

基于近红外光谱法快速检测裸花紫珠颗粒中木犀草苷和毛蕊花糖苷的含量

林苗苗¹, 魏惠珍^{1,2}, 吴柳瑾¹, 吕尚¹, 康兴东³, 吴永忠³, 金浩鑫², 饶毅^{1,2*} (1.江西中医药大学药学院, 南昌 330000; 2.中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330000; 3.江西普正制药有限公司, 江西 吉安 343000)

摘要: 目的 采用近红外光谱法建立裸花紫珠颗粒中木犀草苷和毛蕊花糖苷含量的快速检测方法。方法 采用 HPLC 测定裸花紫珠颗粒中木犀草苷和毛蕊花糖苷的含量, 利用近红外光谱法结合偏最小二乘法(PLS), 建立裸花紫珠颗粒中木犀草苷和毛蕊花糖苷的定量校正模型。结果 木犀草苷和毛蕊花糖苷的定量校正模型的相关系数(r)分别为 0.987 9, 0.956 3; 内部交叉验证均方差(RMSECV)分别为 0.004 6, 0.063 7。验证集的相关系数(r)分别为 0.905 8, 0.964 8; 预测误差均方差(RMSEP)分别为 0.020 0, 0.079 8。结论 该研究基于近红外光谱法建立的裸花紫珠颗粒木犀草苷和毛蕊花糖苷快速检测定量模型性能良好, 预测结果良好, 为中药颗粒的含量测定和质量控制研究提供了科学合理的方法。

关键词: 近红外光谱; 裸花紫珠颗粒; 木犀草苷; 毛蕊花糖苷; 快速检测

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)07-0786-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.07.003

引用本文: 林苗苗, 魏惠珍, 吴柳瑾, 等. 基于近红外光谱法快速检测裸花紫珠颗粒中木犀草苷和毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 786-790.

Rapid Determination of Luteoloside and Verbascoside in Callicarpa Nudiflora Granule Based on Near-infrared Spectroscopy

LIN Miaomiao¹, WEI Huizhen^{1,2}, WU Liujin¹, LYU Shang¹, KANG Xingdong³, WU Yongzhong³, JIN Haoxin², RAO Yi^{1,2*} (1.College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China; 2.National Engineering Research Center of Chinese Medicine Solid Preparation, Nanchang 330000, China; 3.Jiangxi Puzheng Pharmaceutical Co., Ltd., Ji'an 343000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a rapid detection method to detect the content of luteoloside and verbascoside in Callicarpa Nudiflora granule by near infrared spectrum. **METHODS** Determined the content of luteoloside and verbascoside in Callicarpa Nudiflora granule by HPLC. And used near infrared spectroscopy combining with partial least squares(PLS) to set up quantitative calibration model of luteoloside and verbascoside. **RESULTS** The correlation coefficients(r) of the quantitative correction model of luteoloside and verbascoside were 0.987 9 and 0.956 3 respectively. The values of root mean square error of cross validation(RMSECV) were 0.004 6 and 0.063 7. The correlation coefficient(r) of the verification set were 0.905 8 and 0.964 8 respectively. The mean square error(RMSEP) were 0.020 0 and 0.079 8. **CONCLUSION** Based on near infrared spectroscopy, the study establish a rapid quantitative model of luteoloside and verbascoside and its performance is good, and the prediction results of the model are good. This study provides a scientific and reasonable method for the content determination and quality control of Chinese medicine granules.

KEYWORDS: near-infrared spectroscopy; Callicarpa Nudiflora granule; luteoloside; verbascoside; rapid determination

裸花紫珠颗粒由裸花紫珠药材提取加工而成, 对治疗细菌感染引起的炎症、急性传染性肝炎、消化道和呼吸道出血等病症有显著疗效。近几年, 由于国家发布“限抗令”, 裸花紫珠颗粒作为中药消炎药被广泛运用于临床。据文献报道裸花紫珠中木犀草苷和毛蕊花糖苷具有消炎、止血、抗菌和抗肿瘤等作用, 临床疗效显著^[1-4]。因

此, 测定木犀草苷和毛蕊花糖苷含量对保障裸花紫珠颗粒的临床效果具有重大意义。

由于中药制剂的成分繁多, 物质基础研究比较薄弱, 其质量控制问题始终阻碍着中药制剂迈向现代化和国际化。目前, 中药制剂质量检测以 HPLC 和 UV 等分析方法为主, 样品前处理复杂, 检测时间长, 难以满足大量产品快速检测。近红

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JX-40); 江西省重点研发计划项目(20171ACG70010)

作者简介: 林苗苗, 女, 硕士 Tel: 15192579784 E-mail: 15797757071@163.com *通信作者: 饶毅, 男, 教授, 博导 Tel: 13807041192 E-mail: raoyi99@126.com

外光谱法(near-infrared spectroscopy, NIRS)通过建立良好的校正模型对未知样本进行定性或定量分析,具有快速、无损、无污染的优点^[5-7],近年来广泛运用于物质的定量分析和定性鉴定^[8-11]。故本研究以裸花紫珠颗粒为研究目标,研究 NIRS 在裸花紫珠颗粒快速检测中的应用,通过建立可靠的近红外定量分析模型,快速、准确地测定木犀草苷和毛蕊花糖苷的含量。以期为实现裸花紫珠颗粒生产的标准化和现代化提供理论依据。

1 仪器与试剂

MPA 型 NIRS 分析仪(德国 BRUKER 公司),配有积分球漫反射采样系统、OPUS 化学计量学软件;LC-20AT 高效液相色谱仪、AUW2200 十万分之一天平均来自日本岛津;AB104-N 万分之一天平(梅特勒-托利多);KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司,批号:V17ACY1709VH);甲酸(分析纯,西陇科学股份有限公司,批号:170412)。对照品:木犀草苷(批号 111720-201609;纯度:94.6%;供含量测定用)、毛蕊花糖苷(批号:121582-201402;纯度:93.3%;供含量测定用)均由中国食品药品检定研究院提供。裸花紫珠颗粒由江西普正制药有限公司提供,共计 26 批,批号分别为 170101, 170102, 170103, 170104, 170201, 170202, 170203, 170204, 170301, 170302, 170303, 170304, 170401, 170402, 170403, 170404, 170501, 170502, 170503, 170504, 170601, 170602, 170603, 170604, 170605, 170606。

2 方法与结果

2.1 HPLC

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%甲酸水溶液(15:85);流速:1 mL·min⁻¹;柱温:35 ℃;检测波长:木犀草苷为 350 nm,毛蕊花糖苷为 330 nm;进样量:10 μL。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取本品粉末 2.5 g,至具塞锥形瓶中,再加入 70%甲醇溶液 50 mL,称定质量,超声 40 min,冷却,称重,用 70%甲醇溶液补重,摇匀,即为供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液制备 取木犀草苷和毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,加 70%甲醇溶液溶解,制成木犀草苷(0.080 2 mg·mL⁻¹)和毛蕊花糖苷(0.300 4 mg·mL⁻¹)混合对照品溶液。

2.1.4 阴性样品溶液制备 量取 7 mL 甲醇,加入纯化水,定容至 10 mL,配制成 70%的甲醇溶液,即得。

2.2 方法学考察

2.2.1 专属性考察 分别取对照品、供试品、阴性样品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行检测,结果显示无干扰,见图 1。

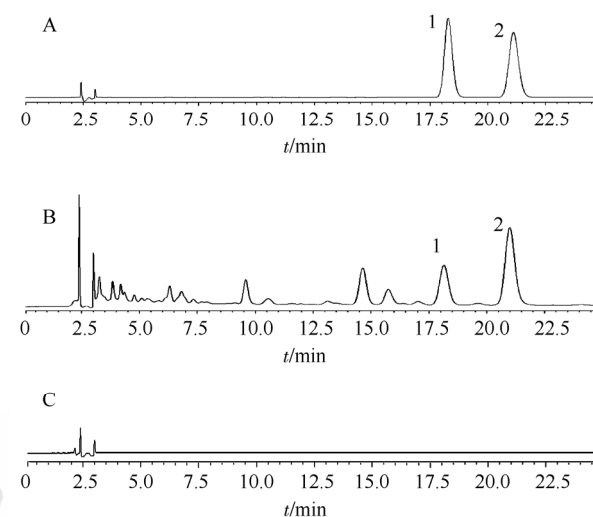


图 1 裸花紫珠颗粒 HPLC 色谱图

A-混合对照品溶液;B-供试品溶液;C-阴性样品溶液;1-木犀草苷;2-毛蕊花糖苷。

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Callicarpa nudiflora* granule
A-mixed reference substances; B-sample solution; C-negative sample solution; 1-luteoloside; 2-verbascoside.

2.2.2 仪器精密度的试验 取同一供试品溶液(批号:170302),按“2.1.1”项下色谱条件连续检测 6 次。结果木犀草苷和毛蕊花糖苷的 RSD 值分别为 0.69%和 1.26%,表明仪器精密度较好。

2.2.3 稳定性试验 取供试品溶液 1 份(批号:170302),在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h,按“2.1.1”项下色谱条件进行检测。结果木犀草苷和毛蕊花糖苷的 RSD 值分别为 1.04%和 0.56%。结果显示供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.4 线性关系考察 按“2.1.3”项下方法配制含木犀草苷(0.210 5 mg·mL⁻¹)和毛蕊花糖苷(1.456 2 mg·mL⁻¹)的混合对照品溶液。分别精密吸取 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mL 至 5 mL 量瓶中,加 70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得各系列浓度的混合对照品溶液。分别精密吸取各系列浓度混合对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按“2.1.1”项下色谱条件进行检测。以各对照品浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归。

结果, 木犀草苷标准曲线: $A=28\,338\,152C+3\,715$, $r=0.999\,9$, 在 $0.004\,21\sim0.168\,4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。毛蕊花糖苷标准曲线: $A=19\,007\,671C+138\,275$, $r=0.999\,9$, 在 $0.029\,12\sim1.165\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.2.5 重复性试验 取本品粉末约 2.5 g , 精密称定, 按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法, 平行制备 6 份, 按“2.1.1”项下色谱条件进行检测, 计算 RSD 值。结果木犀草苷和毛蕊花糖苷的 RSD 值依次为 1.20% 和 0.91% 。表明方法重复性良好。

2.2.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的本品粉末 1.25 g , 加入毛蕊花糖苷对照品约 6 mg , 精密称定, 再精密加入木犀草苷对照品溶液 ($0.021\,58\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 50 mL 。平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进行检测。计算回收率和 RSD 值, 结果见表 1。结果表明准确度符合实验要求。

表 1 加样回收实验结果($n=6$)

Tab. 1 Sample recovery experiment results($n=6$)

成分	称样量/g	样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均 值/%	RSD/ %
木犀草苷	1.251 2	1.085	1.079	2.181	101.56	99.91	2.71
	1.250 3	1.085	1.079	2.193	102.76		
	1.249 9	1.084	1.079	2.181	101.69		
	1.248 7	1.083	1.079	2.157	99.51		
	1.245 1	1.080	1.079	2.109	95.37		
	1.256 2	1.123	1.079	2.153	95.49		
毛蕊花糖苷	1.251 2	6.76	8.27	15.14	101.30	100.49	2.65
	1.250 3	6.76	8.41	15.21	100.42		
	1.249 9	6.76	8.05	15.18	104.66		
	1.248 7	6.75	8.15	15.01	101.35		
	1.245 1	6.73	8.16	14.69	97.54		
	1.256 2	6.79	8.36	15.14	97.65		

2.2.7 含量测定 利用外标法计算出木犀草苷和毛蕊花糖苷的含量。用 OPUS 化学计量学软件将含量与 NIR 图关联建模。

2.3 NIR 建立颗粒中木犀草苷和毛蕊花糖苷含量测定模型

2.3.1 NIR 光谱采集 取裸花紫珠颗粒粉末 1.4 g 于样品杯内, 铺平, 采用积分球漫反射方式采集 NIR, 扫描范围 $12\,500\sim3\,500\text{ cm}^{-1}$, 扫描次数 32, 分辨率 16, 空气相对湿度 $30\%\sim40\%$, 扣除背景, 每批样品重复采集 2 次, 取平均光谱, 结果见图 2。

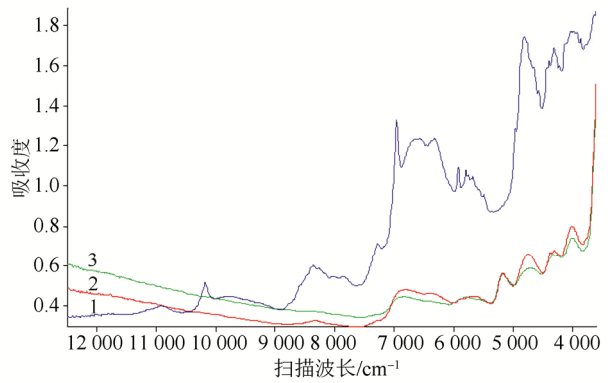


图 2 裸花紫珠颗粒 NIR 图

1-裸花紫珠浸膏; 2-裸花紫珠颗粒; 3-辅料。

Fig. 2 Near-infrared spectrogram of nude purple beads

1-Collicarpa Nudiflora extract; 2-Collicarpa Nudiflora granule; 3-supplementary material.

2.3.2 光谱预处理 样品的分布、粒径和厚度等因素均会影响漫反射光的强度, 需采用数据预处理方法, 以消除光谱基线漂移或不同线性基线的变化。通常采用矢量归一化法、一阶导数等方法, 对模型进行优化, 结果木犀草苷和毛蕊花糖苷经一阶导数+减去一条直线法处理, 定量模型最佳。

2.3.3 光谱范围选择 选择 5 组不同的光谱范围, 对光谱进行内部交叉验证, 以相关系数 r 和内部交叉验证均方根(RMSECV)为评判指标, r 越接近 1, RMSECV 越小, 模型准确度越高。结果见表 2。 $4\,528.2\sim3\,726\text{ cm}^{-1}$ 光谱范围内, 木犀草苷定量模型的相关系数 r 为 $0.987\,9$, 内部交叉验证均方差 RMSECV 为 $0.004\,6$ 。在 $5\,423.1\sim3\,926.5\text{ cm}^{-1}$ 光谱范围内, 毛蕊花糖苷定量模型的相关系数 r 为 $0.956\,3$, 交叉验证均方差 RMSECV 为 $0.063\,7$ 。

表 2 不同光谱波段的建模结果表($n=5$)

Tab. 2 Modelling results of different spectral ranges($n=5$)

编号	波谱光段/ cm^{-1}	木犀草苷		毛蕊花糖苷	
		r	RMSECV	r	RMSECV
1	12 489.3~3 602.5	0.181 6	0.038 2	-0.153 2	0.327 0
2	7 253.4~3 608.9	0.158 4	0.042 1	0.411 2	0.362 0
3	7 253.4~5 446.4	0.759 6	0.020 7	0.729 9	0.158 0
4	5 423.1~3 926.5	0.935 4	0.010 7	0.956 3	0.063 7
5	4 528.2~3 726.0	0.987 9	0.004 6	0.930 3	0.080 4

2.3.4 主因子数选择 近红外定量校正模型的稳定性受主因子数的影响, 主因子数太少, 获取的光谱信息不完全, 导致定量校正模型不稳定, 预测能力低; 主因子数过多, 获取冗余的信息, 导

致过于拟合。木犀草苷的定量模型最佳主因子数为 8；毛蕊花糖苷的定量模型最佳主因子数为 7。

2.3.5 定量模型的建立 本研究共有 26 批裸花紫珠颗粒供试品，其中 13 批作为校正集，13 批作为验证集。木犀草苷和毛蕊花糖苷定量校正模型的相关系数 r 分别为 0.987 9 和 0.956 3，RMSECV 分别为 0.004 6 和 0.063 7。表明样品光谱与其中木犀草苷、毛蕊花糖苷含量之间存在良好的相关性。木犀草苷和毛蕊花糖苷预测值与真值的相关性见图 3。

2.3.6 取样量考察 分别取裸花紫珠颗粒粉末(批号：170302)0.8，1.1，1.4，1.7 g 于样品杯内，铺平，按“2.3.1”项下光谱采集，连续扫描 2 次，结果见表 3。

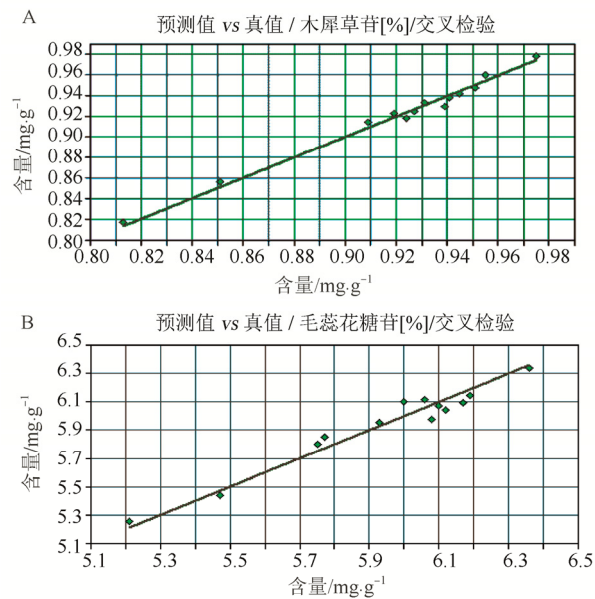


图 3 校正集样本中 NIRS 预测值与 HPLC 测定值之间的相关图

A-木犀草苷；B-毛蕊花糖苷。

Fig. 3 Correlation of the NIRS predicted value and the HPLC measured value in calibration set

A-luteoloside; B-verbascoside.

表 3 取样量测定结果

Tab. 3 Measured results of the sample

取样量/g	相对偏差/%	
	木犀草苷	毛蕊花糖苷
0.8	8.46	7.97
1.1	7.47	7.18
1.4	3.78	4.15
1.7	4.07	5.97

实验表明，取样 1.4 g 时，NIRS 含量测定的相对偏差最小，故选择取样量为 1.4 g。

2.3.7 模型验证 13 批样品作为验证集，将 NIRS 测得数据与 HPLC 测得数据进行比较。模型的预测效果以 r 和预测误差均方差(RMSEP)评价。木犀草苷和毛蕊花糖苷的 r 分别为 0.905 8 和 0.964 8，RMSEP 分别为 0.020 0 和 0.079 8。模型预测值与真实值差异小，证明该模型预测的准确度较高。结果见表 4。

表 4 验证集样品 HPLC 及 NIRS 测定结果

Tab. 4 HPLC measured value and NIRS predicted value in validation set

序号	木犀草苷			毛蕊花糖苷		
	真值/ mg·g ⁻¹	预测值/ mg·g ⁻¹	相对偏 差/%	真值/ mg·g ⁻¹	预测值/ mg·g ⁻¹	相对偏 差/%
1	0.908	0.943	3.85	5.95	5.97	0.34
2	0.870	0.886	1.84	5.60	5.56	0.71
3	0.910	0.954	4.84	5.99	6.17	3.01
4	0.886	0.927	4.63	5.80	5.99	3.28
5	0.875	0.870	0.57	5.64	5.65	0.18
6	0.857	0.851	0.70	5.49	5.45	0.73
7	0.921	0.920	0.11	5.91	5.94	0.51
8	0.934	0.931	0.32	6.05	6.03	0.33
9	0.926	0.924	0.22	5.72	5.78	1.05
10	0.943	0.945	0.21	6.12	6.11	0.16
11	0.953	0.951	0.21	6.21	6.18	0.48
12	0.815	0.813	0.25	5.27	5.22	0.95
13	0.937	0.939	0.21	6.04	6.01	0.50
相对偏差 范围	0.11%~4.84%			0.33%~3.28%		
r	0.905 8			0.964 8		
RMSEP	0.020 0			0.079 8		

3 讨论

3.1 提取溶剂选择

HPLC 测定木犀草苷和毛蕊花糖苷含量中，采用 70%乙醇和不同浓度甲醇作为提取溶剂，70%甲醇和 70%乙醇提取液中二者含量基本没有差异。由于中国药典 2015 年版公示中，裸花紫珠药材选用 70%甲醇为提取溶剂，因此选择甲醇并对其浓度进行考察。结果表明，以甲醇为提取溶剂时，提取液中木犀草苷和毛蕊花糖苷的含量偏低，提取效果最差。这可能与木犀草苷和毛蕊花糖苷的化学性质有关。70%与 50%甲醇提取液中二者的含量基本没有差异，故选择 70%甲醇作为提取溶剂。

3.2 提取方法选择

本研究考察了加热回流法、超声提取法对木犀草苷和毛蕊花糖苷含量测定的影响，2 种方法对二者含量测定的影响基本一致，由于超声提取法

操作简便, 故选择超声提取。超声时间考察中, 超声处理 40 min 及以上, 2 个成分没有明显的变化。最终采用 70% 甲醇超声 40 min。

本研究提出了 NIR 快速检测裸花紫珠颗粒中木犀草苷和毛蕊花糖苷含量的方法, 快速、准确, 无需对样品进行复杂的前处理, 降低了检测成本。为裸花紫珠颗粒中木犀草苷和毛蕊花糖苷的含量测定提供了新方法。由本研究通过建立的近红外模型而得的木犀草苷和毛蕊花糖苷含量预测值与实测值之间存在较小的相对偏差。其相对偏差范围分别为 0.11%~4.84% 和 0.33%~3.28%, 所建模型预测准确性较高。然而, 模型建成并不是一劳永逸的, 需要不断地丰富样品资源, 对模型进行优化。本研究采用 13 批样品建立近红外定量模型, 批次较少。随着进一步研究, 将增加样品的批次, 继续校正和完善近红外定量模型, 使近红外定量模型更加稳定、精确。近红外定量模型不仅可用于裸花紫珠颗粒的快速检测, 还可用于在线检测, 实时控制有效成分含量的变化情况。下一阶段本课题组将研究近红外在裸花紫珠颗粒生产过程中的在线检测, 以期为裸花紫珠颗粒的企业化生产做出贡献。

REFERENCES

- [1] 杨子明, 谷陟欣, 颜小捷, 等. 裸花紫珠抗炎活性研究[J].

时珍国医国药, 2015, 26(11): 2620-2622.

- [2] GUAN R W, QU Y S, GU Z W, et al. Studies on pharmacological effects of luteoloside [J]. Chin Wild Plant Res(中国野生植物资源), 2014, 33(1): 1-3.
- [3] ZHANG L, HUANG S, YAN X J, et al. Effects of active fraction from *Callicarpa nudiflora* on blood coagulation system [J]. Glob Tradit Chin Med(环球中医药), 2015, 8(11): 1359-1362.
- [4] GAO L, PENG X M, HUO S X, et al. Improvement of aedeoside on cerebral injury in subacute aging mice induced by D-galactose [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(1): 81-85.
- [5] CHU X L, YUAN H F. The research and application status of near infrared spectroscopy analytical technology [J]. Mod Instrs(现代仪器), 2011, 17(5): 1-4.
- [6] XIAO M L, CHEN Y L, LIN Y F. NIR technology and its application [J]. Guangdong Chem Indust(广东化工), 2011, 38(7): 143-144.
- [7] 陆婉珍. 近红外光谱技术进展[J]. 现代科学仪器, 2006(5): 5.
- [8] LI Y Y, BAI Y, CHEN Z H, et al. Quantitative analysis on yiqing keli from different manufacturers by near infrared diffuse reflectance spectroscopy [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(7): 1126-1129.
- [9] LIAO Y. Application and development of modern infrared spectroscopy [J]. Mod Food(现代食品), 2017(15): 18-19.
- [10] 杨芳. 近红外光谱分析技术应用[J]. 中国当代医药, 2011, 18(1): 15-16.
- [11] ZHAO Z Z, LIANG Z T. Application and advantage of near infrared spectroscopy technology in authentication of Chinese materia medica [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(8): 1062-1065.

收稿日期: 2018-04-27

(本文责编: 李艳芳)