

# 基于近红外光谱结合化学计量学对淫羊藿药材中总黄酮的检测研究

欧阳燕琴<sup>1</sup>, 李霞<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 张发森<sup>1</sup>, 莫传灼<sup>2</sup>, 曾艳兰<sup>2</sup>, 黄元红<sup>1</sup>

<sup>1</sup>华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳

<sup>2</sup>深圳市中药制造业创新中心有限公司, 广东 深圳

收稿日期: 2023年12月19日; 录用日期: 2023年12月25日; 发布日期: 2024年2月28日

## 摘要

目的: 本研究旨在建立近红外光谱法快速检测淫羊藿药材中总黄酮的方法。通过使用近红外光谱仪对淫羊藿样品进行扫描, 对其光谱进行预处理和波段选择, 结合偏最小二乘法(Partial Least Squares, PLS)建立了总黄酮的快速无损检测方法。方法: 利用近红外光谱仪扫描淫羊藿样品, 对其光谱进行预处理和波段选择, 同时结合偏最小二乘法(partial least squares, PLS)建立总黄酮快速无损检测方法。结果: 所建立的模型的决定系数R为0.9289, 交叉验证均方根差值为0.863, 经过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: 所建立的模型具有高准确度, 适用于淫羊藿的总黄酮的快速检测。

## 关键词

近红外光谱法, 偏最小二乘法, 过程质量控制, 淫羊藿, 总黄酮

## Detection of Total Flavonoids in Epimedium Herbal Medicine Based on Near-Infrared Spectroscopy Combined with Chemometrics

Yanqin Ouyang<sup>1</sup>, Xia Li<sup>1</sup>, Yong Zhang<sup>1</sup>, Fasen Zhang<sup>1</sup>, Chuanzhuo Mo<sup>2</sup>, Yanlan Zeng<sup>2</sup>, Yuanhong Huang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen Guangdong

<sup>2</sup>Shenzhen Traditional Chinese Medicine Manufacturing Innovation Center Co. Ltd., Shenzhen Guangdong

Received: Dec. 19<sup>th</sup>, 2023; accepted: Dec. 25<sup>th</sup>, 2023; published: Feb. 28<sup>th</sup>, 2024

文章引用: 欧阳燕琴, 李霞, 张勇, 张发森, 莫传灼, 曾艳兰, 黄元红. 基于近红外光谱结合化学计量学对淫羊藿药材中总黄酮的检测研究[J]. 药物化学, 2024, 12(1): 61-67. DOI: 10.12677/hjmce.2024.121008

## Abstract

**Objective:** The aim of this study is to establish a rapid detection method for total flavonoids in Epimedium herbal medicine using near-infrared spectroscopy. By scanning Epimedium samples with a near-infrared spectrometer, the spectral data were preprocessed, and specific wavelength bands were selected. The Partial Least Squares (PLS) method was applied to develop a fast and non-destructive detection model for total flavonoids. **Methods:** Epimedium samples were scanned using a near-infrared spectrometer. The acquired spectra underwent preprocessing and wavelength selection. The Partial Least Squares (PLS) method was employed to establish a rapid and non-destructive detection model for total flavonoids. **Results:** The established model exhibited a determination coefficient (R) of 0.9289, and the root mean square error of cross-validation was 0.863. Predictions made on the validation set samples showed no significant difference between predicted values and actual values ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** The developed model demonstrates high accuracy and is suitable for the rapid detection of total flavonoids in Epimedium herbal medicine.

## Keywords

Near Infrared Spectroscopy, Partial Least Squares Method, Process Quality Control, Epimedium, Total Flavone

Copyright © 2024 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

淫羊藿为小檗科(Berberidaceae)淫羊藿属(Epimedium)植物,全世界有 40 多个种,中国是本属植物最主要的分布区,共有 27 种及 4 个变种,约占世界总数的 70% [1]。2000 年版《中华人民共和国药典》收录了同属植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、巫山淫羊藿和朝鲜淫羊藿 5 个种为正品干燥地上部分入药。

淫羊藿的主要活性成分包括黄酮类化合物、淫羊藿素等。目前淫羊藿种及其制剂的质量控制大多采用 HPLC 法,以检测淫羊藿苷(icariin)及其总黄酮为主要指标。淫羊藿的炮制方法有 20 余种,其中羊脂油拌炒法为历代一直沿用,多数采用羊脂油先加热熔化后再加入淫羊藿丝,用文火炒至均匀有光泽,取出放凉的炮制方法。当前研究发现,淫羊藿的药理作用主要有:促进蛋白合成[2] [3];调节免疫系统[4],增强抵抗力[5];调节心脑血管系统,对脑缺血有保护作用[6],抑制阻断双侧颈总动脉引起的血压升高[7];抗衰老[8];抗肿瘤[9];提高性肌能增加性器官重量,提高性激素分泌量,治疗阳痿[10];防治骨质疏松[11]。

近红外分析技术广泛应用于食品、烟酒、化学及中药领域,近红外光谱具有检测快、无损、绿色等特点[12]。它的快速性使其适用于实时监测生产过程,提高生产效率。无损检测意味着在分析样品时不需要破坏样品,这对于一些对样品保存有要求的应用非常重要。同时,近红外光谱技术能够同时提供化学和物理信息,使其在分析过程中更为全面[13]。不破坏样品可同时反馈化学和物理信息的这一优点,使其可用于开发过程在线监控模型[14]。在生产过程中使用近红外光谱技术建立模型,以实时监测和控制生产过程。这有助于在生产中及时发现问题、调整参数,并确保产品的质量符合要求。这对于提高生产效率、

减少成本和确保产品一致性有很大帮助。

近红外光谱技术在制药工业中的应用逐渐扩展,不仅在药物的定性和定量分析方面发挥着重要作用,而且在生产过程的各个阶段(包括合成、制剂、包装等过程)的监控中展现出巨大的潜力[15] [16] [17]。2002年,美国 FDA 已将近红外光谱技术作为一种标准的检测方法。2005 版《中国药典》将“近红外分光光度法指导原则”列入附录,进一步确认了该技术在药物领域的重要性。本研究采用近红外光谱技术结合偏最小二乘(PLS)化学计量学方法,对淫羊藿原药材进行了总黄酮的检测分析。通过建立定量分析模型,旨在提供一种新的、能够快速准确监控淫羊藿药材质量的方法,以支持后续直接的生产,确保淫羊藿原药材的质量符合要求。

## 2. 实验部分

### 2.1. 仪器与试剂

淫羊藿药材(华润三九股份有限公司); Antaris II 近红外光谱仪(赛默飞世尔科技公司); ML203 型电子天平(梅特勒-托利多公司);

甲醇(AR, 广州化学试剂厂)。

### 2.2. 采集近红外漫反射光谱

淫羊藿药材光谱采集前的预处理: 由华润三九股份有限公司技术部负责收集, 共取样 83 批。

光谱采集条件: 采集淫羊藿药材粉末(过 5 号筛)样品的漫反射光谱, 光谱扫描范围 4000~12000 nm, 分辨率  $8\text{ cm}^{-1}$ , 见图 1; 实验采用内部参比进行光谱采集分析。

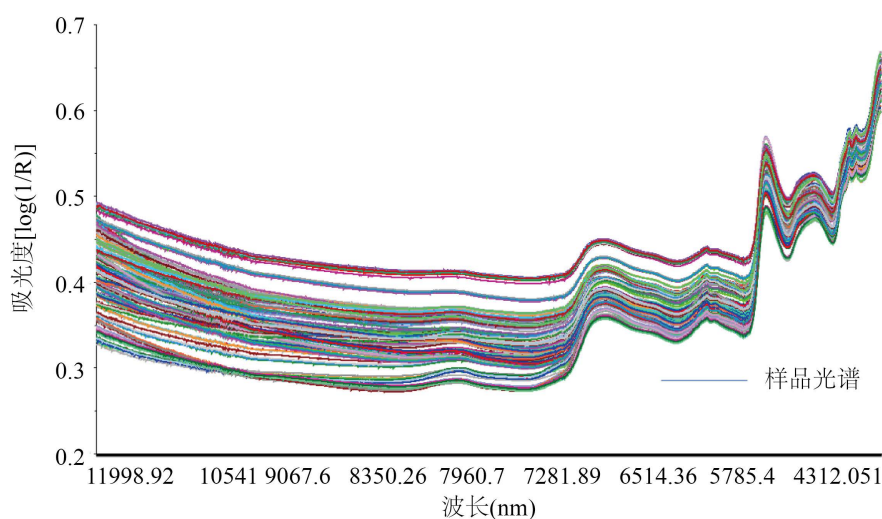


Figure 1. Near infrared original acquisition spectrum of Epimedium

图 1. 淫羊藿药材近红外原始采集光谱

### 2.3. 测定淫羊藿药材总黄酮

精密称取淫羊藿药材提取的总黄酮 0.5 ml, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。另取淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 ml 含  $10\text{ }\mu\text{g}$  的溶液, 作为对照品溶液。分别取供试品溶液和对照品溶液, 以相应试剂为空白, 参照紫外-可见分光光度法(通则 0401), 在 270 nm 波长处测定吸光度, 计算总黄酮得率, 即得。

## 2.4. 数据处理

为了确保近红外光谱采集的稳定性和精确度,使用数据分析软件中常用的光谱预处理方法有:正交信号校正(OSC)、一阶导数(1st derivative)、二阶导数(2nd derivative)、去趋势化(detrend)、矢量归一化(SNV)等。可以有效降低外界环境及仪器状态带给样品近红外光谱之间的差异,确保近红外光谱包含了样品大量的有效信息。

光谱进行预处理结果后,通过 MLR、PLS 和 SVR 三种算法建立淫羊藿中总黄酮醇苷的定量模型,建立模型后,考察使用交叉验证法(Leave-One-Out Cross Validation, LOOCV)计算交叉验证均方根误差(RMSECV)。RMSECV 越小越好,相关系数(R)趋近于 1,模型预测效果好。RMSEC 和 RMSEP 值差值越小越好。其中验证集相对偏差通常控制在 10%内,数值越低越好。以上数据均用 TQ 软件进行计算。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 淫羊藿药材总黄酮含量测定结果

按照 2.3 项下的方法测定 83 批淫羊藿药材中总黄酮的含量,总黄酮含量的范围 4.968%~19.265%之间。

### 3.2. 光谱预处理

本研究比较了不同预处理方法对淫羊藿药材中总黄酮含量建模的影响,最终选择矢量归一化(SNV)预处理方法对光谱进行处理,去除光谱背景中影响成分,减少变异性,结果如图 2 所示。

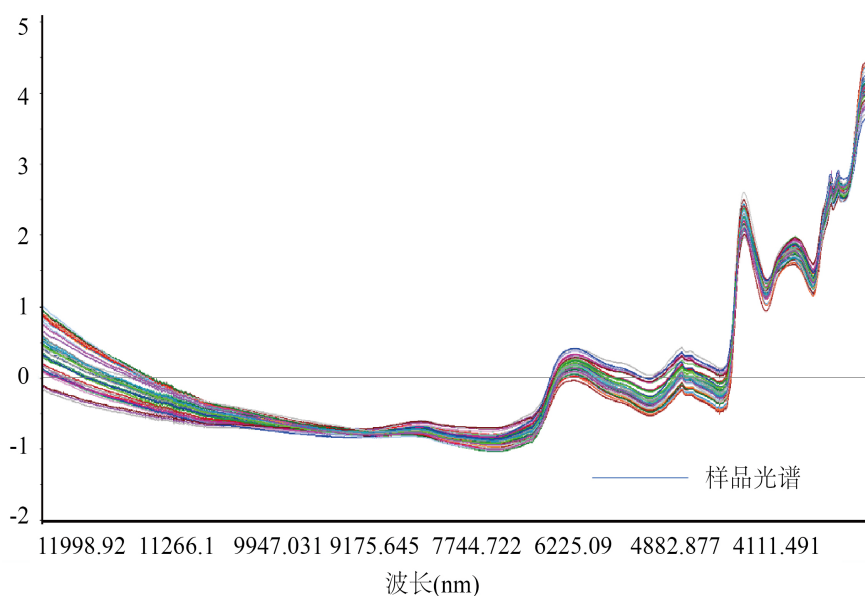


Figure 2. Spectral preprocessing results  
图 2. 光谱预处理结果

### 3.3. 模型建立

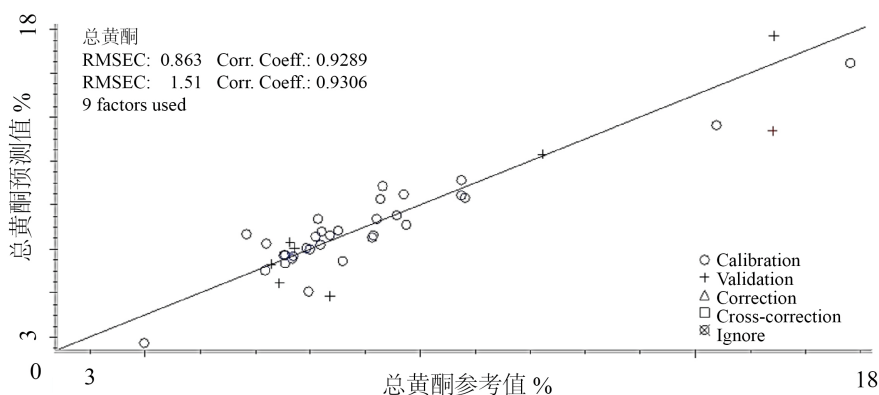
将预处理结果后的光谱数据与 3.1 项采样测得的淫羊藿药材总黄酮含量进行匹配,使用偏最小二乘法进行计算,得到如下表 1。

通过比较发现，淫羊藿药材总黄酮含量模型通过进行光谱预处理处理后得到的模型相关系数  $R$  值更接近 1，且有较低的 RMSEC 值，模型效果见图 3。

**Table 1.** Total flavone content model parameters

**表 1.** 总黄酮含量模型参数

| 建模方法 | PLS-交叉验证-留一法 |      |         |         |
|------|--------------|------|---------|---------|
| 指标   | SEC          | SEP  | $R_v^2$ | $R_c^2$ |
| 总黄酮  | 0.863        | 1.51 | 0.9289  | 0.9306  |



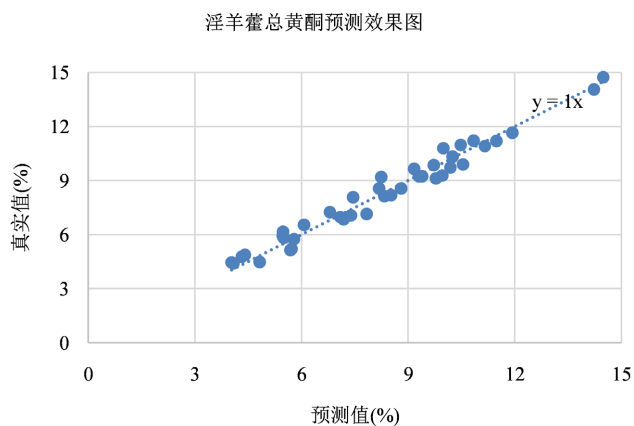
**Figure 3.** Schematic diagram of total flavone model of Epimedium

**图 3.** 淫羊藿药材总黄酮模型示意图

### 3.4. 模型验证

#### 3.4.1. 准确性

为了验证淫羊藿药材中总黄酮模型的准确性，利用建立的 PLS 模型对 40 个淫羊藿药材进行预测，并进行 2.3 项下对总黄酮进行含量测定，得到模型验证结果。从预测结果来看(如图 4)，预测值与真实值接近，符合中药分析的精度要求。用 NIR 定量校正模型验证淫羊藿总黄酮含量的预测效果优良。



**Figure 4.** Prediction effect of total flavone of Epimedium

**图 4.** 淫羊藿总黄酮预测效果图

### 3.4.2. 显著性

为进一步验证模型预测结果的准确性，将真实值与预测值含量数据进行独立样本 T 检验算法，评价测定结果的可靠性(如表 2 所示)。

从统计学的角度来看， $P > 0.05$ ，解释为没有足够的统计学证据来拒绝原假设，说明在这个样本中没有足够的证据去拒绝无差异的假设，即认为真实值与预测值之间无显著性差异。

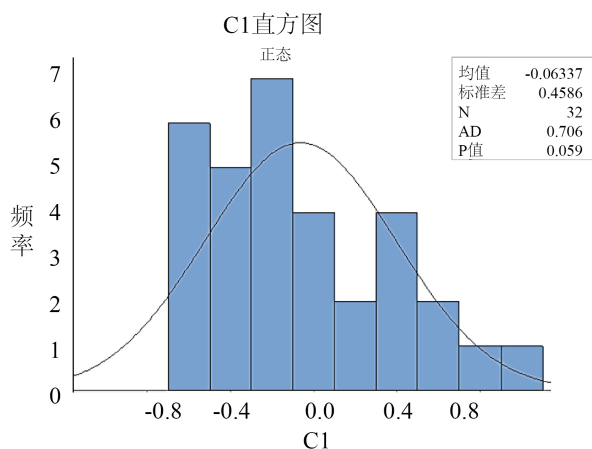
**Table 2.** Paired samples t-test table  
**表 2.** 成对双样本均值的 t-检验表

| t-检验：成对双样本均值分析 |          |          |
|----------------|----------|----------|
|                | 变量 1     | 变量 2     |
| 平均             | 8.2495   | 8.282932 |
| 方差             | 7.071636 | 6.711726 |
| 观测值            | 40       | 40       |
| 泊松相关系数         | 0.985378 |          |
| 假设平均差          | 0        |          |
| df             | 39       |          |
| t Stat         | -0.46567 |          |
| P (T<=t)单尾     | 0.322023 |          |
| t 单尾临界         | 1.684875 |          |
| P (T<=t)双尾     | 0.644045 |          |
| t 双尾临界         | 2.022691 |          |

### 3.4.3. 差值的正态分布

画出直方图和正态分布的密度函数，并进行正态分布检验。

从图 5 上来看，两个分布具有相似的趋势，且检验得到的 p 值大于等于 0.05，这表明我们未能拒绝原假设，即差值分布与正态分布之间没有显著差异。这结果表明我们的数据在差值方面呈现出与正态分布相似的特性。因此，我们可以合理地认为，在当前的分析中，差值的分布与正态分布之间没有显著性差异。



**Figure 5.** Normal distribution test histogram  
**图 5.** 正态分布检验直方图

结论:  $P > 0.05$ , 差值的分布与正态分布没有显著性差异。

从上述三个角度来验证淫羊藿总黄酮模型, 其结果均符合要求, 可以用于检测淫羊藿总黄酮含量, 实现淫羊藿质量的快速检测。

#### 4. 结论

通过本研究, 制定了一种用于淫羊藿药材中总黄酮含量的近红外快速分析方法。运用 PLS 建立了该含量的定量校正模型, 相关系数  $R$  达到 0.9289, RMSEP 为 0.863, 满足了定量分析的标准。所构建的近红外模型能够在短时间内通过采集光谱对淫羊藿药材中总黄酮含量进行准确测定, 相较于传统方法 (HPLC), 具备了简便、快速、无损的优势。

#### 参考文献

- [1] 林新, 李文魁, 肖培根. 淫羊藿研究的新进展[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(8): 449.
- [2] 李哲. 淫羊藿提取物阿可拉定联合多学科综合治疗晚期原发性肝癌 1 例报道[J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(8): 1662-1667.
- [3] 刘鑫, 何小英, 刘柏龙, 等. UPLC 法结合一测多评法测定药典中淫羊藿的 13 种化学成分[J/OL]. 中国中药杂志: 1-11. <https://mjulib.vipslib.com:8073/asset/detail/0/2031243698891>, 2023-12-25.
- [4] 肖冬焱, 何伟, 肖志滢, 等. 淫羊藿苷对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(23): 3654-3660.
- [5] 姚俊成, 刘思巧, 颜天, 等. 淫羊藿苷对血管性勃起功能障碍大鼠的治疗效果及机制初探[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(11): 1373-1377.
- [6] 赵云鹏, 刘培民, 李东东. 淫羊藿苷对消化系统肿瘤作用及其机制研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊, 1-11. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20230717.1846.009.html>, 2023-12-25.
- [7] 许兰芝. 淫羊藿对兔血压的影响[J]. 中国药理学通报, 1994, 10(4): 311.
- [8] 韩志岭, 高云佳, 莫梦, 等. UPLC 一标多测法测定淫羊藿中 4 个黄酮醇苷的含量[J]. 中国药品标准, 2023, 24(4): 411-417.
- [9] 张悦, 王佳艺, 刘慧敏, 等. 淫羊藿及其制剂主要化学成分与肝损伤作用研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(21): 7213-7221.
- [10] 徐瑶, 卞国武, 吴敏毓. 淫羊藿醇提物对内皮细胞释放 NO 的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(1): 38.
- [11] 季晖, 刘康, 李绍平, 等. 淫羊藿总黄酮对维 A 酸诱导大鼠骨质疏松症的防治作用[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(3): 222.
- [12] 张广琪, 甘芝霖, 杨阳, 等. 基于红外光谱技术的蜂蜜理化性质快速检测[J]. 农业工程学报, 2023, 39(10): 275-284.
- [13] 刘雪妍. NIR 响应纳米复合水凝胶体系的构建及其抗肿瘤性能研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 北京化工大学, 2023.
- [14] 范茹军, 秦晓晔, 宋岩, 等. 基于近红外光谱的淫羊藿定性鉴别及定量检测[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010(13): 5.
- [15] 杨丽, 李菁, 刘翠红, 等. AOTF 近红外光谱技术在淫羊藿浓缩过程在线检测中的应用[J]. 中国医药导报, 2014, 11(24): 4.
- [16] 牛丽丽, 张华峰, 陈乐, 等. 基于近红外漫反射光谱快速测定淫羊藿蛋白质含量[J]. 植物学报, 2014, 49(5): 611-617.
- [17] 吴文辉. 基于近红外光谱技术对淫羊藿配方颗粒的系统研究[D]: [博士学位论文]. 成都: 成都中医药大学, 2016.