

近红外漫反射光谱法测定黄连浸膏粉中生物碱含量

瞿海斌 刘 全 程翼宇*

(浙江大学药物信息学研究所, 杭州 310027)

摘 要 采用近红外漫反射光谱法对黄连浸膏粉中小檗碱、巴马亭、药根碱和总生物碱含量进行快速无损检测。以 HPLC 分析值作参比, 采用偏最小二乘回归算法建立二阶导数光谱信息与各组分含量间的定量校正模型, 并对未知样品中各组分含量进行预测。小檗碱、巴马亭、药根碱和总生物碱的预测均方差(RMSEP)分别为 0.184、0.109、0.054 和 0.325; 加样回收率分别为 97.67%~99.59%、96.63%~100.70%、95.15%~101.15% 和 97.41%~99.89%, 重现性实验相对标准偏差(RSD)分别为 0.3%、0.6%、1.8% 和 0.3%。该方法结果准确可靠, 重现性、稳定性均良好, 适用于工业现场的原位和在线检测

关键词 近红外漫反射光谱, 黄连浸膏粉, 偏最小二乘回归, 在线检测

1 引 言

黄连浸膏粉是名贵中药黄连的提取物, 其主要有效成分为小檗碱、巴马亭、药根碱等生物碱, 具有抗菌、消炎和止泻作用, 被广泛用于各种中药制剂^[1]。生物碱含量测定的常规方法有高效液相色谱法、毛细管电泳法、薄层层析法和分光光度法等, 这些方法都需要经过复杂的样品制备和预处理工作, 分析时间长, 不能用于工业现场的原位快速分析。近红外(near infrared, NIR)光谱分析是近年来迅速发展和推广应用的一种绿色分析技术^[2], 适合于复杂天然产物的定性和定量分析^[3,4]。与传统的化学分析技术相比, NIR 光谱分析无需制样, 在建立可靠的校正模型的基础上, 可直接对包装材料中的样品进行无损检测, 具有快速、无污染、低成本和多组分同时测定等优点, 非常适合于工业现场的在线检测和原位分析。

本实验以黄连浸膏粉为对象, 以 HPLC 作为参比方法, 建立了对其中主要生物碱含量进行快速无损测定的 NIR 光谱分析法。该方法的分析结果准确可靠, 重现性、稳定性和加样回收率均良好, 可望发展为一种植物提取物有效组分含量的快速测定方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Antaris 傅里叶变换 NIR 光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司); Agilent1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), G1315B 型 DAD 检测器, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, Elite Hypersil ODS 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m, i. d., 大连依利特分析仪器公司)。

黄连浸膏粉由本实验室自制, 分别取自 35 个不同批次。盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱对照品购于中国药品生物制品检定所, 乙腈为色谱纯(Merck 公司), 去离子蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

2.2 生物碱含量的 HPLC 分析

按文献^[5]方法测定黄连浸膏粉样品中小檗碱、巴马亭和药根碱的含量, 以这 3 种生物碱含量总和近似表示总生物碱含量。从 35 个样品中按含量大小均匀选取 8 个样品组成预测集, 其余 27 个组成校正集。

2.3 样品的 NIR 光谱采集

黄连浸膏粉样品研细后过 0.154 mm 筛, 装入样品杯中, 利用积分球漫反射采样系统采集其 NIR 光谱。光谱采集条件: 以仪器内置背景为参比, 波数范围 10000~4000 cm^{-1} , 扫描次数 32 次, 分辨率 4 cm^{-1} 。每个样品作 3 次平行实验, 取其平均光谱。样品的原始 NIR 光谱图如图 1。

3 结果与讨论

3.1 数据处理方法

光谱数据经多元散射校正技术(multiplicative scatter correction, MSC)处理和 Norris 导数平滑滤波后,采用偏最小二乘(partial least square, PLS)回归法建立定量校正模型,以校正集样品的交叉验证均方差(RMSECV)及其相对偏差(RSECV)为指标优化建模参数,模型对未知样品的预测效果用预测误差均方根(RMSEP)、相对偏差(RSEP)及相关系数(R)来考核。RMSECV、RSECV、RMSEP、RSEP 和 R 的计算方法见文献[6]。

3.2 光谱预处理方法的选择

表 1 为分别采用原始光谱、一阶导数光谱和二阶导数光谱进行建模时的 RMSECV 值。从表 1 可知,采用二阶导数光谱建模时 RMSECV 值最小。从图 2 二阶导数光谱图也可以看出,光谱数据经二阶导数处理,可消除基线偏移,扣除本底吸收,从而更为细致地反映样品的光谱特征。

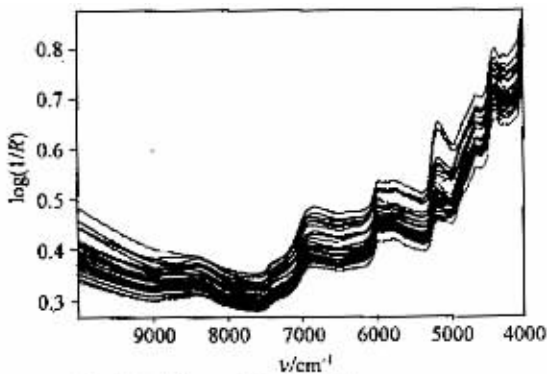


图1 样品的原始 NIR 漫反射光谱
Fig.1 Original near infrared (NIR) diffuse reflectance spectra

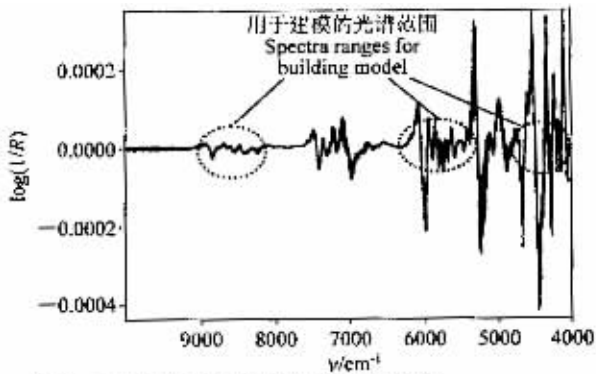


图2 二阶导数光谱和建模谱区的选择
Fig.2 2nd derivative spectra and the spectra ranges for building model

表 1 不同光谱预处理方法对 PLS 校正模型的 RMSECV 影响

Table 1 Influence of different preprocessing methods on root mean square error of cross-validation (RMSECV) of partial least square (PLS) models

光谱预处理方法 Preprocessing method	小檗碱 Berberine	巴马亭 Palmatine	药根碱 Jatrorrhizine	总生物碱 Total alkaloid
原始吸光度 Absorbance	0.338	0.232	0.118	0.573
一阶导数 First derivative	0.492	0.130	0.082	0.505
二阶导数 Second derivative	0.324	0.097	0.066	0.402

3.3 光谱范围选择

表 2 为采用 3 个不同光谱波段的光谱数据建立的校正模型的 RMSECV 值。其中序号 1 为全波段,序号 2 为吸收较明显的 3 个波段,序号 3 为从序号 2 中排除掉两个水分子强吸收带后的波段。

表 2 光谱波段选取对 PLS 模型 RMSECV 的影响

Table 2 Influence of NIR spectra wavelength ranges on RMSECV of PLS models

序号 No.	光谱范围(cm^{-1}) Wavenumber Range	小檗碱 Berberine	巴马亭 Palmatine	药根碱 Jatrorrhizine	总生物碱 Total alkaloid
1	9999.1~3999.6	0.373	0.134	0.077	0.488
2	9028.6~8075.7, 7678.7~7027.3, 6275.9~3999.6	0.350	0.121	0.072	0.435
3	9028.6~8075.7, 6275.9~5301.4, 4900.2~3999.6	0.324	0.097	0.066	0.402

水分子中的 —OH 基团在 NIR 光谱区的 6993 cm^{-1} (1430 nm)和 5128 cm^{-1} (1950 nm)附近分别有一个很强的倍频和合频吸收带^[7]。从图 2 二阶导数光谱图中也可以看出,在这两个波数附近各有一个明显的吸收峰,当将这两个波段从建模波段排除后, RMSECV 均显著减小。由此也可以说明,实验中所使用的黄连浸膏粉样品中水份含量较高,可采用 NIR 光谱法可对其进行测定。图 2 中虚线圈所在的

谱区即为经交叉验证优选得到的最佳光谱范围。

3.4 PLS 主因子数的选择和交叉验证结果

采用 PLS 法建立定量校正模型时,为避免出现“过拟合”现象,需要对主因子数进行合理选择。本文采用留一交叉验证法,考察了主因子数对 RMSECV 的影响。PLS 主因子数优化选择结果和校正集样品交叉验证结果如表 3。

表 3 最佳主因子阶数和交叉验证结果

Table 3 Optimal PLS components and results obtained by cross-validation

	小檗碱 Berberine	巴马亭 Palmatine	药根碱 Jatrorrhizine	总生物碱 Total alkaloid
PLS 因子 PLS components	8	9	9	9
交叉验证均方差 RMSECV	0.324	0.097	0.066	0.402
交叉验证相对偏差 RSECV(%)	1.25	1.42	2.04	1.12
R	0.983	0.987	0.973	0.988

RSECV: relative standard error of cross-validation

3.5 样品分析

将建立的定量校正模型用于对预测集中的 8 个未知黄连浸膏粉样品中的生物碱浓度进行预测,结果示于图 3。从图中可以看出,各生物碱含量的 NIR 光谱预测值均能够准确地逼近 HPLC 测定值。

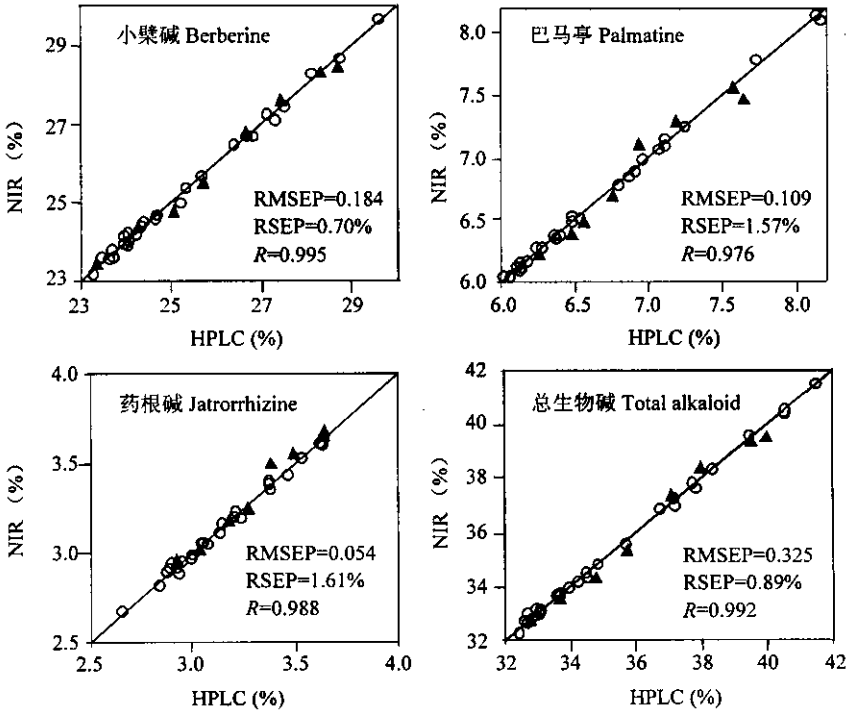


图 3 校正集和预测集样品 NIR 预测值和 HPLC 测定值相关图

Fig. 3 Correlation between NIR predicted and high performance liquid chromatographic measured values

(○) 校正集(calibration set); (▲) 预测集(validation set)。

3.6 加样回收率实验

取预测集中一份已测含量的黄连浸膏粉样品作为供试品,另从校正集中取一份已知含量的样品作为标准品。称取供试品 0.732 g,加入标准品 0.714 g,充分混匀,按前述方法采集光谱,并利用所建立的定量校正模型预测各生物碱含量。平行做 5 次实验,分别计算加样回收率,结果如表 4。

3.7 重现性实验

取某批次样品 20 份,按前述方法分别扫描其 NIR 光谱,并计算其平均光谱及其相对标准偏差(RSD)光谱。其中,RSD 光谱反应了各次测量的光谱信息在各个波数点处的相对标准偏差。结果显

示,20 次测定的光谱在波数为 7644.4 cm⁻¹ 处偏差最大,RSD 为 2.26%。由此计算得到小檗碱、巴马汀、药根碱和总生物碱含量的 RSD 分别为 0.32%、0.63%、1.76%和 0.33%,可见重现性良好。

表 4 加样回收率实验结果

Table 4 Results of recovery test

成分 Component	加样回收率(%) Recovery					平均值(%) Average	相对标准偏差(%) RSD
小檗碱 Berberine	97.83	99.44	97.67	99.59	98.13	98.53	0.93
巴马亭 Palmatine	96.63	101.57	96.92	100.70	96.63	98.49	2.47
药根碱 Jatrorrhizine	95.15	100.55	97.55	101.15	98.15	98.51	2.46
总生物碱 Total alkaloid	97.41	99.95	97.57	99.89	97.79	98.52	1.30

3.8 稳定性实验

取一份待测样品在 15 天内每天采集其 NIR 光谱,并计算其平均光谱和 RSD 光谱,以考察分析方法的稳定性。结果显示,在 15 天内采集到的光谱在波数为 4900.2 cm⁻¹ 处相对标准偏差最大,RSD 为 2.38%。利用前述定量校正模型计算得到的小檗碱、巴马汀、药根碱和总生物碱的 RSD 分别为 0.53%、0.74%、1.64%和 0.55%。由此表明,该方法具有较好的抗环境因素干扰的能力。

References

1 Miao Mingsan (苗明三), Li Zhenguo (李振国). *Modern Practical Quality Control Technique of Chinese Traditional Medicine* (现代实用中药质量控制技术). Beijing (北京):People's Medical Press (人民卫生出版社), 2000:900

2 Blanco M, Villarroya I. *Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21(4) : 240~250

3 Woo Y A, Kim H J, JungHwan C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 21: 407~413

4 Yang Nanlin (杨南林), Cheng Yiyu (程翼宇), Qu Haibin(瞿海斌). *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2003, 31(6): 664~668

5 Yang Nanlin (杨南林), Qu Haibin(瞿海斌), Cheng Yiyu (程翼宇). *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities* (高校化学工程学报), 2004, 18(1):126~130

6 Blanco M, Coello J, Iturriaga H. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2000, 50: 75~82

7 Hoeil Chung, Min-Sik Ku. *Vibrational Spectroscopy*, 2003, 31:125~131

Determination of the *Coptis* Extract Alkaloids Using
Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy

Qu Haibin, Liu Quan, Cheng Yiyu*

(Institute of Pharmaceutical Informatics, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract A quick and nondestructive method using near-infrared (NIR) diffuse reflectance spectroscopy was presented to determine the contents of berberine, palmatine, jatrorrhizine and total alkaloid of *Coptis* extract. Partial least square(PLS) was utilized to build the calibration models using second derivative spectra with high performance liquid chromatography as a reference method for each components. Root mean square error of prediction (RMSEP) for berberine, palmatine, jatrorrhizine and total alkaloid were 0.184, 0.109, 0.054 and 0.325, respectively. The recoveries were determined to be 97.67%~99.59%, 96.63%~100.70%, 95.15%~101.15% and 97.41%~99.89% for berberine, palmatine, jatrorrhizine and total alkaloid, respectively. The relative standard deviations were 0.3% for berberine, 0.6% for palmatine, 1.8% for jatrorrhizine, and 0.3% for total alkaloid, respectively. The results show that the presented method has a good reproducibility and stability and can be applied to on-line detection in industrial process.

Keywords Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy, *Coptis* extract, partial least square , on-line detection

(Received 18 April 2003; accepted 17 November 2003)