

基于紫外光谱和偏最小二乘回归算法的畚药地稔中浸出物和 6 种活性成分快速预测方法

蒋程^{1,2}, 寿旦², 俞忠明², 许平翠², 王绪平², 陈礼平³, 张晓芹³, 王娜妮^{2*} (1.浙江省立同德医院药学部, 杭州 310012; 2.浙江省中医药研究院, 杭州 310007; 3.丽水市中医院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 建立基于紫外光谱的畚药地稔中浸出物、没食子酸、阿魏酸、芦丁、槲皮素、木犀草素、山奈酚的快速分析方法。方法 测定地稔水提液中的浸出物和 6 种化合物浓度, 采集紫外光谱。采用 SIMCA-P+ 软件, 分别建立浸出物、6 种化合物浓度与紫外光谱的偏最小二乘回归模型。采用 Visual Basic 开发应用软件, 将所建模型嵌套入软件, 为同时快速分析待测溶液中浸出物和 6 种化合物浓度提供工具。结果 验证集浸出物和 6 种化合物浓度的预测均方根误差分别为 39.1, 0.263, 19.0, 93.8, 0.894, 0.593, 0.896 ng·mL⁻¹, 预测值和真实值的相关系数均>0.9, 并通过软件在 10 s 内得到了浸出物和 6 种化合物浓度的预测结果。结论 本方法可为地稔的快速质量评价提供依据。

关键词: 地稔; 紫外光谱; 偏最小二乘回归

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)13-1574-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.13.007

引用本文: 蒋程, 寿旦, 俞忠明, 等. 基于紫外光谱和偏最小二乘回归算法的畚药地稔中浸出物和 6 种活性成分快速预测方法[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(13): 1574-1579.

Rapid Prediction of Extractum and Six Active Components in Traditional She Medicine-Melastoma Dodecandrum Lour. by Ultraviolet Spectroscopy and Partial Least Squares Regression Algorithm

JIANG Cheng^{1,2}, SHOU Dan², YU Zhongming², XU Pingcui², WANG Xuping², CHEN Liping³, ZHANG Xiaoqin³, WANG Nani^{2*} (1.Department of Pharmacy, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China; 2.Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China; 3.Lishui Traditional Chinese Medicine Hospital, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a rapid method for the determination of the extractum, gallic acid, ferulic acid, rutin, quercetin, luteolin and kaempferol in traditional She medicine-Melastoma dodecandrum by ultraviolet spectroscopy. **METHODS** The contents of extractum and 6 components in aqueous extract solutions of Melastoma dodecandrum were detected and the ultraviolet spectra were collected. The partial least squares regression models of extractum and 6 components were established separately with the use of SIMCA-P+ software. The software was devised by using Visual Basic, embedded the model into software. This method provided a convenient tool for the simultaneous and rapid determination of extractum and 6 components in unknown samples. **RESULTS** The root mean square error of predictions for extractum and 6 components were 39.1, 0.263, 19.0, 93.8, 0.894, 0.593, 0.896 ng·mL⁻¹, respectively. The correlation coefficients between the predicted and the reference values for validation set were >0.9 and the predicted contents of extractum and 6 components were calculated automatically within 10 s. **CONCLUSION** This study provides a rapid method for the quality evaluation of Melastoma dodecandrum Lour.

KEYWORDS: Melastoma dodecandrum Lour.; ultraviolet spectroscopy; partial least squares regression

畚药地稔为野牡丹科植物地稔(*Melastoma dodecandrum* Lour.)的新鲜或干燥全草, 具有清热解毒、活血止血的功效, 临床常用于流行性脑脊髓膜炎、带状疱疹、风湿骨痛等病症的治疗^[1]。目前, 地稔药材尚未收入中国药典 2015 年版, 仅收载于地方标准, 缺少含量测定的标准方法^[2]。已报

道的文献主要采用 HPLC 对地稔中的没食子酸、芦丁、槲皮素等活性成分进行含量测定, 大多仅测定 1~2 个指标, 且分析时间较长^[3-7]。本研究建立了基于紫外光谱(ultraviolet, UV)的地稔水提液中浸出物、没食子酸、阿魏酸、芦丁、槲皮素、木犀草素、山奈酚浓度的偏最小二乘(partial least

基金项目: 浙江省中医药(中西医结合)重点学科建设项目(2017-XK-A50); 浙江省丽水市重点科技创新团队建设计划项目(2018cxtd06)

作者简介: 蒋程, 女, 博士, 副主任药师 Tel: (0571)89972240 E-mail: jiangcheng0818@126.com *通信作者: 王娜妮, 女, 博士, 副研究员 Tel: (0571)88849089 E-mail: wnn8511@163.com

squares, PLS)回归模型,并开发了应用软件。该软件可根据待测样品溶液的UV光谱在10 s内计算得到浸出物和6种化合物的浓度,为地稔的快速质量评价提供工具。目前,将UV光谱应用于地稔中浸出物和活性成分的快速分析尚未见文献报道。

1 材料与方法

1.1 试剂、试药和仪器

没食子酸(批号:110831-201605;纯度:90.8%)、阿魏酸(批号:110773-200611;纯度:98%)、芦丁(批号:100080-200306;纯度:91.7%)均购自中国食品药品检定研究院。槲皮素(批号:MUST-14082610;纯度:98%)和山奈酚(批号:181228;纯度:98%)均购自北京世纪奥科生物技术有限公司。木犀草素(宝鸡市辰光生物科技有限公司,批号:20151024;纯度:98%)。甲醇(色谱纯,德国Merck公司)。收集江西、福建、浙江、广东、安徽(2批)、广西(3批)共9批不同产地的地稔药材。地稔药材经浙江省中医药研究院俞忠明副主任中药师鉴定为地稔(*Melastoma dodecandrum* Lour.),阴干密封保存。

去离子水由Smart2pure超纯水系统制备(美国Thermo公司)。UV光谱采集采用2450紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。没食子酸、阿魏酸、芦丁、槲皮素、木犀草素、山奈酚的浓度分析采用20A-VP高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

1.2 地稔水提液的制备

取江西产的地稔药材,分别称取8份,每份约5.0 g,加入适量水(料液比1:25~1:45)浸泡30 min后,加热回流提取1.5~3.5 h,抽滤,滤液水浴浓缩后转移至50 mL量瓶,用去离子水定容,得到不同提取工艺条件的地稔水提液($n=8$,含生药量约100 mg·mL⁻¹)。取其他8批地稔药材,分别称取约5.0 g,加入适量水(料液比1:38.5)浸泡30 min后,加热回流提取3 h,抽滤,滤液水浴浓缩后转移至50 mL量瓶,用去离子水定容,得到不同产地的地稔水提液($n=8$,含生药量约100 mg·mL⁻¹)。

1.3 浸出物浓度测定

移取地稔水提液各10 mL,水浴浓缩,105 °C烘箱内干燥至恒重,称取浸出物质量,得到地稔水提液中浸出物的浓度。

1.4 6种化合物浓度测定

移取地稔水提液各1 mL,加甲醇1 mL,静置2 h后10 000 r·min⁻¹离心5 min,取上清液经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,采用HPLC同时测定地稔水提液中没食子酸、阿魏酸、芦丁、槲皮素、木犀草素、山奈酚的浓度。对HPLC进行方法学考察。6种化合物浓度的进样精密度($n=6$)、日内精密度($n=6$)、日间精密度($n=6$)、室温稳定性(0, 2, 4, 8, 12 h, $n=5$)的RSD均<3%,标准曲线相关系数($n=5$)均>0.999,回收率($n=6$)均在90%~100%,RSD均<3%,符合方法学考察要求。

1.5 UV光谱采集

移取地稔水提液各10, 20, 40 μL,分别用去离子水稀释至4 mL,10 000 r·min⁻¹离心后取上清液,制得含生药量约0.25, 0.5, 1 mg·mL⁻¹的样品溶液($n=16\times3$)。随机选取广东产和安徽产的地稔水提液,移取各5, 30, 50, 60, 70, 80 μL,分别用去离子水稀释至4 mL,10 000 r·min⁻¹离心后取上清液,制得含生药量约0.125, 0.75, 1.25, 1.5, 1.75, 2 mg·mL⁻¹的样品溶液($n=2\times6$)。用1 cm光程的石英比色皿采集样品溶液的UV光谱。光谱采集波长范围为190~400 nm,光谱波长间隔为1 nm,扫描速度为快速。每次分析前用去离子水校正仪器基线。

1.6 数据分析

根据稀释倍数计算样品溶液中浸出物和6种化合物的浓度作为Y,以UV光谱为X,分别建立X对Y的PLS回归模型。随机选择40个样品作为校正集,剩下20个样品作为验证集。通过留一法交叉验证确定最优主成分数。采用交叉验证均方根误差(root mean square error of cross-validation, RMSECV)优化光谱波长范围、预处理方法。采用校正集相关系数(correlation coefficient of calibration, R_{cal})、验证集相关系数(correlation coefficient of validation, R_{val})、拟合均方根误差(root mean square error of estimation, RMSEE)、RMSECV和预测均方根误差(root mean square error of prediction, RMSEP)对模型的准确性和预测能力进行评价。数据处理采用SIMCA-P+软件(版本12.0,瑞典Umetrics AB)。

1.7 软件开发

基于所建PLS回归模型开发应用软件,为快

速分析待测溶液中浸出物和 6 种化合物浓度提供工具。采用该软件, 用户通过 3 个步骤即可实现地稔水提液中浸出物和 6 种化合物浓度的快速预测, 具体步骤见图 1。步骤 1: 将地稔水提液稀释后采集 190~400 nm 的 UV 光谱, 将光谱数据存储

于 E:\book1.xls 中。步骤 2: 双击打开软件, 输入稀释倍数。步骤 3: 点击“分析”按钮。软件自动将 UV 光谱数据代入最优 PLS 回归模型, 计算浸出物和 6 种化合物浓度。软件开发采用 Visual Basic 软件(版本 6.0, 美国 Microsoft)。

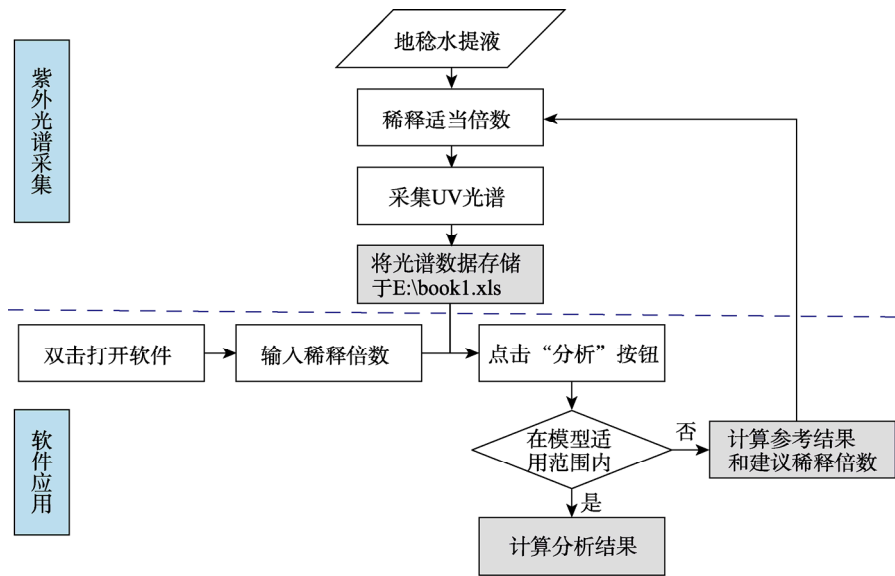


图 1 地稔水提液中浸出物和 6 种化合物浓度的分析步骤

Fig. 1 Procedures of determination of extractum and 6 components in aqueous extract solutions of *Melastoma dodecandrum* Lour.

2 结果

2.1 模型建立

校正集和验证集浸出物和 6 种化合物的浓度范围见表 1。样品溶液的 UV 光谱图见图 2。

表 1 校正集和验证集浸出物和 6 种化合物的浓度范围

Tab. 1 Concentration range of extractum and 6 components in calibration and validation set

变量	校正集(n=40)	验证集(n=20)
浸出物	24.4~550 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	42.3~413 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
没食子酸	0.832~3.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.167~2.31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
阿魏酸	1.51~254 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	3.02~190 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
芦丁	8.14~871 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	25.3~653 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
槲皮素	0.780~14.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.15~10.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
木犀草素	0.467~7.48 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.876~5.60 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
山奈酚	0.914~14.6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.69~8.07 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

以浸出物浓度为 Y , 比较 190~400, 200~400, 210~400 nm 原始 UV 光谱下 PLS 回归的建模结果, 优化起始波长, 见图 3A。结果表明, 以 190 nm 为起始波长所建模型的 RMSECV 最小。以浸出物浓度为 Y , 比较 190~200, 190~220, 190~230, 190~250, 190~300, 190~400 nm 原始 UV 光谱下

PLS 回归的建模结果, 优化终止波长, 见图 3B。结果表明, 当终止波长为 200 nm 时, RMSECV 最大。随着终止波长的增加, RMSECV 逐渐减小, 但当终止波长 > 250 nm 时, RMSECV 变化不明显。综上所述, 选择波长范围为 190~250 nm。

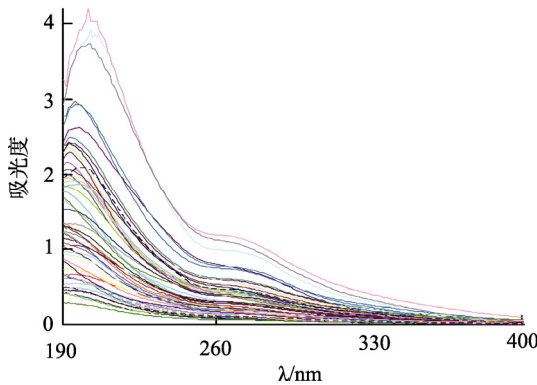


图 2 样品溶液的 UV 光谱图

Fig. 2 UV spectra of sample solution

以浸出物浓度为 Y , 采用 190~250 nm, 比较采用原始光谱和经不同预处理光谱所建 PLS 回归模型的建模结果, 优化光谱预处理方法, 见图 3C。结果表明, 光谱经 Savitsky-Golay 平滑结合一阶导

数(SG+1st D)、Savitsky-Golay 平滑结合二阶导数(SG+2nd D)、多源散射校正(multiplicative signal correction, MSC)、标准正则变换(standard normal variate, SNV)预处理后所建模型的 RMSECV 增大, 原始光谱(raw spectra, RS)、光谱经中心化(centered, CTR)、标准化(unit variance, UV)处理后所建模型的 RMSECV 较小。考虑模型的简单性, 选择原始光谱建立 PLS 回归模型。

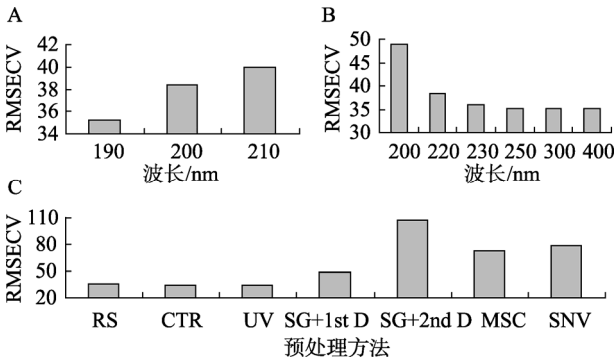


图 3 浸出物浓度 PLS 回归模型的建模结果
A-不同起始波长; B-不同终止波长; C-不同预处理方法。
Fig. 3 Results of PLS regression models for extractum
A-different starting wavelengths; B-different termination wavelengths; C-different preprocessing methods.

采用 190~250 nm 原始光谱建立浸出物浓度的最优 PLS 回归模型。基于最优 PLS 回归模型, 样品溶液中浸出物浓度的预测结果见表 2。浸出物浓度校正集预测值与真实值之间的相关图见图 4A。将所建模型应用于验证集, 验证集预测值与真实值之间的相关图见图 4B。

以样品溶液中的 6 种化合物浓度作为 Y, 优化波长范围, 优化光谱预处理方法, 分别建立 6 种化合物浓度的最优 PLS 回归模型。基于最优 PLS 回归模型, 样品溶液中 6 种化合物浓度的预测结果见表 2。6 种化合物浓度校正集预测值与真实值

之间的相关图见图 5。将所建最优 PLS 回归模型应用于验证集, 6 种化合物浓度验证集预测值与真实值之间的相关图见图 6。浸出物和 6 种化合物浓度最优模型的 R_{val} 均>0.9。

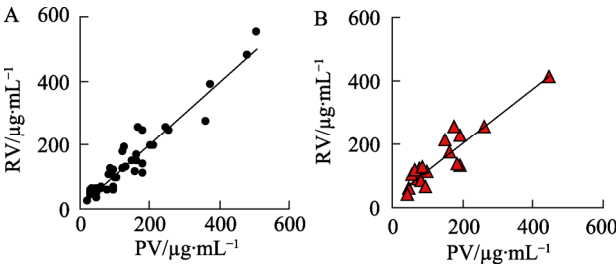


图 4 浸出物浓度最优 PLS 回归模型预测值与真实值之间的相关图
A-校正集; B-验证集; PV-预测值; RV-真实值。
Fig. 4 Correlation diagrams between the predicted values using the optimal PLS regression model and the reference values for extractum
A-calibration set; B-validation set; PV-predicted value; RV-reference value.

2.2 软件应用

基于浸出物和 6 种化合物浓度的最优 PLS 回归模型开发应用软件, 软件操作界面见图 7。该软件大小仅为 80.0 kB, 无需安装。用户采集并存储待测样品溶液的 UV 光谱后点击“分析”按钮, 软件自动读取 UV 光谱数据并将其代入最优 PLS 回归模型, 结合样品溶液的稀释倍数, 可在 10 s 内得到地稔水提液中浸出物和 6 种化合物浓度的预测结果, 并在“预测结果区域”输出。

3 讨论

UV 光谱技术具有快速、灵敏等特点, 已广泛应用于中药质量控制^[8-9], 但应用于地稔的质量评价未见文献报道。在地稔提取过程中, 不同产地的药材质量存在变化, 这种变化将直接影响水提

表 2 浸出物和 6 种化合物浓度最优 PLS 回归模型的预测结果
Tab. 2 Results of optimal PLS regression models for extractum and 6 components

变量名称	波长范围/nm	预处理	主成分数	校正集			验证集	
				R_{cal}	RMSEE	RMSECV	R_{val}	RMSEP
浸出物	190~250	原始光谱	1	0.957	34.8	35.2	0.923	39.1
没食子酸	190~250	原始光谱	2	0.940	0.229	0.234	0.923	0.263
阿魏酸	200~230	原始光谱	2	0.950	17.1	18.3	0.927	19.0
芦丁	200~230	原始光谱	2	0.967	47.3	53.6	0.937	93.8
槲皮素	190~400	标准化	2	0.953	1.01	1.02	0.923	0.894
木犀草素	190~400	标准化	2	0.957	0.522	0.53	0.931	0.593
山奈酚	190~400	标准化	2	0.942	1.05	1.10	0.911	0.896

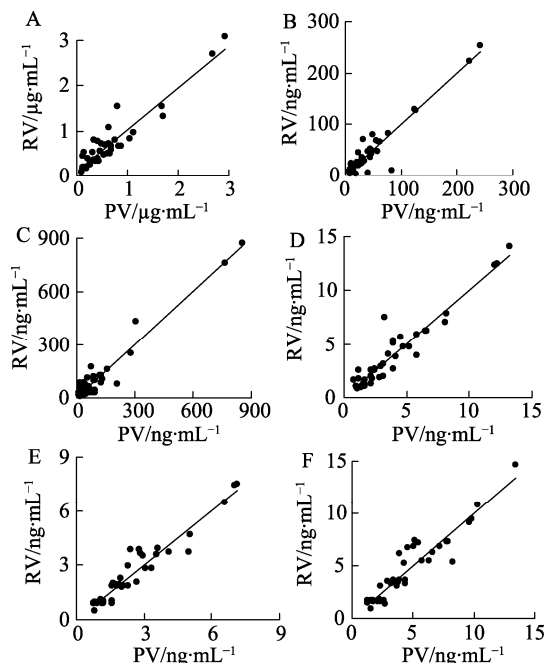


图5 6种化合物浓度最优 PLS 回归模型校正集预测值与真实值之间的相关图
A-没食子酸; B-阿魏酸; C-芦丁; D-槲皮素; E-木犀草素; F-山奈酚; PV-预测值; RV-真实值。

Fig. 5 Correlation diagrams between the predicted values using the optimal PLS regression model and the reference values for 6 components in calibration set
A-gallic acid; B-ferulic acid; C-rutin; D-quercetin; E-luteolin; F-kaempferol; PV-predicted value; RV-reference value.

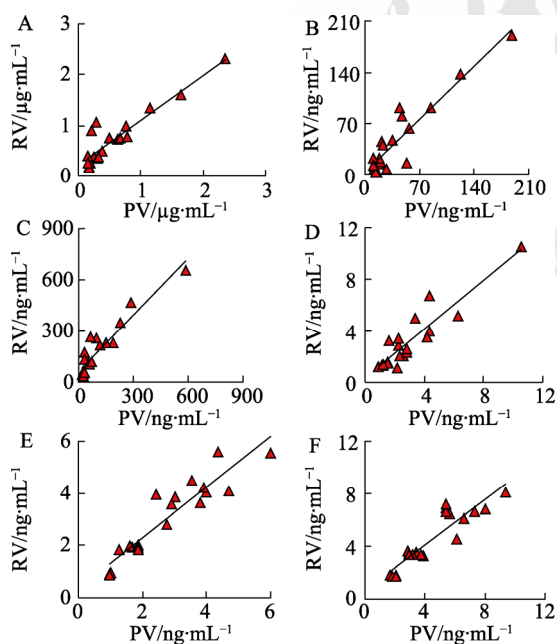


图6 6种化合物浓度最优 PLS 回归模型验证集预测值与真实值之间的相关图
A-没食子酸; B-阿魏酸; C-芦丁; D-槲皮素; E-木犀草素; F-山奈酚; PV-预测值; RV-真实值。

Fig. 6 Correlation diagrams between the predicted values using the optimal PLS regression model and the reference values for 6 components in validation set
A-gallic acid; B-ferulic acid; C-rutin; D-quercetin; E-luteolin; F-kaempferol; PV-predicted value; RV-reference value.



图7 软件操作界面

Fig. 7 Interface of software

液中成分和光谱的相关性。若采用同一产地的药材制备地稔水提液，将所建模型应用于该产地时效果较好，但应用于其他产地时，预测结果较差。同样，不同提取工艺条件也会导致水提液中成分和光谱的相关性发生改变。若采用相同的提取工艺条件制备地稔水提液，当模型推广应用于其他提取工艺条件制备的样品时，预测效果较差。为了增加模型的可推广性，本研究采用不同产地的药材，在不同料液比、回流时间下提取得到不同质量的地稔水提液。因此，本方法可适用于不同产地药材和不同提取工艺条件制备的样品。

当UV吸光度过高时，样品的透光率较小，影响测定结果的准确性，而当UV吸光度过低时，反映的有效信息较少。为了保证光谱测定的准确性和增加模型的适用范围，本研究将地稔水提液稀释不同倍数后，得到适合浓度的样品溶液采集UV光谱。根据校正集UV光谱吸光度的范围，以200 nm的吸光度为标准，待测样品溶液的吸光度应在0.3~4.3范围内。若待测样品溶液的吸光度超出了范围，软件在计算参考结果的同时会给出警示，并提示建议的样品稀释倍数。

为减小不同仪器间的响应误差，用户在使用本软件时可采用标准溶液进行吸光度校正。考虑标准溶液的成本、可获得性、通用性和稳定性，本研究选择无水乙醇作为标准溶液。由于无水乙醇在200 nm左右吸光度最大，且7种物质的最优PLS回归模型均用到200 nm建模，因此，选择200 nm作为校正波长。用户在使用软件时，可选择输入无水乙醇在200 nm的吸光度值，软件自动将样品溶液的吸光度校正后代入模型计算预测结果。如未输入则按不校正计算。

本方法分析时间较短(每采集 1 张 UV 光谱的时间<1 min, 软件预测时间<10 s), 而采用常规方法测定浸出物浓度至少需 4 h, 采用 HPLC 同时分析 6 种化合物浓度至少需 65 min。采用本方法可快速分析地稔水提液中浸出物和 6 种化合物浓度, 结合水提液的实际制备方法, 可计算出地稔药材中浸出物和 6 种化合物的含量, 为地稔水提液及药材的快速质量评价提供依据。

REFERENCES

- [1] MING H Y, MA X P, YANG J, et al. Research status of *Melastoma dodecandrum* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2018, 24(11): 228-234.
- [2] 胡小祥, 何艳. 地稔药材的研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2017, 34(4): 93-96.
- [3] HE Y, HU X X, ZHANG H. Determination of rutin and quercetin in *Melastoma dodecandrum* by HPLC [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med(云南中医学院学报), 2016, 39(5): 11-13.
- [4] LIU M, LIU S Y, YU L, et al. Study on the influence of the content of gallic acid and quercetin in traditional She medicine-*Melastoma dodecandrum* by drying temperature and harvest time [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2014, 16(7): 561-564.
- [5] LIU M, YU L, LI S F, et al. Determination of Gallic acid and quercetin in different parts and period of traditional She medicine-*Melastoma dodecandrum* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(11): 1351-1355.
- [6] LIU M, LI S F, CHENG K J. Determination of Gallic acid and quercetin in traditional She medicine-*Melastoma dodecandrum* by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43(4): 721-723.
- [7] 戚重桓, 倪观锋. 高效液相色谱法测定地稔中没食子酸的含量[J]. 浙江中医杂志, 2010, 45(3): 220-221.
- [8] YAN B J, QU H B. Multivariate data analysis of UV spectra in monitoring elution and determining endpoint of chromatography using polyamide column [J]. J Sep Sci, 2013, 36(7): 1231-1237.
- [9] ZHENG X T, GONG X C, LI Q, et al. Application of multivariate curve resolution method in the quantitative monitoring transformation of salvianolic acid a using online uv spectroscopy and mass spectroscopy [J]. Ind Eng Chem Res, 2012, 51(8): 3238-3245.

收稿日期: 2019-06-11

(本文责编: 曹粤锋)