

近红外漫反射光谱法快速测定枳实药材中醇浸出物的含量

白雁, 樊明月, 雷敬卫*, 谢彩侠, 张强
(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:采用近红外漫反射光谱技术结合偏最小二乘法(PLS)建立一种枳实药材中醇浸出物含量的快速测定方法。方法:运用近红外漫反射光谱技术采集枳实的近红外漫反射光谱,以热浸法测定的含量为参考值,结合 PLS 建立枳实药材中醇浸出物含量的定量分析模型,并用未知样品验证该模型。结果:所建醇浸出物定量分析模型的校正集内部交叉验证相关系数(R^2)、内部交叉验证均方差(RMSECV)和校正均方差(RMSEC)分别为 0.984 89, 0.417 89 和 0.153;验证集预测相关系数(r)与预测均方差(RMSEP)分别为 0.948 4 和 0.188。结论:该方法操作简便,测定快速,结果准确,可用于枳实药材中醇浸出物含量的快速测定。

[关键词] 近红外光谱技术; 偏最小二乘法; 枳实; 醇浸出物; 快速测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0073-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010073

Rapid Quantitative Determination of Ethanol-extract in Aurantii Fructus Immaturus by Near-infrared Spectroscopy BAI Yan, FAN Ming-yue, LEI Jing-wei*, XIE Cai-xia, ZHANG Qiang (Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** This paper reported the application of near infrared spectroscopy with PLS for rapid quantitative determination of ethanol-extract in Aurantii Fructus Immaturus. **Method:** Through collecting near-infrared spectra of Aurantii Fructus Immaturus by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy technique, with hot-dip method measurements as a reference value, the quantitative model of ethanol-extract was built by partial least squares (PLS), and it was verified by the unknown samples. **Result:** The correlation coefficients (R^2), root mean square error of cross validation (RMSECV), and the root mean-square error of calibration (RMSEC) of the quantitative calibration model of ethanol-extract was 0.984 89, 0.417 89 and 0.153, respectively; the correlation coefficients of predication (r) and the root-mean-square error of predication (RMSEP) was 0.948 4 and 0.188, respectively. **Conclusion:** The method is simple, quick, accurate and pollution-free, and it can be applied for the rapid determination of ethanol-extract in Aurantii Fructus Immaturus.

[Key words] near-infrared spectroscopy; partial least square; Aurantii Fructus; ethanol-extract; rapid determination

枳实为常用中药,2010年版《中国药典》规定枳实醇浸出物不得少于 12.0% (附录 X A 热浸法)。由于枳实中醇浸出物含量影响枳实药材的贮存及质量,故控制醇浸出物的含量对评价枳实质量有重要

的意义。虽然采用热浸法测定其醇浸出物结果准确可靠,但实验需经过称量、静置(1 h)、加热回流(1 h)、蒸干、干燥(3 h)、冷至室温(0.5 h)等环节,其过程费时费力。

[收稿日期] 20140515(007)

[基金项目] 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14B360007);河南省中药开发工程技术研究中心项目(142102313109);河南中医学院科技创新人才项目(2014XCXRC03)

[第一作者] 白雁,本科,教授,博士研究生导师,从事利用现代分析手段对中药品质进行分析和评价研究, Tel:0371-65962967, E-mail: white-yan@hotmail.com

[通讯作者] *雷敬卫,博士,副教授,从事中药质量控制研究, Tel:15836172761, E-mail:934337931@qq.com

近红外光谱分析技术是一种快速无损的绿色分析技术,具有快速分析样品、处理简单、无需试剂消耗等特点^[1-2],目前已经陆续用于药效成分的含量测定^[3]、中药纯化过程分析^[4]、天然药物鉴别^[5-6]和药材的快速模式识别^[7-8]等。本研究以枳实为研究对象,采用近红外漫反射光谱技术结合 PLS 建立枳实中醇浸出物的定量分析模型,为大批量枳实中醇浸出物的含量测定提供一种新的方法,同时也为枳实的快速评价与在线检测提供参考和依据。

1 材料

6700 型近红外光谱仪(美国 Thermo 公司,配有 InGaAs 检测器,50 mL 标准石英杯,OMNIC 光谱采集软件,TQAnalyst8.0 软件);试验用样品由河南省宛西制药股份有限公司提供,由河南中医学院董诚明教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* 栽培变种的干燥幼果,共 101 份。

2 方法与结果

2.1 近红外光谱的采集 取上述 101 份样品适量,粉碎,过 65 目药典筛,取约 5 g 粉末装入石英杯,混合均匀,依以下条件进行扫描,采集光谱图。测样方式积分球漫反射,分辨率 8 cm^{-1} ,扫描次数 64 次,扫描范围 $12\ 000\sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$,温度 $25\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $25\%\sim 35\%$,每个样品重复扫描 3 次,计算平均光谱以建立模型,101 份样品的近红外光谱叠加图见图 1。

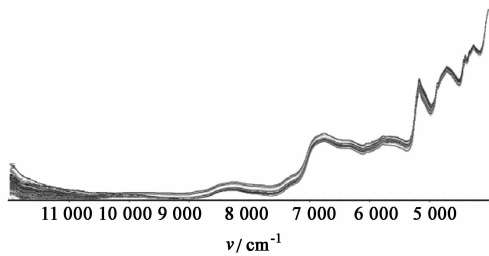


图 1 101 份枳实的 NIR 原始光谱叠加
Fig. 1 NIRS spectra of 101 *Aurantii Fructus Immaturus* samples

2.2 枳实中醇浸出物的参考值测定 本试验参照 2010 年版《中国药典》一部附录 X A 项下的醇溶性浸出物测定法中热浸法^[9]。用 70% 乙醇作为溶剂,对枳实中的醇浸出物进行测定。

取枳实粉末约 2 g,精密称定,置 100 mL 的锥形瓶中,精密加 70% 乙醇 50 mL,密塞,称定质量,静置 1 h 后,连接回流冷凝管,加热至沸腾,并保持微沸 1 h。放冷后,再称定质量,用 70% 乙醇补足减失的质量,摇匀,用干燥滤器滤过,精密量取滤液 25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称

定质量。以干燥品计算供试品中醇溶性浸出物的含量(%),101 份样品的醇浸出物含量为 $9.99\%\sim 13.22\%$ 。结果见表 1。

表 1 枳实中醇浸出物含量测定

Table 1 The results of content determination of ethanol-extract in *Aurantii Fructus Immaturus* %

No.	醇浸出物	No.	醇浸出物	No.	醇浸出物	No.	醇浸出物
1	10.86	27	11.45	53	11.05	79	10.94
2	12.29	28	11.85	54	10.94	80	10.92
3	12.77	29	11.80	55	10.68	81	10.88
4	12.08	30	12.70	56	10.82	82	10.81
5	12.89	31	13.00	57	10.15	83	10.35
6	12.23	32	12.70	58	11.67	84	11.78
7	11.85	33	13.08	59	10.42	85	11.38
8	12.70	34	12.82	60	10.29	86	11.27
9	12.43	35	13.17	61	12.60	87	11.11
10	11.78	36	12.81	62	11.06	88	11.05
11	12.27	37	12.61	63	10.64	89	11.42
12	13.01	38	12.60	64	10.66	90	11.33
13	12.91	39	11.77	65	9.99	91	11.47
14	12.66	40	11.31	66	10.61	92	10.70
15	13.04	41	11.53	67	11.02	93	10.20
16	13.22	42	11.78	68	11.20	94	10.84
17	12.00	43	11.70	69	10.97	95	10.18
18	12.65	44	11.70	70	11.79	96	10.44
19	10.32	45	13.01	71	11.21	97	10.92
20	11.72	46	10.63	72	11.69	98	10.24
21	11.78	47	10.52	73	10.99	99	10.81
22	11.34	48	10.08	74	11.12	100	10.65
23	11.82	49	10.75	75	11.22	101	10.99
24	12.29	50	11.03	76	11.21		
25	11.26	51	11.09	77	10.55		
26	12.01	52	10.66	78	10.64		

2.3 枳实中醇浸出物定量分析模型的建立与验证 从 101 份枳实样品中,根据枳实中醇浸出物含量的分布范围,选择其中 74 份有代表性的样品组成校正集,其余 27 份样品为验证集,其含量范围处于校正集样品含量范围之内^[10]。表 2 为校正集和验证集样品醇浸出物含量的分布范围。

表 2 校正集与验证集样品醇浸出物含量分布范围

Table 2 Sample distribution of calibration set and validation set

样品	样品量	最大值/%	最小值/%	平均值/%
校正集	74	13.22	9.99	11.51
验证集	27	13.04	10.20	11.76

2.3.1 回归方法的选择 表 3 为采用不同的回归方法处理后的校正集内部交叉验证相关系数(R^2)、性能指数(PI)的比较。 R^2 越接近 1,PI 越大越好。由表亦可知,选择 PLS 进行回归所建模型的效果更好。

表 3 不同回归方法对 R^2 和 PI 的影响

Table 3 The influence of different regression methods on R^2 and PI

回归方法	R^2	PI
CLS	0.229 14	25.5
SMLR	0.712 70	54.9
PLS	0.945 17	78.5
PCR	0.883 84	75.7

2.3.2 光谱预处理方法的选择 近红外光谱的采集容易受颜色、样品颗粒大小等影响,导致近红外光谱的基线漂移和平移,因此,必须对原始光谱进行预处理^[11]。表 4 为使用不同预处理方法后, R^2 、内部交叉验证均方差 (RMSECV)、校正均方差 (RMSEC)、验证集预测均方差 (RMSEP) 以及 PI 的比较。其中 R^2 越接近 1, RMSEC, RMSEP 越小越好^[12], PI 以相对残差和计算,越大模型性能越好。由表可以看出,SNV + 1st Der + SG 处理方法效果最好。

表 4 不同预处理方法对定量模型性能的影响

Table 4 The influence of different pretreatment methods on the performance of quantitative model

光谱预处理方法	评价指标				
	R^2	RMSECV	RMSEC	RMSEP	PI
Constant(无)	0.914 96	0.426 77	0.357	0.294	78.6
MSC(多元散射校正)	0.943 22	0.409 29	0.294	0.267	80.6
SNV(标准归一化)	0.940 82	0.423 17	0.300	0.273	80.2
SNV + 1st Der + SG	0.984 89	0.417 89	0.153	0.188	86.3
SNV + 2nd Der + SG	0.958 15	0.450 14	0.253	0.221	83.9
MSC + 1st Der + ND	0.931 37	0.425 54	0.322	0.268	80.5

表 5 不同光谱范围对 R^2 和 RMSECV 的影响

Table 5 The influence of different spectral ranges on R^2 and RMSECV

光谱范围/ cm^{-1}	R^2	RMSECV
4 008 ~ 9 990	0.942 76	0.452 81
4 450 ~ 7 490	0.984 89	0.417 89
4 008 ~ 7 772	0.917 59	0.421 73
4 279 ~ 8 990	0.931 16	0.433 62

2.3.3 建模波段的选择 在建立模型时需要不断选择特征波段降低冗余信息与噪声干扰,从而调整模型的准确性^[13],以 R^2 和 RMSECV 为指标,对不同波段进行手动优化比较。结果见表 5,在 4 450 ~ 7 490 cm^{-1} 波谱区间, R^2 最接近 1, RMSECV 最小,故选择此波段为最佳建模波段。

2.3.4 主成分数的选择 用 PLS 法建立近红外定量模型时,主成分数的选择对模型的优劣有显著影响。主成分数太多,使模型包含过多的冗余信息与噪音,出现过拟合现象;主成分数过少,导致建模信息不全,预测能力差^[14]。从图 2 中可以看出,当主

成分数为 9 时 RMSECV 较小,为最佳建模主成分数。

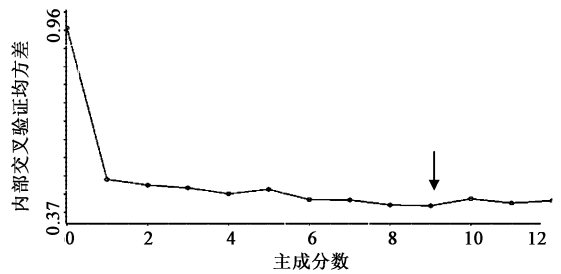


图 2 RMSECV 随主成分的变化

Fig. 2 RMSECV values changed with the changing of principal components

2.3.5 定量分析模型的建立 运用 TQAnalyst8.0 软件中的 PLS 法建立模型,对光谱进行 SNV + 1st Der + SG 预处理,采用 4 450 ~ 7 490 cm^{-1} 波段,9 个主成分数进行建模,所建立模型的 $R^2 = 0.984 98$, RMSEC = 0.153, RMSEP = 0.188。NIR 预测值与热浸法参考值的相关图见图 3,偏差图见图 4,从图中可以看出 NIR 预测值与热浸法参考值接近,该模型可用于枳实中醇浸出物的定量分析。

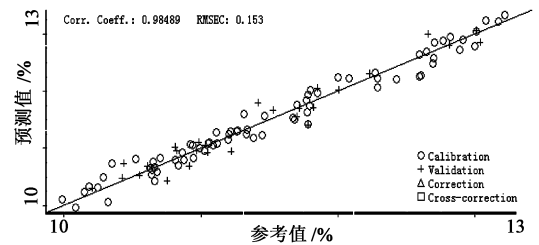


图 3 NIR 预测值与参考值的相关性

Fig. 3 Correlation plot of NIR predicted values and reference values

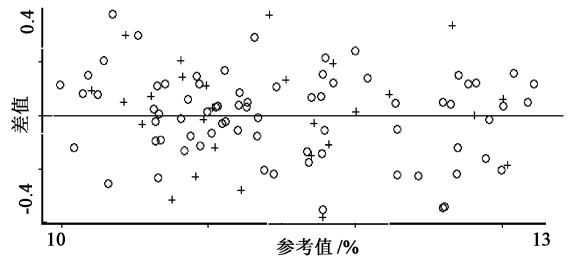


图 4 NIR 预测值与参考值的偏差

Fig. 4 Deviation plot of NIR predicted values and reference values

2.3.6 定量模型的验证 将 27 份验证集样品的 NIR 图谱输入校正模型,预测其醇浸出物含量,结果见表 6。经验证,27 份验证集样品的 NIR 预测值与热浸法的参考值比较接近,预测相关系数与预测均方差分别为 0.948 4, 0.188。验证集样品参考值与

预测值相关图见图5。表明所建立的校正模型具有良好的预测能力。

具有一定的借鉴意义。

[参考文献]

[1] 王宁,傅春华,周爱敏,等. 近红外漫反射光谱法直接测定小儿消食片中总有机酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1597-1598.

[2] 任卫波,韩建国,张蕴薇,等. 近红外光谱分析原理及其在牧草航天育种的应用前景[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(2): 303-307.

[3] 刘雪松,程翼宇. 用于中药药品质量快速检测的近红外光谱模糊神经元分类方法[J]. 化学学报, 2005, 63(24): 2216-2220.

[4] 杨南林,程翼宇,瞿海斌. 一种用于中药纯化过程的近红外光谱分析新方法[J]. 化学学报, 2003, 61(5): 742-747.

[5] Laasonen M, Harmia P T, Simard C L, et al. Fast identification of *echinacea purpurea* dried roots using near-infrared spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(11): 2493-2496.

[6] 汤彦丰,张卓勇,范国强. 中草药大黄的近红外光谱和人工神经网络鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(11): 1348-1351.

[7] Woo Y A, Kim H J, Ze K R. Near-infrared (NIR) spectroscopy for the non-destructive and fast determination of geographical origin of *Angelicae gigantis Radix* [J]. *J Pharm Biomed*, 2005, 36(5): 955-957.

[8] 瞿海斌,杨海雷,程翼宇. 近红外漫反射光谱法快速无损鉴别阿胶真伪[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(1): 60-62.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 62.

[10] 李家春,萧伟,孙兰,等. 基于近红外光谱的白芍药材快速分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 57-60.

[11] 吴利敏,杨琼,周尚,等. 近红外光谱法快速测定虎杖中虎杖苷、白藜藜醇、大黄素的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1583-1588.

[12] 章顺楠,杨海雷,刘占强,等. 近红外光谱法在线检测复方丹参滴丸料液中有有效成分含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(2): 192-196.

[13] 韩吴琦,黄永丽,郭兴辉. 近红外光谱鉴别法在中成药领域应用之初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 166-169.

[14] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京: 中国石化出版社, 2007.

[责任编辑 顾雪竹]

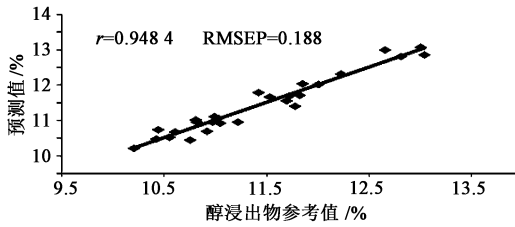


图5 验证集样品参考值与预测值相关性

Fig. 5 Correlation plot of predicted values and reference values of validation set

表6 验证集样品的近红外预测值与热浸法参考值

Table 6 NIR predicted values and Hot-dip method reference values of validation set %

No.	热浸法	近红外	No.	热浸法	近红外
6	12.23	12.31	53	11.05	10.92
7	11.85	12.04	56	10.82	10.96
12	13.01	13.07	59	10.42	10.47
14	12.66	12.99	66	10.61	10.68
15	13.04	12.85	69	10.97	10.95
20	11.72	11.69	73	10.99	11.10
21	11.78	11.40	75	11.22	10.95
23	11.82	11.71	77	10.55	10.52
26	12.01	12.02	82	10.81	11.02
36	12.81	12.81	89	11.42	11.79
41	11.53	11.66	93	10.20	10.21
43	11.70	11.55	96	10.44	10.73
49	10.75	10.44	97	10.92	10.69
50	11.03	11.06			

3 讨论

样品的颗粒度是影响入射光与样品相互作用的因素,为全面反映漫反射光谱的特性,本试验考察了不同颗粒度枳实粉末的近红外光谱的差异与稳定性,结果表明,当样品能够全部过65目药典筛时,近红外光谱的稳定性较好,故选用65目。

合适的建模参数是建立稳定可靠定量分析模型的前提与基础,本试验通过对回归方法、光谱预处理方法、建模波段与主成分数的考察与筛选,建立了更准确稳定的分析模型。

本试验与厂家合作,利用近红外光谱分析技术结合PLS建立了枳实中醇浸出物的定量分析模型,该方法分析速度快、结果准确、无损害、无化学污染等优点恰恰弥补了传统分析方法的不足,可用于厂家在枳实原药材的质量控制中的快速、批量检测。同时,该方法对其他中药及有效成分的质量分析也