

近红外透射光谱法快速测定枳壳提取液中 柚皮苷和新橙皮苷含量

许崇瑶^{1,2}, 叶正良^{2*}, 李德坤², 周大铮², 刘君动^{1,2}

(1. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193; 2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410)

[摘要] 目的: 采用近红外光谱仪透射光谱技术对枳壳碱性提取液中柚皮苷和新橙皮苷的含量进行检测分析。方法: 针对柚皮苷和新橙皮苷两种成分, 将44份样品的原始光谱分别经矢量归一化和多元散射校正预处理, 选取不同波段; 柚皮苷选取3个波段 11 995.6 ~ 7 498.2, 6 101.9 ~ 5 446.2, 4 601.5 ~ 4 246.7 cm^{-1} ; 新橙皮苷选取 11 995.6 ~ 5 446.2, 4 601.5 ~ 4 246.7 cm^{-1} 两个波段, 运用偏最小二乘法(PLS)分别建立定量校正模型并分析。结果: 柚皮苷和新橙皮苷校正模型的结果分别为: 校正均方差(RMSEC)为 0.024 7, 0.036, 模型的决定因子 $R^2 = 0.997 4$, $R^2 = 0.996 6$, 内部交叉验证均方差(RMSECV)为 0.07, 0.065 2, 最佳维数均为9。用建立的校正模型对12份提取液样品中的柚皮苷和新橙皮苷进行预测, 预测误差均方差(RMSEP)分别为 0.046 2, 0.082 7。结论: 该方法分析能同时快速检测枳壳提取液中柚皮苷和新橙皮苷的含量, 结果准确可靠, 对中药提取工艺优化和生产工艺过程的质量控制具有很好的应用前景。

[关键词] 近红外透射光谱; 枳壳; 柚皮苷; 新橙皮苷; 矢量归一化; 多元散射校正

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0086-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110086

Rapid Analysis of Naringin and Neohesperidin by Near Infrared Transmittance Spectroscopy in Extract of Aurantii Fructus

XU Chong-yao^{1,2}, YE Zheng-liang^{2*}, LI De-kun², ZHOU Da-zheng², LIU Jun-dong^{1,2}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co Ltd, Tianjin 300410, China)

[收稿日期] 20130413(012)

[第一作者] 许崇瑶, 在读硕士, 从事新药研发和工艺优化方面的研究, E-mail: xcy.20.life@163.com

[通讯作者] * 叶正良, 研究员, Tel: 022-86342066, E-mail: yezl@tasly.com

- [6] 郝桂锋, 温成平, 赵天喜. 芍药甘草汤治疗运动性肌肉痉挛初探[J]. 中国中医急症, 2010, 19(3): 455.
- [7] 刘剑, 宁小菊. 芍药甘草汤配合西医治疗三叉神经痛26例[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(8): 27.
- [8] 徐晓娟, 金沈锐. 芍药甘草汤不同配伍比例对痛经大鼠 β -内啡肽的影响研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(6): 40.
- [9] 陈蕊, 林大勇, 付勇强. 芍药甘草附子汤对类风湿性关节炎大鼠的免疫调节作用[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(5): 1081.
- [10] 隋峰, 李兰芳, 李珊, 等. 转化理念指导下的芍药甘草汤抗炎镇痛实验研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2011, 13(1): 188.
- [11] Akasaka Y, Sakai A, Takasu K, et al. Suppressive effects of glycyrrhetic acid derivatives on tachykinin receptor activation and hyperalgesia[J]. J Pharmacol Sci, 2011, 117(3): 180.
- [12] Yu HY, Mu DG, Chen J, et al. Suppressive effects of intrathecal paeoniflorin on bee venom-induced pain-related behaviors and spinal neuronal activation[J]. Pharmacology, 2011, 88(3/4): 159.
- [13] Lee K K, Omiya Y, Yuzurihara M, et al. Antinociceptive effect of paeoniflorin via spinal α_2 -adrenoceptor activation in diabetic mice[J]. Eur J Pain, 2011, 15(10): 1035.

[责任编辑 顾雪竹]

[Abstract] **Objective:** To develop a novel method for fast analysis of two components naringin and neohesperidin in alkali extraction process of *Aurantii Fructus* with near infrared transmittance spectroscopy. **Method:** The calibration model of 44 extraction samples was developed by the spectral data pretreatment of the multiplicative scatter correction (MSC) with the spectral regions 11 995.6-7 498.2, 6 101.9-5 446.2, 4 601.5-4 246.7 and 11 995.6-5 446.2, 4 601.5-4 246.7 cm^{-1} respectively and analyzed the correlation between the spectra and the corresponding values by PLS method. **Result:** The RMSEC was 0.024 7 and 0.036, respectively. R^2 was 0.997 4 and 0.996 6. The root mean square error of cross-validation (RMSECV) was 0.07 and 0.065 2. The best dimension was nine. The naringin and neohesperidin in the 12 samples were evaluated by using the model established. Root mean square errors of prediction (RMSEP) was 0.046 2, 0.082 7, respectively. **Conclusion:** This method is not only rapid, simple, accurate and reliable, but also has great application prospects in the extraction optimization and on-line monitoring of production process in Chinese herbs.

[Key words] near infrared transmittance spectroscopy; *Aurantii Fructus*; naringin; neohesperidin; vector normalization; multiplicative scatter correction (MSC)

中药提取液成分复杂,有效成分含量低,而我国现行中药生产工艺绝大部分环节缺少在线监测手段,无法控制有效成分的含量及其变化,很难保证中药产品质量的均一性和稳定性。近红外(near infrared, NIR)光谱分析作为一种快速检测方法,无需对样品做复杂的预处理即可直接对多种成分含量同时进行测定,具有快速、方便、无污染、非破坏性等优点,成功用于众多领域的过程分析和在线检测^[1-4]。通过近红外技术,可以较为准确的实现中药提取过程有效成分含量的在线监测,优化提取工艺,而且比常规理化分析方法更简便、更快速^[5]。以往有学者对枳壳的醇提取液过树脂纯化后进行近红外分析^[6],但缺少提取过程的近红外信息,无法控制提取液中柚皮苷和新橙皮苷的含量,而且采用醇提取生产成本过高,不利于常规生产(需建立相应防爆设施)。因此,本研究利用近红外透射技术,将四川产枳壳药材作为提取样本,采用碱水提取法,研究 NIR 光谱在中药水提过程的分析应用:分别采用矢量归一化和多元散射校正(MSC)预处理方法,结合偏最小二乘法(PLS)建立一种柚皮苷、新橙皮苷的定量分析方法,可以指导生产过程中两种成分含量的实时监控,同时可作为其他中药材提取液含量快速分析的借鉴,具有重要的研究意义和应用前景。

1 仪器和试剂

BRUKER TENSOR37 型傅里叶变换近红外光谱仪(德国布鲁克公司),1100 系列高效液相色谱仪(Agilent Technology, USA), Waters symmetry[®] C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm , 美国 Waters 公司),Mettler XS105 型电子天平(上海梅特勒托利多

仪器有限公司),柚皮苷、新橙皮苷对照品均购自中国食品药品生物制品检定所(批号分别为 110722-200610,111857-201102),提取用水为纯化水,液相用水为超纯水(Millipore),色谱乙腈(Merck, Germany),其他试剂为分析纯。枳壳药材(产地四川,批号为 20111210)。

2 方法

2.1 柚皮苷和新橙皮苷对照品的制备 柚皮苷 3.58 mg,新橙皮苷 2.79 mg 置于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容,得储备液。分别吸取 1,0.8,0.4,0.2,0.1 mL 储备液至 2 mL 量瓶中,加甲醇定容。配成分别为 0.358,0.286 4,0.143 2,0.071 6,0.035 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的一系列对照品溶液。得柚皮苷的回归方程 $Y = 19\ 436X + 11.673$, ($r = 0.999\ 9$);新橙皮苷的回归方程 $Y = 22\ 069X + 11.77$ ($r^2 = 0.999\ 9$)。

2.2 提取液样品的制备 称取 700 g 枳壳药材,纯化水加 NaOH 调至 pH = 11,加 10 倍量于 10 L 圆底烧瓶中,加电热套煎煮,直至微沸 1 h,每次煎煮每隔 10 min 取 10 mL 提取液,重复提取 3 次。3 次煎煮共获得 56 个样品:前 44 个提取液样品作为校正集,其余 12 个提取样品作为验证集。

2.3 色谱条件 Waters symmetry[®] C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.02% 磷酸(B)梯度洗脱(0 min, 10% A, 15 ~ 30 min, 20% A),平衡时间 10 min,检测波长为 283 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 1 μL 。

2.4 样品的测定 提取液样品溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液和柚皮苷和新橙皮苷混合对照品溶液按照 2.3 项下色谱条件进行测定。

2.5 近红外光谱的采集 采用仪器的透射检测器,

将样品溶液装入 1 mm 的石英比色皿中扫描图谱,扫描波长范围为 4 000 ~ 12 000 cm^{-1} ,扫描次数 32 次,分辨率 8 cm^{-1} ,每份样品扫描 3 次,取其平均光谱,见图 1。采用运用 OPUS 6.5 数据分析软件对数据进行处理和计算。

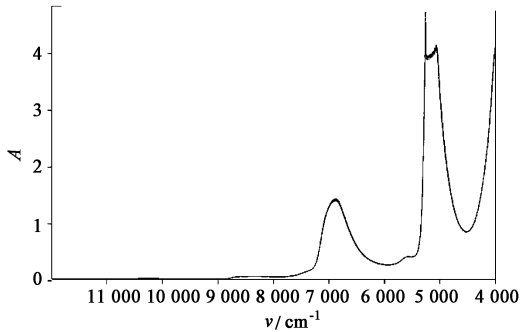


图 1 枳壳提取液样品近红外透射光谱

3 模型的建立与预测

3.1 模型的评价指标 根据两种成分 HPLC 含量测定结果,从收集到的 56 份样品中,选取前 44 份有代表性的样品做为校正集,采用偏最小二乘法 (partial least square, PLS) 建立校正模型;剩余的 12 份样品为验证集,检测校正模型的预测性能。校正集和验证集中的柚皮苷和新橙皮苷的含量分布情况见表 1。所建的模型以校正集均方根误差 (root mean square errors of calibration, RMSEC) 和模型的决定因子 (R^2) 来评价模型的拟合效果:柚皮苷和新橙皮苷模型的校正均方差 (RMSEC) 分别为 0.024 7 和 0.036,校正模型的决定因子 $R^2 = 0.997 4$ 和 $R^2 = 0.996 6$,更接近于 1。以校正集样品的内部交叉验证均方差 (root mean square error of cross-validation, RMSECV) 为指标优化建模参数,选择合适的预处理方法及维数;以预测集均方根误差 (root mean squared error of prediction, RMSEP) 考核模型对未知样品的预测效果^[7]。RMSEC 越小、表明校正模型建立越合理, RMSEP 越小,表明模型的预测性能越好。

表 1 校正集和验证集中柚皮苷、新橙皮苷含量分布 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

组成		柚皮苷	新橙皮苷
校正集 (44 份)	最小值	0.137 2	0.142 2
	最大值	5.974 2	4.840 6
	平均值	1.791 9	1.447 8
验证集 (12 份)	最小值	0.367 1	0.281 4
	最大值	0.732 1	0.581 1
	平均值	0.578 7	0.450 6

3.2 光谱预处理方法的选择 采用 OPUS6.5 数据分析软件,参考仪器自动优化功能,不断优化预处理方法,剔除干扰信号、提取关键信息的同时,比较了几种常用预处理方法,能提高模型的稳定性和预测的准确性,结果见表 2,3。交叉验证相关系数 R^2 越接近于 1,内部交叉验证均方差 RMSECV 越小说明预处理方法越好。最终确定对柚皮苷和新橙皮苷分别进行矢量归一化 (vector normalization) 预处理和多元散射校正 (multiplicative scatter correction, MSC) 预处理,在其所有预处理方法中 RMSECV 最小,分别为 0.07 和 0.065 2。液体样本采用透射近红外光谱法采集光谱,选择预处理方法时通常考虑如何消除仪器自身引起的偏差和测量时间有关的光谱漂移引起的误差。进行矢量归一化预处理可以消除基线偏移;而多元散射校正 (MSC) 预处理能基本消除颗粒度的影响,可有效减少回归模型的最佳因子数,简化数学模型,使模型更稳定,更便于传递^[8]。

表 2 不同预处理方法对柚皮苷 PLS 校正模型 RMSECV 的影响

光谱预处理方法	R^2	RMSECV
无光谱预处理	99.62	0.085 3
消除常数偏移量	99.67	0.079 5
矢量归一化	99.74	0.07
多元散射校正	99.71	0.074 4
一阶导数	99.51	0.096 7
二阶导数	99.60	0.087 9
一阶 + 矢量归一化	99.53	0.095
一阶 + 多元散射校正	99.43	0.104

表 3 不同预处理方法对新橙皮苷 PLS 校正模型 RMSECV 的影响

光谱预处理方法	R^2	RMSECV
无光谱预处理	99.6	0.070 6
消除常数偏移量	99.57	0.073 5
矢量归一化	99.66	0.065 7
多元散射校正	99.66	0.065 2
一阶导数	99.50	0.079 0
二阶导数	99.54	0.076 5
一阶 + 矢量归一化	99.50	0.078 9
一阶 + 多元散射校正	99.44	0.084 2

3.3 光谱波段选择 为避免建模波段过宽,含有的冗余信息过多,考虑到各成分分子结构存在差异,应选择柚皮苷和新橙皮苷各自最优的建模波段,分别在一定的区间内建立数学模型来确定近红外光谱和含量的关系有利于提高模型的预测准确性。在近红

外透射光谱中,水分子在 NIR 图谱中的 7 000 和 5 100 cm^{-1} 附近有一个很强的倍频和合频吸收带^[9],对其他分子吸收峰有干扰。因此,除去水分子有干扰及噪音较大的波段,结合含量信息丰富的谱段,最终选择柚皮苷在 11 995.6 ~ 7 498.2, 6 101.9 ~ 5 446.2 和 4 601.5 ~ 4 246.7 cm^{-1} 3 个波段内,新橙皮苷在 11 995.6 ~ 5 446.2 和 4 601.5 ~ 4 246.7 cm^{-1} 波段分别进行数据分析。

3.4 模型维数的确定 采用偏最小二乘法建立校正模型,维数大小的选择对模型的预测能力有很大的影响。在校正集样本一定的情况下,维数过多,引入过多的测量噪音,出现过拟合现象;维数过少,有用的信息包含不全从而导致模型预测能力差。采用内部交叉验证法,根据 RMSECV 值随维数的变化见图 2,其最小的 RMSECV 值,对应的即为最佳维数,两种成分的最佳维数均为 9。

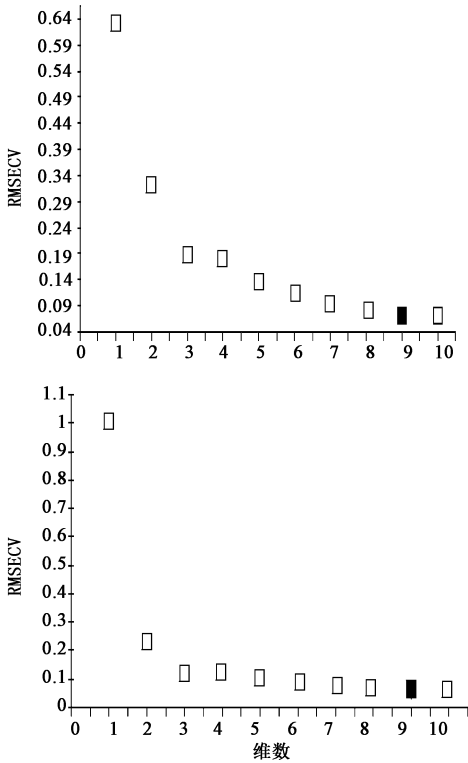


图 2 柚皮苷(上)和新橙皮苷(下)RMSECV 值随维数的变化

3.5 模型的建立与评价 样品近红外光谱分别经矢量归一化和多元散射校正(MSC)预处理,选取不同波段:柚皮苷选取 3 个波段 11 995.6 ~ 7 498.2, 6 101.9 ~ 5 446.2 和 4 601.5 ~ 4 246.7 cm^{-1} ;新橙皮苷选取 11 995.6 ~ 5 446.2 和 4 601.5 ~ 4 246.7 cm^{-1} 两个波段,运用偏最小二乘法(PLS)分别建立定量校正模型并分析。结果 $R^2 = 0.997 4$ 和 $R^2 = 0.996 6$,内部交叉验证均方差(RMSECV)为 0.07

和 0.065 2,最佳维数均为 9。

图 3 为柚皮苷和新橙皮苷预测值和测定值的相关图。在建模过程中,运用软件自动优化功能,柚皮苷的校正模型剔除了 2 个异常点(46 和 56 号)。

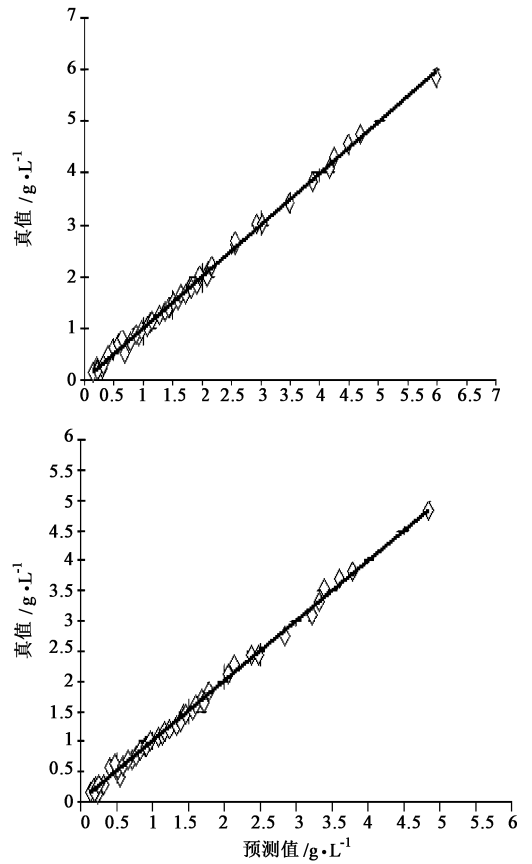


图 3 柚皮苷(上)和新橙皮苷(下)校正集的预测值和真值相关性

3.6 预测效果及评价 将其余 12 份样品作为验证集,预测柚皮苷和新橙皮苷的含量,并与高效液相法测定值进行比较,预测结果见表 4,5,验证校正模型的准确性。模型的预测集均方根误差(RMSEP)为 0.046 2 和 0.082 7,平均相对偏差为 6.57%,在 10% 以内,说明预测值和真实值相对吻合,可以看出模型有较好的预测能力。

3.7 结果分析与讨论 由表 4,5 可知,通过模型获得的近红外预测值与 HPLC 测定值基本一致,且预测值的变化趋势也与提取过程的含量相符。此外,本次实验采用同一批枳壳药材作为研究对象,整体预测结果较好,但仍有几个样品的预测值相对偏差大于 10% (小于 15%)。分析其原因,有些样品的浓度相对较低,导致部分结果存在较大误差,不排除仪器引起的因素。而且对于常规的近红外定量分析而言,建立模型的校正集样品越多,代表性越强,模型性能越优良。

表 4 柚皮苷含量的 HPLC 测定值和 NIR 预测值

No.	测定值 (真实值) /g·L ⁻¹	预测值 /g·L ⁻¹	偏差 /g·L ⁻¹	相对偏差 /%	平均相 对偏差 /%
1	0.367 1	0.340 7	0.026 4	7.184 7	
2	0.423 2	0.466 0	0.042 7	10.088 9	
3	0.465 5	0.428 1	0.037 4	8.034 5	
4	0.509 3	0.476 5	0.032 8	6.449 1	
5	0.549 7	0.551 1	0.001 4	0.259 2	
6	0.581 7	0.550 4	0.031 2	5.368 4	
7	0.612 8	0.557 9	0.054 9	8.964 5	6.57
8	0.637 1	0.634 7	0.002 4	0.370 3	
9	0.663 7	0.702 8	0.039 0	5.881 8	
10	0.691 2	0.790 7	0.099 6	14.407 2	
11	0.711 0	0.781 7	0.070 7	9.945 8	
12	0.732 1	0.745 9	0.013 8	1.889 5	

表 5 新橙皮苷含量的 HPLC 测定值和 NIR 预测值

No.	测定值 (真实值) /g·L ⁻¹	预测值 /g·L ⁻¹	偏差 /g·L ⁻¹	相对偏差 /%	平均相 对偏差 /%
1	0.281 4	0.251 3	0.030 1	10.701 0	
2	0.321 7	0.345 0	0.023 3	7.234 7	
3	0.355 8	0.354 2	0.001 5	0.427 5	
4	0.391 7	0.418 8	0.027 1	6.912 5	
5	0.439 0	0.477 9	0.038 9	8.849 6	
6	0.443 3	0.502 6	0.059 3	13.375 7	
7	0.475 0	0.460 1	0.014 9	3.138 7	6.15
8	0.497 8	0.490 1	0.007 7	1.541 1	
9	0.518 3	0.565 6	0.047 3	9.126 4	
10	0.542 9	0.556 2	0.013 2	2.431 7	
11	0.559 3	0.593 9	0.034 6	6.186 7	
12	0.581 1	0.558 9	0.022 2	3.820 3	

4 结论

针对枳壳提取液中的柚皮苷和新橙皮苷两种成分,将 44 份样品的原始光谱分别经矢量归一化和多元散射校正预处理,选取不同波段:柚皮苷选取 3 个波段 11 995.6 ~ 7 498.2, 6 101.9 ~ 5 446.2 和 4 601.5 ~ 4 246.7 cm⁻¹;新橙皮苷选取 11 995.6 ~ 5 446.2 和 4 601.5 ~ 4 246.7 cm⁻¹两个波段,运用偏最小二乘法(PLS)分别建立定量校正模型并分析。结果:校正均方差(RMSEC)分别为 0.024 7 和 0.036,模型的决定因子 R² = 0.997 4 和 R² = 0.996 6,内部交叉验证均方差(RMSECV)为 0.07 和 0.065 2,最佳维数均为 9。用建立的校正模型对 12 份提取液样品中的柚皮苷和新橙皮苷进行了预测,预测误

差均方差(RMSEP)分别为 0.046 2 和 0.082 7。采用此近红外方法,枳壳提取液样品 1 次测量只需 20 s(扫描 32 次),而 HPLC 测量 1 次至少要 30 min,大大节省了分析时间。该方法分析快速、简便,结果准确可靠。可以为近红外技术应用于枳壳提取生产和在线监控提供技术支持,对中药提取工艺优化和生产的质量控制具有很好的应用前景。

[参考文献]

[1] Macho S, Larrechi M S. Near 2 infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration for the Quantitative Determination of Certain Properties in the Petrochemical Industry [J]. Trac-trend Anal Chem, 2002, 21 (12):799.

[2] Berntsson O, Danielsson L G, Lagerholm B, et al. Quantitative in 2 line monitoring of powder blending by near infrared reflection spectroscopy [J]. Powder Technol, 2002, 123:185.

[3] 徐云,王一鸣,吴静珠,等.用近红外光谱检测牛奶中的三聚氰胺[J].红外与毫米波学报,2010,29(1):53.

[4] 刘岩,张延莹,张金巍,等.NIR 技术对复方丹参提取过程的在线监控研究[J].中草药,2009,40(3):383.

[5] 陈雪英,李页端,陈勇,等.近红外光谱分析技术在赤芍提取过程质量监控中的应用研究[J].中国中药杂志,2009,34(11):1355.

[6] 杨志斌,栾连军.近红外透射光谱用于枳壳提取物纯化过程快速分析[J].中国药理学杂志,2005,40(8):615.

[7] 李文龙,刘绍勇,薛东升,等.近红外漫反射光谱法快速测定熊胆粉提取物中熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量[J].中国药理学杂志,2010,(19):1500.

[8] 赵强,张工力,陈星旦.多元散射校正对近红外光谱分析定标模型的影响[J].光学精密工程,2005,13(1):6.

[9] 逢焕欢,冯艳春,胡昌勤,等.不同生产厂家注射用头孢哌酮钠含量测定的近红外定量模型的建立[J].光谱学与光谱分析,2006,26(12):2214.

[10] 杨志斌.近红外光谱技术在中药制剂制备过程中的应用[D].杭州:浙江大学,2005.

[11] 熊明华,方少敏,饶毅,等.白芍水提过程中芍药苷含量的 NIRS 快速测定研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):52.

[12] 李晓明,杨滨.近红外光谱技术的研究进展及其在中药领域的应用[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(12):69.

[责任编辑 顾雪竹]