%,符合一定的梯度分布及建模要求。

3.2 蒙花苷含量测定结果

蒙花苷的测定共采用了 135 份样品,由原有的 45 批样品每批分成 3 份所得,结果显示 45 批野菊花样品的蒙花苷含量在 0.88%~3.37% 内。

3.3 波段选择和数据预处理

PLS 可以处理全谱信息,但因包含过多冗余信息,有必要在建模前对光谱波长区间进行筛选,以改善模型性能,提高计算速度。在模型的建立过程中, R^2 越大、RMSEC 越小,表明所建的模型结构越合理,越能反映样品的真实信息,通过对比不同波段建模得到的 R^2 和 RMSECV,最后分别选择 4 700~6 800 cm^{-1} 和 4 597.6~7 501.9 cm^{-1} 2 个波段建立水分和蒙花苷的定量分析模型,结果见表 1。

表 1 不同建模区间对模型性能的影响

Tab. 1 The effect of different regions on model performance

水分波段选择				蒙花苷波段选择			
预处理方法	建模波段/cm ⁻¹	R ²	RMSEC	预处理方法	建模波段/cm ⁻¹	R ²	RMSEC
MSC+1st +SG	4 200~6 100	0.906 1	0.920	原始光谱+SG	4 597.6~6 101.8	0.906 1	0.392
	4 597~6 600	0.953 8	0.733		4 597.6~7 501.9	0.944 4	0.150
	4 700~6 800	0.975 4	0.398		4 597.6~7 800.6	0.895 4	0.398

由于温度、湿度以及仪器方面的影响,测定的 NIR 光谱容易出现漂移或者变形,因此,对采集到的原始光谱进行必要的平滑和求导等数学预处理有助于增强模型的稳定性。平滑可以降低随机误差和噪声,导数法可消除由于制样条件和仪器参数引起的谱图的平移、倾斜以及图谱的其他变形。因此,对原始光谱分别进行了一阶导数法(1st)、二阶导数法(2nd)、多元散射校正法(MSC)、Savitsky-Golay 平滑法(SG)和 Norris 导数滤波平滑法(Norris)等,对比研究了各种光谱预处理方法对所得模型 R²、RMSEC 和 RMSEP 的影响,结果见表 2 和表 3。

表 2 不同预处理方法对野菊花药材水分含量模型的影响
Tab. 2 Effect of different pretreatment on calibration model on moisture in Chrysanthemi Indici Flos

预处理方法	建模波段/cm ⁻¹	R ²	RMSEC	RMSEP	Factors
SC+1st	4 700~6 800	0.976 1	0.392	0.659	6
MSC+1st +SG	4 700~6 800	0.975 4	0.398	0.665	6
MSC+1st +Norris	4 700~6 800	0.964 8	0.475	0.645	7
MSC+2nd	4 700~6 800	0.963 6	0.482	0.849	6
MSC+2nd +SG	4 700~6 800	0.973 5	0.413	0.678	6
MSC+2nd +Norris	4 700~6 800	0.957 8	0.518	0.839	5
MSC+原始光谱	4 700~6 800	0.934 0	0.645	0.708	6
MSC+原始光谱+SG	4 700~6 800	0.933 2	0.648	0.712	6

表 3 不同预处理方法对野菊花药材蒙花苷含量模型的影响
Tab. 3 Effect of different pretreatment on calibration model on linarin in Chrysanthemi Indici Flos

预处理方法	建模波段/cm ⁻¹	R ²	RMSEC	RMSEP	Factors
1st	4 597.6~7 501.9	0.955 1	0.135	0.126	7
1st +SG	4 597.6~7 501.9	0.954 3	0.137	0.132	7
1st +Norris	4 597.6~7 501.9	0.948 2	0.145	0.126	7
2nd	4 597.6~7 501.9	0.792 4	0.455	0.353	1
2nd +SG	4 597.6~7 501.9	0.861 7	0.232	0.253	4
2nd +Norris	4 597.6~7 501.9	0.937 1	0.159	0.180	6
原始光谱	4 597.6~7 501.9	0.944 1	0.151	0.149	10
原始光谱+SG	4 597.6~7 501.9	0.944 4	0.150	0.153	10

由表 2 可知,优选地采用多元散射校正法和一阶导数法对所采集到的所述野菊花水分的近红

外光谱进行预处理。

由表 3 可知,优选地采用一阶导数法对采集到的所述野菊花药材蒙花苷的近红外光谱进行预处理。

3.4 定量模型的建立和预测

经过建模波段和预处理方法的选择,采用 PLS 建立水分和蒙花苷定量校正模型。水分样品共 179 个,分别选取 161 和 18 个样品分别作为校正集和验证集的样品。蒙花苷样品共 135 个,分别选取 120 和 15 个样品作为校正集和验证集的样品。水分和蒙花苷模型的预测误差均<10%,表明近红外光谱技术能够实现对野菊花原药材样品中水分和蒙花苷样品含量的快速测定,有助于药材入库的快速检验,节省人力物力。

应用化学计量学软件与已知的野菊花药材水分和蒙花苷含量进行关联,采用偏最小二乘法建立近红外光谱与标准含量之间的定量校准模型,并通过各模型评价指标考察模型性能。结果表明采用偏最小二乘法建立近红外光谱与标准含量之间的定量校准模型,可用于快速测定野菊花药材水分和蒙花苷含量。结果见表 4。

表 4 野菊花药材水分和蒙花苷含量模型参数汇总

Tab. 4 Sums of models' parameters of moisture and linarin in Chrysanthemi Indici Flos

模 型	RMSEC	RMSEP	RMSECV	R ²	RSEC/%	RSEP/%
水分模型	0.392	0.659	0.568	0.976 1	3.42	5.84
蒙花苷模型	0.135	0.126	0.282	0.955 1	7.41	7.64

由图 2~3 可知,所测得的野菊花药材水分含量与 NIR 定量校正模型的预测值十分接近,说明该模型建立成功。图 4~5 表明,所测得的野菊花药材蒙花苷含量与 NIR 定量校正模型的预测值也十分接近。表 3 显示野菊花药材水分含量模型和蒙花苷含量模型的 RESP 均控制在 10%内,完全符合中药生产过程实时分析的精度要求。所以用 NIR 定量校正模型对验证集中水分含量和有效成分蒙花苷含量的预测效果优良。

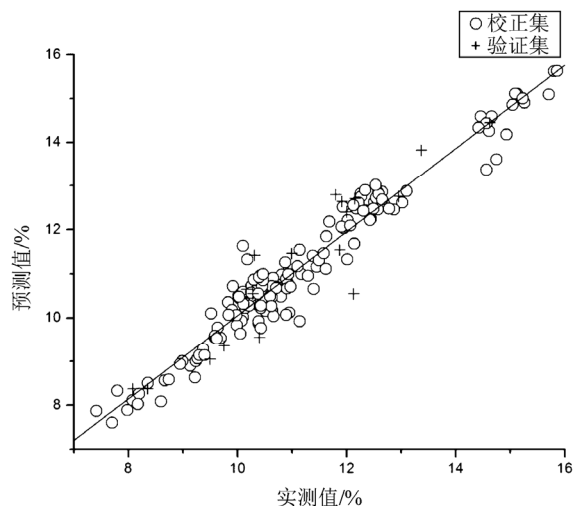


图 2 野菊花药材水分含量药典烘干法实测值和 NIR 预测值的相关性图

Fig. 2 Correlations between the actual values and the predicted NIR values of moisture in Chrysanthemi Indici Flos

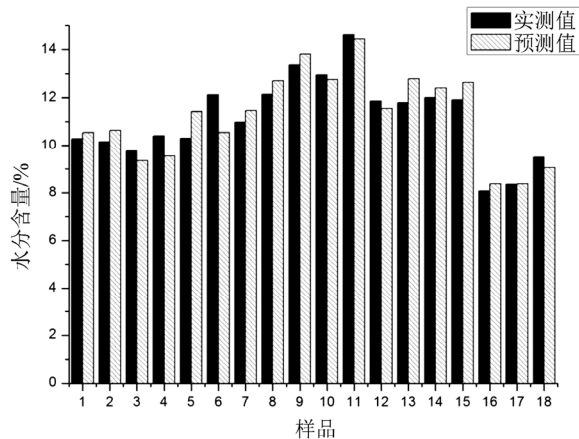


图 3 野菊花水分含量的实测值与 NIR 预测值比较

Fig. 3 Comparison of the actual values and the predicted NIR values of moisture in Chrysanthemi Indici Flos

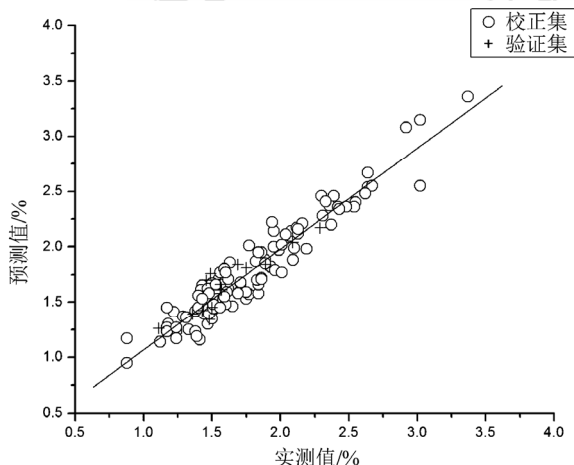


图 4 野菊花药材蒙花苷含量实测值和 NIR 预测值的相关性图

Fig. 4 Correlation between the actual values and the predicted NIR values of linarin in Chrysanthemi Indici Flos

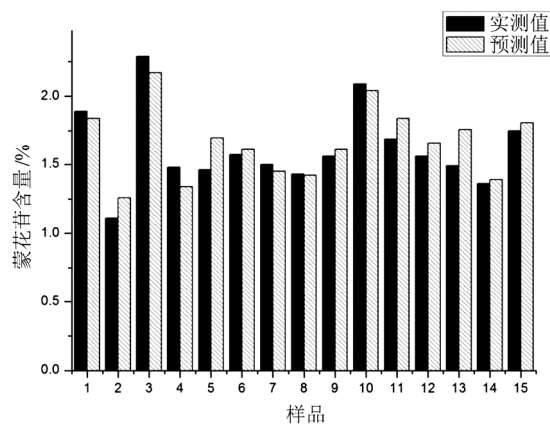


图 5 野菊花蒙花苷含量的实测值与 NIR 预测值比较

Fig. 5 Comparison of the actual values and the predicted NIR values of linarin in Chrysanthemi Indici Flos

4 讨论

本研究建立了野菊花药材水分和蒙花苷含量的近红外快速分析方法,应用 PLS 建立的水分和蒙花苷含量的定量校正模型,其中相关系数、因子数等模型性能指标均在理想范围内,将所建模型用于验证集的预测,其 RESP 均 $<10\%$,满足定量分析精度的要求。与传统药典方法相比,近红外光谱技术大大提高了分析效率^[8-9]。研究表明,该技术也可有效地同时测定野菊花药材水分和蒙花苷含量,实现对野菊花药材快速的、全面的检测,并且具有操作简单、准确性高、精确度高等优点,能快速判断药材质量是否合格,确定药材是否能进入后续生产工艺环节,满足生产中快速、高效的要求,具有现场药材筛选和质量全面评价的应用前景,并且在中药生产中从源头上控制了野菊花原材料的质量,缩短检测时间,节约生产成本,提高生产效率和经济效益,保证了野菊花制剂质量的安全、有效。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: Appendix 295.
- [2] WANG B T, WANG F, ZHANG T B, et al. Determination of content of linarin in Flos Chrysanthemi Indici by RP-HPLC [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2009, 20(1): 166-169.
- [3] BAI Y, LIU J Y, LEI J W, et al. Rapid determination of moisture in Qiju Dihuang pills by near-infrared spectroscopy technique [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2013, 30(1): 52-54.
- [4] LI L, WANG Q Z, SUN Y P. Rapid content petermination of berberine hydrochloride in Berberis heteropoda skin by near infrared diffuse reflection optical spectra combined with partial least squares [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2015, 32(2): 168-173.

- [5] DAI S, ZHANG M, CHENG W M, et al. Simultaneous determination of eight active components in chrysanthemum indicum by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(12): 1961-1965.
- [6] HUANG X W, FAN H J, CHEN C G, et al. Extraction and determination of linarin in *Chrysanthemum indicum* L. [J]. Chem Anal Meter(化学分析计量), 2010, 19(3): 39-44.
- [7] ZHANG J J, LV W W, WEN Y C, et al. Antimicrobial activity and HPLC fingerprint of flavonoids in *Flos chrysanthemi* indici [J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2013, 40(6): 807-812.
- [8] YANG P P, CONG X D, CAI B C. Determination of curcumin-meglumine cocrystal by near-infrared spectroscopy rapidly [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(8): 991-994.
- [9] ZHANG Y, WU Y J, WU C Y, et al. Online monitor multi-component content of Danhong injection in the alcohol precipitation on process using near-infrared spectroscopy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(1): 67-72.

收稿日期: 2015-06-05

体位性低血压大鼠模型的建立及应用研究

李论^a, 朱柳^a, 袁牧^{a*}, 戴丽军^{b*} (广州医科大学, a.药物研究中心; b.实验动物中心, 广州 510182)

摘要: 目的 建立体位性低血压大鼠模型并进行初步应用。方法 从倾斜角度(30°, 45°, 75°, 90°)和倾斜时间(1, 2 min)两方面优化建立大鼠低血压模型的条件, 再用哌唑嗪(1.1~220 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和萘哌地尔(30~3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)多剂量给药, 探讨模型有效性和可靠性。结果 随着倾斜角度的增加, 大鼠的血压和心率变化幅度加大, 体位持续时间与血压、心率的变化没有明显的相关性。哌唑嗪剂量依赖性强化了体位性低血压, 对血压和心率都表现出明显的抑制作用; 萘哌地尔仅在3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量表现出对血压和心率的抑制效应。结论 45°头朝上位倾斜、持续时间 60 s 是建立体位性低血压大鼠模型的最适条件, 哌唑嗪和萘哌地尔检验的结果与文献报道一致, 证明了本模型有效、可靠。

关键词: 动物模型; 体位性低血压; 心血管; 不良反应; 哌唑嗪

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)12-1432-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.005

Establishment and Application of A Rat Model of Orthostatic Hypotension

LI Lun^a, ZHU Liu^a, YUAN Mu^{a*}, DAI Lijun^{b*} (Guangzhou Medical University, a. Drug Research Center; b. Laboratory Animal Center, Guangzhou 510182, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore establishment and preliminary application of a rat model of orthostatic hypotension. **METHODS** The rat model of orthostatic hypotension was optimized from angle of tilt(30°, 45°, 75°, 90°) and tilt time(1 min or 2 min). The validity and reliability of the model were observed by administrated with prazosin(1.1~220 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and naphthalene(30~3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). **RESULTS** With the increase of angle, variation amplitude of rats' blood pressure and heart rate all increased. The duration of position and the change of blood pressure and heart rate had no obvious correlation. Prazosin dose dependent strengthened orthostatic hypotension. Blood pressure and heart rate were obviously inhibited. Only 3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ naphthalene had inhibitory effect on blood pressure and heart rate. **CONCLUSION** 45° head-up tilt and 60 s is the optimum condition to establish a rat model of orthostatic hypotension; the results of administrating prazosin and naphthalene are consistent with the literature reports proving the validity and reliability of the model.

KEY WORDS: animal models; orthostatic hypotension; cardiovascular; adverse effects; prazosin

体位性低血压是从卧位到直立位转变过程中发生的血压急剧下降。站立时, 重力导致血液大量积聚在腿部的静脉容量血管中, 瞬时静脉回流减少, 健康个体位于主动脉弓和颈动脉窦的压力

感受器能引起交感神经反射, 迅速调节血压至正常^[1]。某些受体拮抗药物能抑制这种调节反应, 加剧体位性低血压, 从而限制其临床应用。建立体位性低血压动物模型验证具有 5-HT 受体、多巴胺

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2013B060300023)

作者简介: 李论, 女, 硕士生 Tel: (0756)7830877 E-mail: 2532235915@qq.com *通信作者: 戴丽军, 女, 硕士, 副研究员 Tel: (020)81340161 E-mail: lijundai@21cn.com 袁牧, 男, 硕士, 研究员, 教授 Tel: (020)37104150 E-mail: mryuanmu838@sina.com