

A Real-Time Rapid Analysis Method for the Determination of Total Alkaloids in *Fritillariae Cirrhosae* Bulbus by AOTF-NIR

Weihong Wu¹, Fusen Yang², Dai Sun³, Haiping Dong⁴

¹Shandong Medical College, Ji'nan Shandong

²Taian City Central Hospital, Tai'an Shandong

³Shandong Maternal and Child Health Hospital, Ji'nan Shandong

⁴Jinan Jinhongli Industrial Co., Ltd., Ji'nan Shandong

Email: weihong204 @163.com

Received: Apr. 11th, 2020; accepted: Apr. 23rd, 2020; published: Apr. 30th, 2020

Abstract

Objective: To establish a new method for real-time rapid determination of total alkaloids in *Fritillariae Cirrhosae* Bulbus by acousto-optic tunable filter-near infrared (AOTF-NIR) spectroscopy. **Methods:** The content of total alkaloids in the sample was measured with the 2015 edition of Chinese Pharmacopoeia. Then, multivariate calibration models based on PLS1 algorithm were developed to correlate the spectra and the corresponding values determined by the reference methods. **Results:** The quantitative analysis models of total alkaloids content performed well. RMSEP of the model was 0.0022 and the correlation coefficient of the models was 0.9909. The mean relative error for the test sets was 2.16%. **Conclusions:** The method is rapid, accurate and pollution-free, and can be used for the rapid determination of total alkaloids in *Fritillariae Cirrhosae* Bulbus.

Keywords

Acousto-Optic Tunable Filter-Near Infrared (AOTF-NIR) Spectroscopy, *Fritillariae Cirrhosae* Bulbus, Total Alkaloids, Real-Time Rapid Analysis

声光可调 - 近红外光谱技术即时快速检测 川贝母中总生物碱含量方法研究

武卫红¹, 杨复森², 孙岱³, 董海平⁴

¹山东医学高等专科学校, 山东 济南

²泰安市中心医院, 山东 泰安

³山东省妇幼保健院, 山东 济南

⁴济南金宏利实业有限公司, 山东 济南
Email: weihong204 @163.com

收稿日期: 2020年4月11日; 录用日期: 2020年4月23日; 发布日期: 2020年4月30日

摘要

目的: 建立一种采用声光可调-近红外光谱(AOTF-NIR)技术即时快速检测川贝母中总生物碱含量的新方法。方法: 依据2015年版《中国药典》川贝母项下方法, 测定川贝母中总生物碱含量, 利用偏最小二乘法(PLS1)建立校正集样本总生物碱含量测定值与其NIR光谱间的定量分析模型, 并对验证集样本进行预测。结果: 建立的总生物碱定量分析模型准确性较好, 外部交叉验证均方差(RMSEP)为0.0022, 决定系数(R^2)为0.9831; 所建模型对验证集样品的验证结果较好, 平均相对误差为2.16%; 预测值与化学测定值间相关系数 r 为0.9909。结论: 该方法快速、准确、无污染, 可用于川贝母中总生物碱含量的即时快速检测分析。

关键词

声光可调近红外光谱技术, 川贝母, 生物碱, 即时快速检测

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

川贝母用药历史悠久, 具有清热润肺, 化痰止咳的功效, 其主要有效成分为生物碱类与皂苷类[1] [2]。2015 版《中国药典(一部)》将总生物碱含量作为川贝母品质评价定量分析指标, 采用酸性染料比色法测定其含量, 而文献中则多采用高效液相色谱法对川贝母中单一生物碱成分进行测定[3] [4] [5]。以上传统测定方法的共同缺点是均需进行提取、分离等前处理, 操作繁琐, 分析周期长, 难以实现现场快速分析检测, 不利于商品流通中假劣药材的快速筛查。

近红外(Near-infrared)分析技术具有成本低、速度快、无损采样、无污染的检测特性, 不仅能进行“离线”分析, 还能直接进行“在线”过程控制, 近年来已成功应用于药物分析领域[6], 《中国药典》从 2005 版开始至 2015 版, 已连续三版将“近红外分光光度法指导原则”列入通则中[7]。20 世纪 90 年代末出现了以声光可调滤光器(Acousto-optic Tunable Filter, AOTF)为分光元件的近红外光谱仪, 与“光栅扫描”、“傅立叶变换”等传统近红外光谱仪相比, 因其具有体积小、便携、重现性好、环境适应性强、可用于现场快速分析等优势, 已逐渐在烟草、化工、医药等领域的分析检测中得到应用[8] [9]。本研究首次将 AOTF 近红外光谱分析技术引入川贝母的定量分析检测中, 拟建立川贝母的快速定量分析方法, 为解决商品川贝母假劣药材频现、市场混乱的问题提供一种快速便捷的分析技术。

2. 仪器与试剂

Luminar 5030 型便携式 AOTF 近红外光谱仪(美国 BRIMROSE 公司), 包括: Snap! 光谱采集软件和 The Unscrambler 分析软件(挪威 CAMO 公司); UV5800 紫外可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公

司)。

西贝母碱: (上海源叶生物科技有限公司, 批号: 20171220, 供含量测定用); 所用试剂均为分析纯。川贝母(来源于暗紫贝母 *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K.C.Hsia 的干燥鳞茎, 商品规格为“松贝”)共 42 批, 产地分别为: 四川阿坝松潘县(14 批)、四川阿坝黑水县(12 批)、四川阿坝若尔盖县(8 批)、四川甘孜邓柯县(8 批), 样品经山东大学药学院温学森教授鉴定。

3. 方法与结果

3.1. 化学值的测定

按 2015 版《中国药典》川贝母项下含量测定方法[3], 采用酸性染料比色法测定 42 批川贝母样品中总生物碱含量, 测定结果见表 1。

Table 1. Chemical values of total alkaloids in *Fritillariae Cirrhosae* Bulbus (n = 3)

表 1. 川贝母样品中总生物碱含量化学值(n = 3)

样品编号	总生物碱含量/%	RSD/%	样品编号	总生物碱含量/%	RSD/%
01	0.08541	0.97	22	0.05795	0.87
02	0.09178	1.30	23	0.07841	1.46
03	0.07202	1.69	24	0.06419	1.58
04	0.08681	0.94	25	0.03495	1.97
05	0.06000	2.72	26	0.08171	0.75
06	0.05240	3.14	27	0.08189	1.01
07	0.10220	1.91	28	0.05400	1.55
08	0.05879	1.02	29	0.06039	0.38
09	0.10780	1.49	30	0.06793	1.70
10	0.06974	0.33	31	0.03316	1.18
11	0.05961	3.17	32	0.06844	0.45
12	0.07619	0.84	33	0.05993	1.34
13	0.06594	0.47	34	0.06321	0.49
14	0.06371	1.23	35	0.06244	0.78
15	0.05872	2.11	36	0.05766	0.45
16	0.05023	0.78	37	0.06285	1.54
17	0.07281	1.13	38	0.06322	0.89
18	0.10031	0.86	39	0.05287	0.77
19	0.07078	1.32	40	0.07445	1.04
20	0.06553	1.14	41	0.05929	1.07
21	0.05884	1.12	42	0.08487	2.01

2015 版《中国药典》规定川贝母按干燥品计算, 含总生物碱以西贝母碱($C_{27}H_{43}NO_3$)计, 不得少于 0.050%。由表 1 中可以看出 25 号和 31 号样品总生物碱含量不符合药典要求, 其他各批均符合药典规定。剔除不合格样品, 从剩余 40 批样品中随机选取 6 批为验证集样品, 其余为校正集样品, 用于分析模型的

建立。

3.2. 近红外光谱采集及光谱预处理

将所有样品置于恒温干燥箱内 60℃干燥 12 h 后，粉碎，过 80 目筛，分别采集光谱，取约 5 g 置于样品槽，用盒盖将样品表面刮平，加盖一起置于支架上，将光谱仪的探头垂直卡在样品盒盖的圆孔处，于 1100~2300 nm 波长范围内进行漫反射扫描，波长增量 2 nm，扫描平均次数为 300 次，每个样品重复扫描 3 次，取平均光谱，所测近红外光谱见图 1。

对扫描得到的原始吸收光谱进行微分处理，可以消除基线漂移的影响，提高分辨率和灵敏度。经比较，本研究采取一阶微分处理(9 点平滑)效果较好，见图 2。

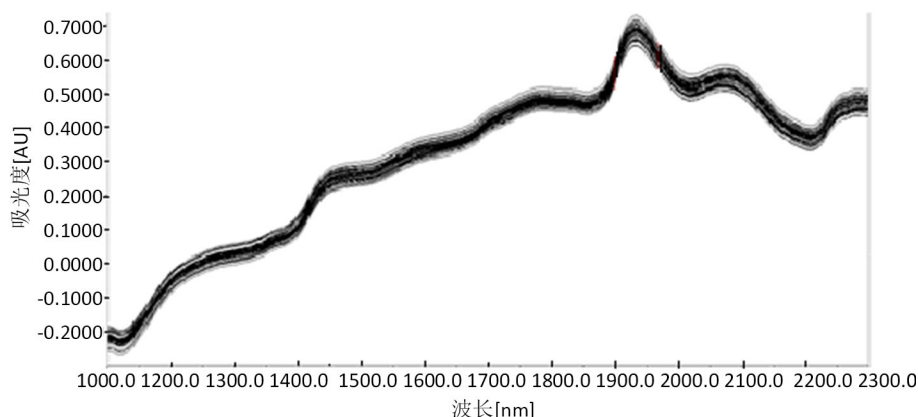


Figure 1. Original NIR spectra of Fritillariae Cirrhosae Bulbus

图 1. 川贝母原始吸收光谱图

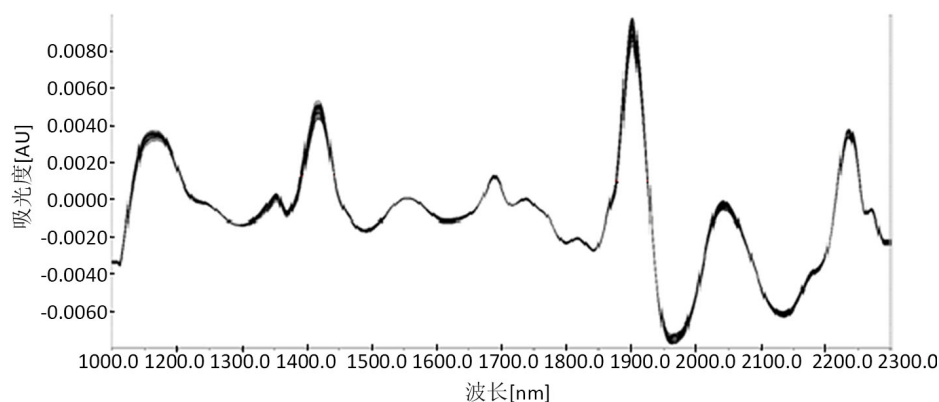


Figure 2. First derivative spectra of Fritillariae Cirrhosae Bulbus

图 2. 川贝母一阶导数光谱图

3.3. 定量模型的建立

利用 The Unscrambler 化学计量学分析软件，将校正集样品经预处理后的光谱数据与化学方法测定的总生物碱含量数据进行关联，分别采用光谱影响值 Leverage 和化学值误差 Residual 两个统计量来检验剔除异常值，采用偏最小二乘法(PLS1)，内部交叉验证法，设主成分数 15，建立川贝母的定量分析模型；并依据内部交叉验证决定系数(R^2_{CV})、内部交叉验证均方差(RMSECV)、外部验证决定系数(R^2_{Cal})、外部验证均方差(RMSEP)确定最优模型，见图 3。

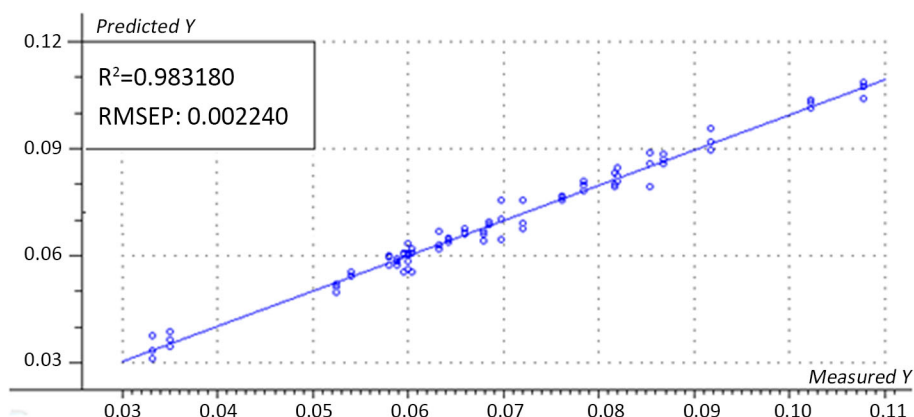


Figure 3. PLS1 regression model of total alkaloids in *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*

图 3. 川贝母中总生物碱含量 NIR 定量模型图

由图 3 可见, 采用优化条件建立的 NIR 光谱校正模型, 样品总生物碱预测值与酸性染料比色法分析值之间相关性良好, 测定数据偏差较小, 内部交叉验证决定系数 $R^2 = 0.9831$, $RMSEP = 0.0022$ 。

3.4. 检测模型效果

用所建 PLS1 定量模型对 6 批验证集样品进行预测, 总生物碱含量预测结果见表 2。

Table 2. Predicted results of the validation samples by model of total alkaloids (n = 3)

表 2. 总生物碱定量模型对验证集样品的预测结果(n = 5)

样品编号	预测值(%)	测定值(%)	相对误差(%)
y01	0.08495	0.08542	-0.55
y02	0.07025	0.07202	-2.45
y03	0.06208	0.06105	1.68
y04	0.05165	0.05240	-1.43
y05	0.07209	0.07022	2.66
y06	0.06877	0.06701	2.62
平均值			2.16

由表 2 可见, 样品的近红外光谱预测值与化学测定值间相关性良好, 经统计学分析, 相关系数 $r = 0.9909$, 配对 T 检验结果 $P = 0.402 > 0.05$, 表明两种方法测得的总生物碱含量无显著性差异。

4. 讨论

本研究采用 AOTF-近红外光谱技术建立了川贝母中总生物碱的定量分析模型, 从预测结果可见, 本法可实现对川贝母中总生物碱含量的快速测定。传统分析方法繁琐费时, 测量一个样品所需时间至少 4.5 h, 而本研究建立的方法, 只需对样本采集一次光谱数据, 利用已建 NIR 定量模型进行分析, 即时显示结果, 整个操作过程可在 5 min 内完成, 大大减少检测时间, 降低检测成本, 提高工作效率, 此研究不仅为川贝母的快速定量分析提供了新方法, 还可为其他中药的快速分析提供借鉴。

由表 1 可知, 所测定的 42 批川贝母样品中总生物碱含量差异较大, 含量范围为 0.03316%~0.1078%, 还有两批样品中总生物碱含量不符合药典要求, 究其原因, 可能是不同产地、不同种植方式(包括种子和鳞茎), 不同采收期等原因导致药材中成分含量的差异较大, 该结果同时提示, 急需将 AOTF-近红外光谱

技术引入到商品流通中,早日实现对川贝母等中药材真伪优劣的即时快速无损检测。

由于近红外光谱具有全息性特点,可以反映中药的全部信息(物理与化学因素),本研究基于药典标准的川贝母近红外光谱快速定量分析方法既能客观反映中药指标成分变化情况,又能在宏观上有效控制中药整体质量,更能体现中医药特点,使川贝母的质量控制更全面、科学。

基金项目

山东省高等学校科技计划项目(J111LF28);山东省职业教育技艺技能传承创新平台资助项目(201712);山东省首届青年技能名师培养资助项目(2016)。

参考文献

- [1] 赵倩,李波,关瑜,孟祥才. 贝母属药材化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药业, 2020, 29(5): 57-59.
- [2] 张志勇,杨洁,齐泽民. 川贝母的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(24): 9-13.
- [3] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部) [S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 36-38.
- [4] 朱林. 贝母药材中生物碱及核苷类成分的定量分析研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.
- [5] 刘鹏,刘久石,齐耀东,等. UPLC-ELSD 同时测定贝母类药材中 6 种生物碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(06): 1393-1398.
- [6] 黄洁,单敏,王沅桃,陈德妙. 近红外光谱技术在药品质量控制中的应用研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(33): 4744-4747.
- [7] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(四部) [S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 通则 9104.
- [8] 边雨,佟志军,魏晓雨,等. 声光可调-近红外漫反射光谱法快速评价满山红药材质量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(6): 694-697.
- [9] 张云龙,张小江,卫青,等. 声光可调近红外光谱技术快速检测再造烟叶的厚度[J]. 光谱实验室, 2013, 30(1): 207-212.