



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102539566 B

(45) 授权公告日 2013.05.08

(21) 申请号 201110448680.X

(22) 申请日 2011.12.28

(73) 专利权人 河南中医学院

地址 450008 河南省郑州市金水区金水路 1 号

(72) 发明人 谢彩侠 白雁 雷敬卫 王星
左春芳

(74) 专利代理机构 郑州天阳专利事务所(普通合伙) 41113

代理人 宋金鼎

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 21/35 (2006.01)

(56) 对比文件

汤兴利等. 盾叶薯蓣皂素提取工艺及检测方

法研究进展. 《中药材》. 2004, 第 27 卷 (第 11 期), 877-880.

徐学民等. 葫芦巴中皂苷成分的研究 III 新皂苷 D 的分离纯化及化学结构测定. 《中草药》. 2005, 第 36 卷 (第 6 期), 805-808.

审查员 李哲

权利要求书 2 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

运用近红外光谱技术快速测定盾叶薯蓣中薯蓣皂苷含量的方法

(57) 摘要

本发明涉及运用近红外光谱技术快速测定盾叶薯蓣中薯蓣皂苷含量的方法,有效解决传统分析方法繁琐、生产成本低、效率低、原料浪费多的问题,用近红外光谱仪扫描校正样品集的近红外吸收光谱,预处理和谱区选择得校正样品集特征光谱,用高效液相色谱法测校正样品集薯蓣皂苷的指标含量,作为参考值,运用偏最小二乘法将校正样品集特征光谱和参考值相结合建立校正模型,再将验证样品集特征光谱代入校正模型中,得 NIR 预测值,与用 HPLC 法测定的验证样品集薯蓣皂苷的含量对照,对校正模型验证,将待测样品粉碎,扫描其近红外光谱图,预处理和谱区选择后,输入校正模型,本发明时间短、速度快、准确,实时在线检测,提高了工作效率,降低成本。

1. 一种运用近红外光谱技术快速测定盾叶薯蓣中薯蓣皂苷含量的方法,其特征在于,由以下步骤实现:

(1) 校正模型的建立:收集盾叶薯蓣样品,选择 4/5 作为校正样品集,余下的作为验证样品集,校正样品集用于建立光谱校正模型,将校正样品集中的样品分别运用近红外光谱仪进行扫描,采集校正样品集原始光谱数据,用 TQ8.0 分析软件,对校正样品集原始光谱数据的预处理方法和波段进行选择,得出校正样品集中薯蓣皂苷含量的特征光谱信息,同时,利用 HPLC 法测定校正样品集中的薯蓣皂苷的含量,将测得的含量数据与校正样品集中薯蓣皂苷含量的特征光谱信息相结合,采用 PLS 法建立校正模型;

(2) 校正模型的验证:将验证样品集中的样品分别通过近红外光谱仪扫描,得到验证样品集原始光谱数据,进行预处理和波段选择后,输入校正模型中,得出验证样品集 NIR 预测值,并与利用 HPLC 法测定的验证样品集中薯蓣皂苷的含量对照,对校正模型进行验证,判定验证样品集是否为界外点,正确认定后,加入界外点重新按校正模型建立步骤重新建立校正模型,对校正模型不断完善,优化和检验校正模型的性能,循环优化各建模参数,最终确定最佳的参数;

(3) 待测盾叶薯蓣样品中薯蓣皂苷含量的预测:将待测的盾叶薯蓣样品粉碎,扫描得到近红外图谱数据,扫描的条件和方法与获取校正样品集的原始光谱的条件和方法相一致,对扫描的近红外图谱数据进行光谱预处理和波段选择后,代入到校正模型中,即得到该盾叶薯蓣样品的薯蓣皂苷的含量值,其中,近红外图谱数据预处理和波段选择与校正样品集的原始光谱数据预处理和波段选择的方法和条件相一致;

所述的收集盾叶薯蓣样品:收集不同生长年限、不同产地、不同土质的盾叶薯蓣药材 88 份,去除杂质,60℃干燥后粉碎,过 40 目筛,得药材粉末,置于干燥器中,作为盾叶薯蓣样品;

所述的采集校正样品集原始光谱数据:取盾叶薯蓣样品中的 4/5 作为校正样品集,用美国 ThermoNicole 公司的 6700 型近红外光谱仪对校正样品集中的药材粉末进行扫描:各取 5g 药材粉末,分别放入石英样品杯中,混合均匀,以空气为参比,扣除背景采集光谱图,采用积分球漫反射,分辨率:8cm⁻¹,扫描次数:32 次,扫描范围:12000 ~ 4000cm⁻¹,温度:25 ~ 30℃,每个样品重复扫描 3 次,求平均光谱,即得校正样品集的原始光谱数据;

所述的光谱预处理是:采用一阶导数的光谱预处理方法对校正样品集的原始光谱数据进行预处理;波段选择是 5478.62 ~ 8920.09cm⁻¹;

所述的利用 HPLC 法测定校正样品集中的薯蓣皂苷的含量:

1)、色谱条件:色谱柱为 DIKMA C18 色谱柱 250mm×4.6mm,5 μm,流动相:乙腈与水的体积比为 45 : 55,流速为 1.0mL·min⁻¹,检测波长为 210nm,柱温为 30℃,进样量 20 μl,理论塔板数按薯蓣皂苷峰计算为 4000 以上;

2)、对照品溶液的制备:精密称取 60℃减压干燥 4 小时的薯蓣皂苷对照品 0.004g,加甲醇制成 0.400mg·ml⁻¹ 的薯蓣皂苷对照品溶液,经 0.45um 的微孔滤膜过滤;

3)、供试品溶液的制备:分别取校正样品集中的盾叶薯蓣粉末 2g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入质量浓度为 80% 的乙醇 50ml,密塞,称重,在 700W,40kHz 的条件下,超声 40min,冷却后,用质量浓度为 80% 的乙醇补足重量,摇匀,过滤,吸取滤液 25ml,浓缩至干,得干渣,用甲醇溶解,经 0.45um 的微孔滤膜过滤;

4)、样品测定 :分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L 注入高效液相色谱仪,测定,即得 HPLC 测定的校正样品集中薯蓣皂苷含量。

运用近红外光谱技术快速测定盾叶薯蓣中薯蓣皂苷含量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域,特别是一种运用近红外光谱技术快速测定盾叶薯蓣中薯蓣皂苷含量的方法。

背景技术

[0002] 盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright,又名黄姜、火头根,为薯蓣科薯蓣属多年生草本植物,以根状茎入药,具有清肺止咳、利湿通淋、通络止痛、解毒消肿之功效。其根茎中薯蓣皂苷元(俗称皂素)的含量为 1.1%~16.15%,居世界薯蓣属之首,是合成甾体激素类药物和甾体避孕药的主要原料,也是生产盾叶冠心宁、地奥心血康等的重要原料。薯蓣皂苷是薯蓣皂苷元的原皂苷,现在研究广泛应用于风湿性关节炎、心脏病、抗肿瘤、抗衰老、止血、抗炎等的治疗。薯蓣皂苷含量的高低直接决定其临床疗效和工业利用价值,而目前检测薯蓣皂苷含量检测方法多为高效液相色谱法(HPLC)。该法对样品的前处理较为复杂,且费用较高,不利于中药现代化发展,因此,需要建立一种快速、高效,准确的检测方法。

[0003] 近红外(NIR)光谱技术是20世纪80年代后期发展起来的一种新兴技术,是近几十年来发展最为迅速、最引人注目的绿色分析方法,目前已经广泛地应用于石油化工、农业、食品和药物的定性定量分析。与传统分析技术相比,近红外光谱分析技术通过对样品的一次近红外光谱简单测量,即可在几秒至几分钟之内同时测定一个样品的几种至十几种性质数据或浓度数据,而且被测样品用量小、无破坏、无污染,具有高效、快速、成本低和绿色的优点,而至今还未见有关利用近红外光谱技术检测盾叶薯蓣中薯蓣皂苷的含量的报道。

发明内容

[0004] 针对上述情况,为克服现有技术缺陷,本发明之目的就是提供一种运用近红外光谱技术快速测定盾叶薯蓣中薯蓣皂苷含量的方法,可有效解决传统中药定量分析方法的繁琐、生产成本低、效率低、原料浪费过多的问题。

[0005] 本发明解决的技术方案是,收集盾叶薯蓣样品分别作为校正样品集和验证样品集,运用近红外光谱仪扫描校正样品集的近红外吸收光谱,得校正样品集光谱数据,然后对校正样品集光谱数据预处理和谱区选择,得校正样品集特征光谱,采用高效液相色谱法测定出校正样品集薯蓣皂苷的指标含量,以此作为参考值,运用化学计量学中的偏最小二乘法(PLS)法将校正样品集特征光谱和参考值相结合建立近红外光谱多元校正模型(又称校正模型),再将验证样品集以和获得校正样品集特征光谱同样的方法和条件得到验证样品集特征光谱,将验证样品集特征光谱信息代入校正模型中,得出验证样品集NIR预测值,并与利用HPLC法测定的验证样品集中薯蓣皂苷的含量对照,对校正模型的验证和完善以后,对待测的盾叶薯蓣样品进行分析,对于待测的盾叶薯蓣样品,粉碎,扫描其近红外光谱图,并对扫描的近红外图谱进行预处理和谱区选择后,输入校正模型中,经过校正模型的测定

即得该盾叶薯蓣样品的薯蓣皂苷指标含量。

[0006] 本发明整个过程时间短、速度快、准确,能够实时在线检测,大大提高了工作效率,降低运行成本。

具体实施方式

[0007] 以下结合实施例对本发明的具体实施方式作详细说明。

[0008] 本发明的具体步骤如下:

[0009] (1) 校正模型的建立:收集盾叶薯蓣样品,选择 4/5 作为校正样品集,余下的作为验证样品集,校正样品集用于建立光谱校正模型,将校正样品集中的样品分别运用近红外光谱仪进行扫描,采集校正样品集原始光谱数据,用 TQ 定量分析软件,对校正样品集原始光谱数据的预处理方法和波段进行选择,得出校正样品集中薯蓣皂苷含量的特征光谱信息,同时,利用 HPLC 法测定校正样品集中的薯蓣皂苷的含量,将测得的含量数据与校正样品集中薯蓣皂苷含量的特征光谱信息相结合,采用 PLS 法建立校正模型;

[0010] (2) 校正模型的验证:将验证样品集中的样品分别通过近红外光谱仪扫描,得到验证样品集原始光谱数据,进行预处理和波段选择后,输入校正模型中,得出验证样品集 NIR 预测值,并与利用 HPLC 法测定的验证样品集中薯蓣皂苷的含量对照,对校正模型进行验证,判定验证样品集是否为界外点,正确认定后,加入界外点重新按校正模型建立步骤重新建立校正模型,对校正模型不断完善,优化和检验校正模型的性能,循环优化各建模参数,最终确定最佳的参数;

[0011] (3) 未知样品的预测:用验证和完善过的校正模型对待测样品中薯蓣皂苷的含量进行预测,将待测样品粉碎,扫描其近红外光谱图,而后对扫描的近红外图谱进行预处理和波段选择,提取特征光谱输入到验证和完善过的校正模型中,即得该盾叶薯蓣中薯蓣皂苷的含量。

[0012] 本发明的具体实施方法如下:以下结合实施例对本发明的具体实施方式作详细说明:

[0013] 具体步骤如下:

[0014] (1) 选择和收集样品:收集不同生长年限(如 1 年生、2 年生、3 年生、4 年生和 5 年生等)、不同产地(如内乡、浙川和西峡等)、不同土质(如沙土、壤土和粘土)的盾叶薯蓣药材 88 份,去除杂质,60℃干燥后粉碎,过 40 目筛,得药材粉末,置于干燥器中,作为盾叶薯蓣样品;

[0015] (2)、建立校正模型:

[0016] A、校正样品集的扫描:取盾叶薯蓣样品中的 4/5 作为校正样品集,用美国 ThermoNicole 公司的 6700 型近红外光谱仪对校正样品集中的药材粉末进行扫描:各取 5g 药材粉末,分别放入石英样品杯中,混合均匀,以空气为参比,扣除背景采集光谱图,采用积分球漫反射,分辨率:8cm⁻¹,扫描次数:32 次,扫描范围:12000 ~ 4000cm⁻¹,温度:25 ~ 30℃,每个样品重复扫描 3 次,求平均光谱,即得校正样品集的原始光谱数据;

[0017] B、校正样品集中薯蓣皂苷含量的 HPLC 测定

[0018] 1)、色谱条件:色谱柱为 DIKMA C18 色谱柱(250mm×4.6mm,5 μm),流动相:乙腈与水的体积比为 45 : 55,流速为 1.0mL·min⁻¹,检测波长为 210nm,柱温为 30℃,进样量

20 μ l, 在此色谱条件下薯蓣皂苷与相邻色谱峰的分度良好, 理论塔板数按薯蓣皂苷峰计算为 4000 以上;

[0019] 2)、对照品溶液的制备: 精密称取 60 $^{\circ}$ C 减压干燥 4 小时的薯蓣皂苷对照品 (购自成都曼斯特生物制品有限公司) 0.004g, 加甲醇制成 0.400mg \cdot ml $^{-1}$ 的薯蓣皂苷对照品溶液, 经 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 备用;

[0020] 3)、供试品溶液的制备: 分别取校正样品集中的盾叶薯蓣粉末 2g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入质量浓度为 80% 的乙醇 50ml, 密塞, 称重, 超声 (700W, 40kHz) 40min, 冷却后, 用质量浓度为 80% 的乙醇补足重量, 摇匀, 过滤, 吸取滤液 25ml, 浓缩至干, 得干渣, 用甲醇溶解, 经 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 备用;

[0021] 4)、样品测定: 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L 注入高效液相色谱仪, 测定, 即得 HPLC 测定的校正样品集中薯蓣皂苷含量;

[0022] C、光谱预处理方法的选择: 在近红外光谱仪采集光谱时, 由于外部环境、仪器工作状态、样品物理性质的差异, 会对模型的建立造成比较大的影响, 通过对光谱进行预处理可以最大限度的减少影响, 以建立较为准确的模型, 所述的光谱预处理方法是: 采用一阶导数、二阶导数、平滑处理, 多元散射校正、标准归一化法等方法中的一种或多种结合对校正样品集的原始光谱数据进行预处理, 评价模型性能的指标有决定系数 (R^2)、交叉检验误差均方根 (Root Mean Square Error of Calibration, RMSECV), 预测误差均方根 (Root Mean Square Error of Validation, RMSEP), 并以决定系数 (R^2) 和 RMSECV 为考核指标, 对光谱预处理结果进行分析, 由表 1 可以看出, 一阶导数的光谱预处理方法效果最好;

[0023] 表 1 不同光谱预处理方法对 RMSECV 和 R^2 的影响

	光谱预处理方法	R^2	RMSECV
[0024]	多元散射校正 (MSC)	0.56572	0.0685
	标准归一化 (SNV)	0.56668	0.0684
	一阶导数 (First derivative)	0.99208	0.0104
[0025]	二阶导数 (MSC + First derivative)	0.96851	0.0207
	SNV + First derivative	0.96892	0.0205

[0026] D、建模波段的选择: 近红外光谱的波段扫描范围是 12000 \sim 4000 cm^{-1} , 在这个波段范围内包含待测组分的信息, 但同时还包含了一些冗余信息, 因此, 在建模时要求选择的波段区间尽量避免冗余信息, 还要包含大量待测组分的信息, 同时尽可能地降低噪声干扰, 这样才能选择薯蓣皂苷含量的特征光谱信息, 获得最佳的预测效果, 本发明利用 TQ 8.0 软件, 以 R^2 和 RMSECV 为考核指标, 对建模波段进行筛选, 结果见表 2, 最佳建模波段范围是 5478.62 \sim 8920.09 cm^{-1} ;

[0027] 表 2 建模波段对模型的影响

	光谱范围/ cm^{-1}	R^2	RMSECV
	4017.99~10237.61	0.68918	0.0602
[0028]	4008.81~5916.90	0.81218	0.0484
	5632.96~7688.32	0.92214	0.0321
	5478.62~8920.09	0.99208	0.0104

[0029] E、主因子数（主因子数又称主成分数，以下同，要完整表征校正样品集原始光谱的信息，需要大量因子，而采用不同的因子数，校正集 RMSECV 有较大的差异，为充分提高光谱信号的有效信息利用率，同时避免出现“过拟合”现象，需要对主因子的个数进行合理的选择）的选择：采用 PLS 法建立校正模型，主因子数对模型的预测能力有很大影响，因此在建模过程中我们以校正样品集 RMSECV 为优化参数，选择主因子数，当 RMSECV 值最小时，所选主因子数最佳，最佳主因子数为 7；

[0030] F、将上述经一阶导数预处理的校正样品集的原始光谱数据，在波段 $5478.62 \sim 8920.09\text{cm}^{-1}$ 范围内，主因子数为 7 的条件下，得到的校正样品集薯蓣皂苷含量的特征光谱信息运用 PLS 法与 HPLC 测定的校正样品集中薯蓣皂苷含量相对应，建立盾叶薯蓣中薯蓣皂苷的校正模型（又称校正模型），将用 HPLC 法测定校正样品集中薯蓣皂苷的含量值作为校正样品集参考值，校正模型中的数值作为校正样品集预测值，其中校正样品集决定系数 R^2 为 0.99208，交叉检验误差均方根 RMSECV 为 0.0104，预测误差均方根 RMSEP 为 0.0105；

[0031] (3) 校正模型的验证：

[0032] 依据上述所建立的校正模型，将盾叶薯蓣样品中 1/5 样品作为验证样品集，进行近红外光谱扫描，得到验证样品集的原始光谱信息，获取验证样品集的原始光谱信息采用的扫描方法和条件同获取校正样品集的原始光谱数据的扫描方法和条件保持一致，对验证样品集的原始光谱信息进行预处理和波段选择，得验证样品集特征光谱信息，验证样品集的原始光谱信息的预处理和波段选择与校正样品集的原始光谱数据的预处理和波段选择的方法相一致，将验证样品集特征光谱信息代入校正模型中，得到验证样品集 NIR 预测值，采用 HPLC 法测定验证样品集的薯蓣皂苷含量（与上述 HPLC 法测定校正样品集中薯蓣皂苷的含量的条件和方法相一致），并将 HPLC 法测定验证样品集的薯蓣皂苷含量值作为验证样品集参考值，验证样品集 NIR 预测值与验证样品集参考值进行对照，对校正模型进行检验，结果见表 3；

[0033] 表 317 份验证样品集中的样品的近红外模型预测值

编号	参考值 /%	预测值 /%	绝对误差	相对误差/%	平均相对误差 /%
11	0.2247	0.2309	0.0062	2.76	
13	0.2455	0.2423	-0.0032	1.30	
16	0.0967	0.0956	-0.0011	1.14	
23	0.2143	0.2059	-0.0084	3.92	
24	0.1176	0.1222	0.0046	3.91	
45	0.1094	0.1004	-0.009	8.23	
55	0.2037	0.1924	-0.0113	5.55	
[0034] 62	0.2212	0.2375	0.0163	7.37	
63	0.3357	0.3493	0.0136	4.05	4.12
67	0.2448	0.2656	0.0208	8.50	
74	0.2387	0.2419	0.0032	1.34	
81	0.3011	0.3143	0.0132	4.38	
83	0.2502	0.2601	0.0099	3.96	
90	0.2033	0.2096	0.0063	3.10	
91	0.2701	0.2743	0.0042	1.55	
93	0.2199	0.2029	-0.0170	7.73	
95	0.3357	0.3401	0.0044	1.31	

[0035] 由表 3 可以看出,17 份验证样品集中的样品的近红外光谱预测值能够准确的逼近 HPLC 的测定值,说明建立的薯蓣皂苷校正模型具有良好的预测能力;

[0036] (4) 待测盾叶薯蓣样品中薯蓣皂苷含量的预测

[0037] 将待测的盾叶薯蓣样品粉碎,扫描得到近红外图谱数据,扫描的条件和方法与获取校正样品集的原始光谱的条件和方法相一致,对扫描的近红外图谱数据进行光谱预处理和波段选择后,代入到校正模型中,即得到该盾叶薯蓣样品的薯蓣皂苷的含量值,其中,近红外图谱数据预处理和波段选择与校正样品集的原始光谱数据预处理和波段选择的方法和条件相一致。

[0038] 综上所述,相对于高效液相色谱法测定薯蓣皂苷含量,本发明可以为盾叶薯蓣的临床用药和工业利用提供一种快速、准确测定其薯蓣皂苷含量的方法,同时降低污染,具有显著的经济和社会效益。