

# 近红外光谱快速分析银杏离心液中萜类内酯的含量

王 军<sup>1</sup>, 韦亚芳<sup>1</sup>, 黄家鹏<sup>2</sup>, 王 钧<sup>2</sup>

<sup>1</sup>上海上药杏灵科技药业股份有限公司, 上海

<sup>2</sup>苏州泽达兴邦医药科技有限公司, 江苏 苏州

收稿日期: 2021年10月28日; 录用日期: 2021年12月31日; 发布日期: 2022年2月23日

## 摘 要

目的: 建立近红外光谱法快速检测银杏离心液中萜类内酯含量的方法。方法: 利用近红外光谱仪对银杏离心液样品进行扫描, 对其光谱进行预处理和波段选择, 并结合偏最小二乘法(partial least squares, PLS)建立萜类内酯含量快速无损检测方法。结果: 所建立的模型的决定系数 $R$ 为0.9177, 交叉验证均方根差值为0.0335, 对验证集样品进行预测并统计分析, 预测值与真实值之间无显著差异( $P > 0.05$ )。结论: 所建立的模型准确度高, 适用于银杏离心液中萜类内酯含量的快速检测。

## 关键词

银杏离心液, 萜类内酯, 近红外光谱技术, 偏最小二乘法, 过程质量控制

# Rapid Analysis of Content of Terpene Lactones in Ginkgo Centrifugal Solution by Near Infrared Spectroscopy

Jun Wang<sup>1</sup>, Yafang Wei<sup>1</sup>, Jiapeng Huang<sup>2</sup>, Jun Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shanghai Shangyao Xingling Technology Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai

<sup>2</sup>Suzhou Zeda Xingbang Pharmaceutical Technology Co., Ltd, Suzhou Jiangsu

Received: Oct. 28<sup>th</sup>, 2021; accepted: Dec. 31<sup>st</sup>, 2021; published: Feb. 23<sup>rd</sup>, 2022

## Abstract

Objective: To establish a method for rapid determination of terpenoids in ginkgo centrifugal solu-

tion by near infrared spectroscopy. **Methods:** NIR spectroscopy was used to scan the ginkgo centrifugal solution samples, and the spectra were pretreated and the bands were selected. A fast and non-destructive method for the determination of terpenoids was established by partial least squares (PLS) method. **Results:** The determination coefficients  $R$  of the established model were 0.9177, and the root mean square difference of cross-validation were 0.0335, respectively. There was no significant difference between the predicted value and the true value ( $P > 0.05$ ) after the prediction and statistical analysis of the validation set samples. **Conclusion:** The established model has high accuracy and is suitable for the rapid determination of terpenoids in ginkgo centrifugal solution.

## Keywords

Ginkgo Centrifugal Solution, Terpenoid Lactones, Near Infrared Spectroscopy, Partial Least Squares Method, Process Quality Control

Copyright © 2022 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

银杏(*Ginkgo biloba* L.)又称“裸子植物活化石”[1],其果实与种叶含有丰富的多糖、蛋白质、萜类内酯等物质,具有较高的药用价值,一直以来受到生物医药领域的广泛关注[2][3]。其中,银杏叶提取物中的酮酯生物活性物质具有抗氧化、止痛、治疗老年痴呆等身体疾病[4][5],关于银杏的保健品在美国每年的销售额可达20亿美元,是全球植物药物使用量最多的种类之一。在银杏药物生产过程中萜类内酯含量检测最常用的方法为高效液相色谱法[6],这种方法测量被测物含量精度高,重复性较好,但高效液相色谱预处理和操作过程复杂,检测过程消耗时间较长[7],无法实现对生产过程的及时监测和大批量测定。

近红外光谱是近二十年来发展最快的快速检测技术之一,在石化、医药、食品等领域内广泛应用[8][9],与传统化学分析方法相比,近红外技术能够实现无损、在线、快速检测[10][11][12],目前已逐渐向中药领域展开。中药生产过程复杂,无论是原料产地还是批次差异到生产过程中的每一工艺参数都直接影响最终产品的质量,因此,近红外光谱技术能够较好地满足对中药生产过程快速无损检测的需求。

本实验以银杏离心液为实验样品,采用近红外光谱技术对样本进行扫描,利用偏最小二乘法对样液的萜类内酯含量进行测定,并建立定量分析模型,以建立一种快速检测银杏离心液中萜类内酯含量的方法。

## 2. 实验部分

### 2.1. 仪器与试剂

赛默飞 UltiMate 3000 液相色谱仪;赛默飞 Antaris II 近红外光谱仪;100 ml、250 ml 锥形瓶;10 ml、25 ml 容量瓶;进样瓶;一次性针筒;过滤头(尼龙,13 mm,0.2  $\mu\text{m}$ ,北京百灵威科技有限公司)。

甲醇(AR,国药集团化学试剂有限公司);甲醇(HPLC,北京百灵威科技有限公司);磷酸(HPLC,上海麦克林生化科技有限公司)。

### 2.2. 实验方法

实验所用银杏离心液由上海上药杏灵科技药业股份有限公司提供。

## 萜类内酯

### 1) 供试品溶液的制备

称量本品 20 ml, 蒸干后残渣备用, 向残渣中加入缓冲溶液 10 mL~15 mL (向 1000 ml 水中加入 1.19 g 磷酸氢二钠和 8.25 g 磷酸二氢钾, 溶解后磷酸调节 pH 值至 5.8), 多次超声溶解残渣, 将其转移到多孔性硅藻土液液萃取柱或者硅藻土柱(规格分别为最大上样体积 20 mL 和填料: 545 型, 16 g, 内径为 2.5 cm), 待硅藻土将缓冲液全部吸附后, 静置 15 分钟, 接着用 100 mL 乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱液, 回收溶剂至干后, 用甲醇超声残渣将其溶解, 于 10 mL 容量瓶中用甲醇定容, 摇匀过滤待用。

### 2) 对照品溶液的制备

白果内酯对照品, 分别取银杏内酯 A、B、C 对照品, 精密称定, 加甲醇制成每 mL 各含白果内酯 0.5 mg, 银杏内酯 C 0.5 mg, 取银杏内酯 A 0.5 mg, 取银杏内酯 B 0.5 mg 的混合溶液, 做为对照品溶液, 平行做两份。

### 3) 色谱条件:

色谱柱: Waters X Bridge® Shield RP18 5  $\mu\text{m}$  4.6  $\times$  25 mm;

流动相: 水:甲醇 = 77:23;

流速: 1.0 mL/min;

时间: 45 min。

## 2.3. 近红外漫反射光谱采集

银杏离心液光谱采集预处理: 将所得的离心液置比色皿中采集近红外漫透射光谱。光谱采集条件: 扫描范围为 4000~10,000  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数为 32 次, 分辨率为 8  $\text{cm}^{-1}$ , 通道为 B Screen, 增益为 4。所得离心液原始光谱如图 1 所示。

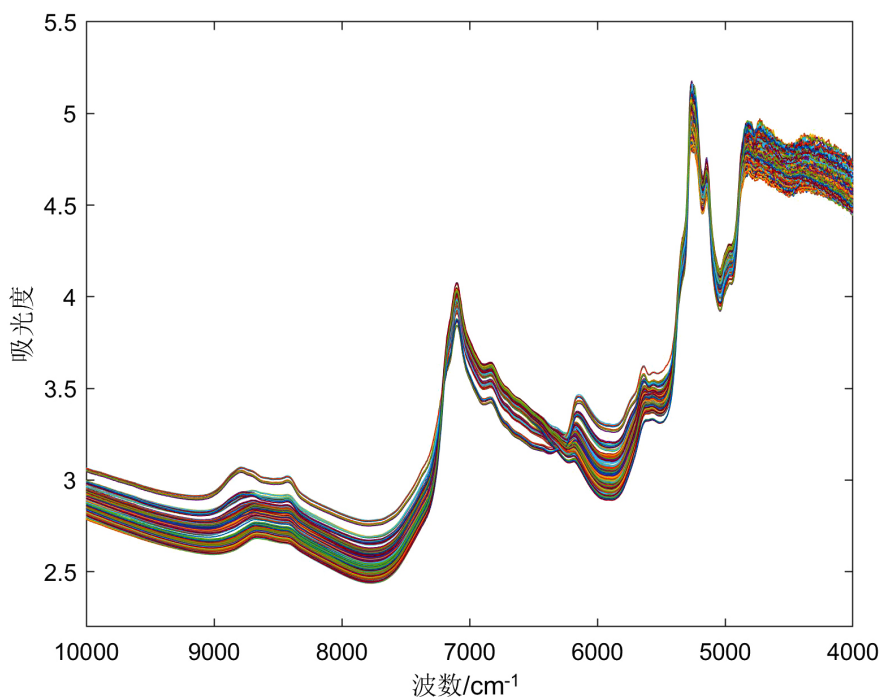


Figure 1. Near-infrared original spectra of centrifuge solution

图 1. 离心液近红外原始光谱

## 2.4. 数据处理与模型性能评价

将采集的近红外光谱与相应的理化值用偏最小二乘法建立近红外定量分析模型, 处理软件为 Bruker 公司的 OPUS 软件。首先对采集得到的用于校正集的光谱进行异常点判断, 有利于提高模型精度, 此外, 在建模之前, 对原始光谱利用平滑、微分等其他方法进行预处理, 目的是为了消除背景或者漂移对信号的影响, 再通过合适波段的选取对其建模, 不但有效提取光谱信息, 还缩短建模时间。

最适主因子数的选择以留一交互验证法中的交互验证误差均方根(Root Mean Square Error of Cross Validation, RMSECV)为指标。对于软件建立的 NIR-PLS 定量模型, 相关系数 R 越趋向 1, 说明模型的预测值越接近真实值, 模型的准确度越高; 模型的校正集预测误差均方根(Root Mean Square Error of Calibration, RMSEC)和验证集预测误差均方根(Root Mean Square Error of Prediction, RMSEP)着两个数值差异越小, 说明建立的模型预测精度越高, 预测值越接近真实值; 验证集相对偏差(RSEP)反应模型性能, 其数值越小说明模型预测效果越好, 通常模型的 RSEP 在 10%以内。以上参数均反应模型的性能, 本文主要通过分析这些指标判断建立的模型能否达到较好的预测效果。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 离心液中萜类内酯成分含量测定结果

实验所得萜类内酯的含量均根据 2.2 项中的液相方法得到, 萜类内酯含量的范围 0.621~3.813 mg/mL 之间。

### 3.2. 光谱预处理

光谱预处理是为了降低因外界因素造成的误差, 以此提高模型的稳定性和准确性。对光谱进行预处理经常用到的方法为 Norris 导数滤波平滑、一阶导数(1<sup>st</sup>)、二阶导数(2<sup>nd</sup>)、消除常数偏移量、矢量归一化(SNV)、多元散射校正(MSC)、Savitsky-Golay 滤波平滑(S-G)等。本实验用 OPUS 软件对采集到的光谱分别用下表方法分别处理, 其结果如下所示见表 1。

**Table 1.** Effect of different pretreatment methods on terpenoid content model of centrifuge

**表 1.** 不同预处理方法对离心液萜类内酯含量模型的影响

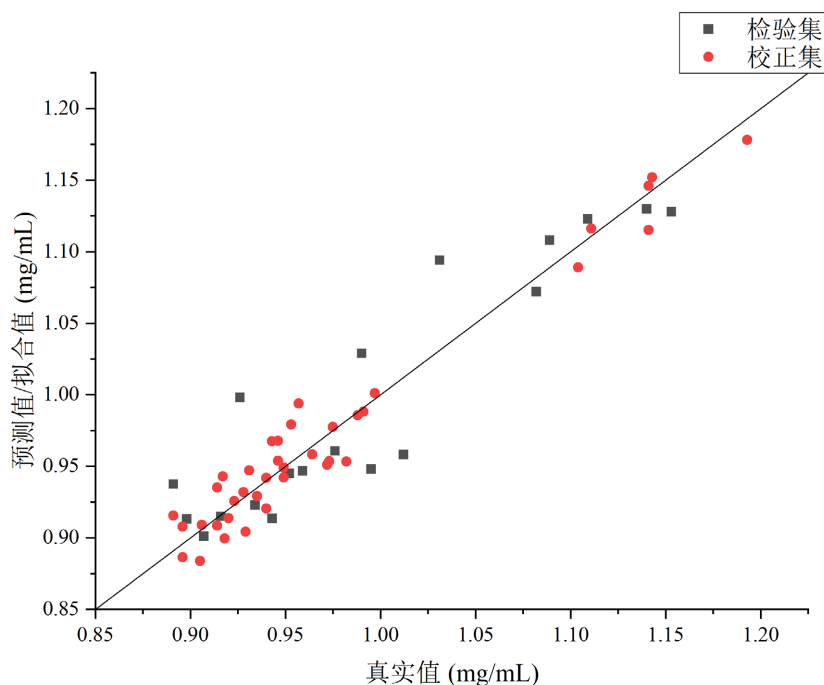
预处理方法	建模波段/cm <sup>-1</sup>	Rcal	RMSEP	RPD	Factor
<b>减去一条直线</b>	<b>9403.2~5449.8, 4601.3~4246.5</b>	<b>0.9177</b>	<b>0.0333</b>	<b>2.45</b>	<b>7</b>
消除常数偏移量	6101.7~5449.8	0.9199	0.0338	2.44	4
矢量归一化	9403.2~7497.9, 6101.7~5449.8	0.91331	0.0352	2.33	4
无光谱预处理	6101.7~5449.8	0.9036	0.0358	2.28	4
一阶导数	9403.2~7497.9, 6101.7~5449.8	0.9026	0.0365	2.27	4

通过比较发现, 银杏离心液萜类内酯含量在 9403.2~5449.8, 4601.3~4246.5 cm<sup>-1</sup> 的波段范围内, 通过减去一条直线进行处理后得到的模型有较低的 RMSEP 值和较高的 RPD 值, 且 R 值更接近 1。

### 3.3. 定量模型的建立

利用光谱和对应的理化值建立的萜类内酯含量模型是由布鲁克公司的 OPUS 软件计算得出, 通过软

件的自动优化功能,对光谱先进行异常点判断,再经过光谱预处理和建模波段的选择后,用 PLS 法建立银杏离心液萜类内酯含量的近红外定量校正模型。获得银杏离心液萜类内酯的校正集样品实测值和建立的模型预测值之间的关系见图 2。其指标参数结果如表 2。



**Figure 2.** Correlation diagram of measured values of terpenoids by HPLC and predicted values of NIR in centrifuge

**图 2.** 离心液萜类内酯含量 HPLC 实测值和 NIR 预测值相关性图

**Table 2.** Parameter summary of component content model of centrifuge solution

**表 2.** 离心液成分含量模型参数汇总

指标	建模波段/ $\text{cm}^{-1}$	Rcal	RMSEP	RPD	Factor	预处理方法
萜类内酯	9403.2~5449.8, 4601.3~4246.5	0.9177	0.0333	2.45	7	减去一条直线

从表 2 可以看出银杏离心液萜类内酯含量在  $9403.2\sim 5449.8, 4601.3\sim 4246.5 \text{ cm}^{-1}$  的波段范围内,减去一条直线预处理方法得到的近红外定量校正模型其效果最佳,从表中可以得到实测值和预测值之间的相关系数为 0.9177,RPD 为 2.45, RMSEP 为 0.0333,可见银杏离心液萜类内酯含量的 NIR 建模效果良好。

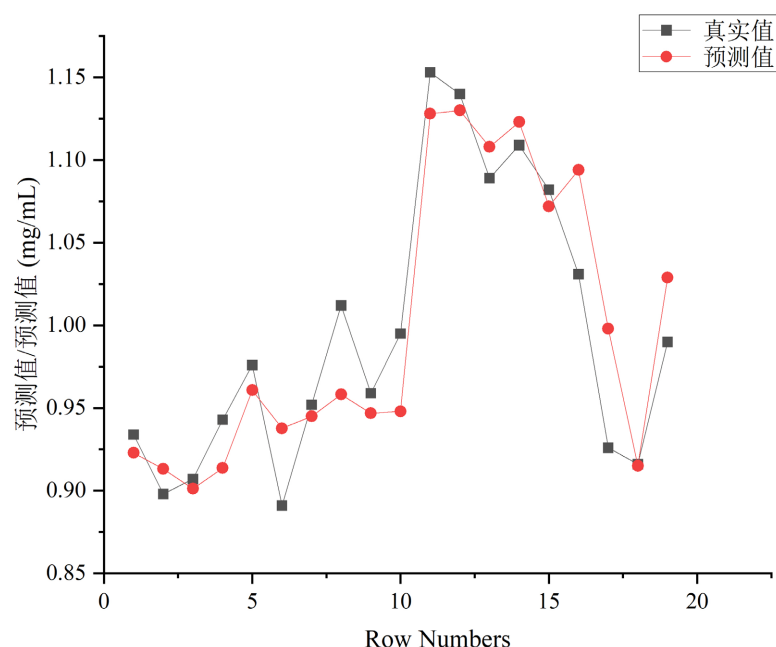
### 3.4. 定量模型的验证

为了进一步验证模型的预测能力,下图通过对上述建立的银杏离心液萜类内酯定量模型预测新样本,观察其预测值与真实值的差异大小,其结果如图 3 所示,模型预测的参数如表 3 所示。

**Table 3.** Table of parameters for predicting the contents of terpenoids by centrifuge

**表 3.** 离心液萜类内酯含量模型的预测效果参数表

模型	RMSEP	RSEP (%)
萜类内酯模型	0.0333	8.7



**Figure 3.** Comparison of the measured values of terpenoids by HPLC and the predicted values by NIR with centrifuge

**图 3.** 离心液萜类内酯含量 HPLC 实测值和 NIR 预测值比较

从图 3 可以得出, 本文建立的银杏离心液萜类内酯 NIR 定量模型的预测值与其液相实际测得的真实含量十分接近。表 3 结果显示银杏离心液萜类内酯含量模型的 RMSEP 值为 0.0333, 其 RSEP (%) 为 8.7%, 说明得到的近红外光谱模型精度较高, 此方法可以较好地预测银杏离心液中萜类内酯的含量。

#### 4. 结论

本研究通过对银杏离心液萜类内酯含量与其近红外光谱建立相应的 NIR-PLS 定量校正模型, 其实验中涉及的萜类内酯的理化数据和光谱均由州泽达兴邦医药科技有限公司实验室测定。实验建立的定量校正模型能够较好地预测样本含量, 其中, 定量模型的真实值与预测值相关系数为 0.9177, RMSEP 为 0.0333, RSEP (%) 分别为 8.7%, 以上参数全部符合定量分析的要求。近红外采集光谱速度快且对样品不产生损坏, 通过近红外建立的定量模型能够在短时间内对样品的含量进行测定分析, 相比于传统的检测方法(液相、紫外等), 近红外光谱技术的应用在实现中药简便、快速、无损等方面具有较大的积极作用, 同时也为中药行业的发展带来了技术支持。

#### 参考文献

- [1] Kanowski, S., Herrmann, W., Stephan, K., et al. (1996) Proof of Efficacy of the *Ginkgo biloba* Special Extract EGb 761 in Outpatients Suffering from Mild to Moderate Primary Degenerative Dementia of the Alzheimer Type or Multi-Infarct Dementia. *Pharmacopsychiatry*, **29**, 47-56. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979544>
- [2] Stoll, S., Scheuer, K., Pohl, O., et al. (1996) *Ginkgo biloba* Extract (EGb 761) Independently Improves Changes in Passive Avoidance Learning and Brain Membrane Fluidity in the Aging Mouse. *Pharmacopsychiatry*, **29**, 144-149. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979561>
- [3] Sun, Y., Tang, C., Wu, X., et al. (2012) Characterization of Alkylphenol Components in *Ginkgo biloba* Sarcotesta by Thermochemolysis—Gas Chromatography/Mass Spectrometry in the Presence of Trimethylsulfonium Hydroxide. *Chromatographia*, **75**, 387-395. <https://doi.org/10.1007/s10337-012-2211-y>
- [4] 习王博, 任晓文, 李洪起, 等. 星点设计——效应面法优化银杏酮酯包合物的制备工艺[J]. 中草药, 2011, 42(2):

---

262-265.

- [5] Vellas, B., Coley, N., Ousset, P., *et al.* (2012) Long-Term Use of Standardised *Ginkgo biloba* Extract for the Prevention of Alzheimer's Disease (GuidAge): Randomised Placebo-Controlled Trial. *The Lancet Neurology*, **11**, 851-859. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70206-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70206-5)
- [6] 汪海峰, 鞠兴荣. 高效液相色谱法快速测定银杏叶提取物中的萜类内酯[J]. 色谱, 2000, 18(5): 394-397.
- [7] 陈燕舞, 廉世勋, 尹笃林. 烟草中烟碱的高效液相色谱分析综述[J]. 烟草科技, 2006(1): 43-45.
- [8] 徐广通, 袁洪福, 陆婉珍. 现代近红外光谱技术及应用进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(2): 134-142.
- [9] 籍保平. 近红外光谱技术在农产品加工中的应用[J]. 加工与食品机械, 2000(6): 31-33.
- [10] 刘沐华, 张学工, 周群, 等. 近红外漫反射光谱法和模式识别技术鉴别中药材产地[J]. 光谱学与光谱分析, 2006(34): 171-174.
- [11] 韩赟, 季苏丹, 李成, 等. 近红外在线分析技术在粮食领域的应用[J]. 粮食与食品工业, 2021, 28(3): 6-8.
- [12] 王超, 李朋成, 杨凯, 等. 近红外光谱烟叶质量等级快速检测与等级特征分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(3): 943-947.