

# 近红外光谱法快速测定五加皮酒提取液特征性成分

张雯雯<sup>1,2</sup>, 刘绍光<sup>1,2</sup>, 丛晓东<sup>1,2\*</sup>, 蔡宝昌<sup>1</sup>, 钱建华<sup>3</sup>, 方小民<sup>3</sup>, 彭美仙<sup>3</sup>

(1. 浙江中医药大学 中药炮制技术研究中心, 杭州 310053;

2. 浙江省省级药学类工程实践教学基地, 杭州 310053;

3. 浙江致中和实业有限公司, 浙江 建德 311607)

**[摘要]** 目的:建立五加皮酒提取液中特征性成分的近红外光谱快速检测方法。方法:采用 HPLC 测定样品中甘草酸、木香羟内酯、去氢木香内酯的含量,运用偏最小二乘法(PLS)建立各含量与近红外光谱(NIRS)之间的多元校正模型,并对未知样品进行定量预测。结果:校正模型对甘草酸、木香羟内酯、去氢木香内酯的交叉验证均方差(RMSECV)分别为0.023 9, 0.021 8, 0.012 6, 相关系数( $R^2$ )分别为0.978 0, 0.978 7, 0.975 7, 经外部验证,预测均方差(RMSEP)分别为0.023 7, 0.018 8, 0.010 7。结论:利用近红外光谱法建立的模型具有良好的预测效果,能满足五加皮酒提取液中特征性成分快速测定的要求。

**[关键词]** 近红外光谱; 五加皮酒; 甘草酸; 木香羟内酯; 去氢木香内酯

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0061-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110061

## Rapid Detection Characteristic Constituents of Wujiapi Liquor Extract by Near Infrared Spectroscopy

ZHANG Wen-wen<sup>1,2</sup>, LIU Shao-guang<sup>1,2</sup>, CONG Xiao-dong<sup>1,2\*</sup>, CAI Bao-chang<sup>1</sup>, QIAN Jian-hua<sup>3</sup>, FANG Xiao-min<sup>3</sup>, PENG Mei-xian<sup>3</sup> (1. Zhejiang Chinese Medical University, Research Center of Traditional Chinese Medicine Processing Technology Hangzhou 310053, China; 2. Provincial Pharmaceutical Engineering Practice Teaching Base in Zhejiang, Hangzhou 310053, China; 3. Zhejiang Zhizhonghe Industrial Co. Ltd., Jiande 311607, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a near infrared spectroscopy method for rapid detection the characteristic contents in Wujiapi liquor extract. **Method:** The contents of glycyrrhizic acid, costunolide and dehydrocostuslactone determined by HPLC method were used as reference values and the near infrared spectroscopy of the Wujiapi liquor extract were collected by fourier transform near infrared spectroscopy technology. Partial least square (PLS) was utilized to build the quantitative calibration models and the unknown samples were quantitatively determined. **Result:** The results showed that the mean square errors of cross-validation (RMSECV) were 0.023 9, 0.021 8 and 0.012 6, respectively, the correlation coefficient ( $R^2$ ) were 0.978 0, 0.978 7 and 0.975 7, respectively. External validation samples collected were used to evaluate the quantitative models. The root mean square errors of prediction (RMSEP) were 0.023 7, 0.018 8 and 0.010 7, respectively. **Conclusion:** Using near infrared spectroscopy the models have good predictive effect, which could meet the demand to rapid detect the characteristic constituents in Wujiapi liquor extract.

**[Key words]** near infrared spectroscopy; Wujiapi liquor; glycyrrhizic acid; costunolide; dehydrocostuslactone

五加皮酒历史悠久是民间流传甚广的一种保健酒,具有祛风去湿、舒筋活血、行气和胃、强身健体的功能<sup>[1-4]</sup>,以五加皮、当归、肉桂、甘草、木香等多种中药材为原料,以蒸馏酒为酒基逆流提取,浓缩药

液,再经勾兑制成五加皮酒。

近红外光谱分析技术(near infra-red spectroscopy, NIRS)是一种快速、无损、可多组分同时分析的在线分析技术,在中药与食品中的应用逐

**[收稿日期]** 20141201(004)

**[基金项目]** 浙江省中医药科学研究基金计划项目(2012ZB032)

**[第一作者]** 张雯雯,在读硕士,从事中药活性成分及质量标准研究, Tel:15158868362, E-mail:zww19881006@126.com

**[通讯作者]** \*丛晓东,硕士生导师,从事中药活性成分与新药创制研究, Tel:0571-87195886, E-mail:congxiaodong199@aliyun.com

渐增多<sup>[5-10]</sup>,尤其是在线、实时的监测中药提取过程中特征性化学成分的含量,尚未见此方法在五加皮酒中多种化学成分的同时快速测定应用。本实验拟采用近红外光谱透射技术结合偏最小二乘法(partial least squares, PLS)建立逆流提取液中特征性成分的定量校正模型,期望为提取液的在线检测提供一套高效、准确、多组分同时快速测定的方法。

## 1 材料

Antaris II型傅立叶变换近红外光谱仪(美国 Thermo fisher, 配有透射采样系统、光谱采集软件 Result, TQ Analyst 8.0 数据分析软件), Ultimate 3000型高效液相色谱仪(美国 Dionex, 配有 LPG-3400SD 四元梯度泵, WPS-3000SL 自动进样器, TCC-3000RS 柱温箱, DAD 3000 紫外检测器), AL204型电子天平, XS105型分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], TGL-16B型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), TQ-0.6型逆流提取装置(温州金榜轻工机械有限公司)。

乙腈(色谱纯,美国 Tedia), 磷酸(上海三鹰), 超纯水(Millipore); 甘草酸铵、木香炔内酯、去氢木香内酯对照品(批号 110731-201116, 111524-200503, 111525-200706)购自中国食品药品检定研究院, 纯度均  $\geq 98\%$ , 均供含量测定用。提取液样品均由浙江致中和实业有限公司提供, 所用药材经浙江致中和实业有限公司彭美仙高级工程师鉴定为五加科植物细柱五加(*Acanthopanax gracilistylus*)的干燥根皮、菊科植物木香(*Aucklandia lappa*)的干燥根、豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)的干燥根、伞形科植物当归(*Angelica sinensis*)的干燥根、樟科植物肉桂(*Cinnamomum cassia*)的干燥嫩枝。

## 2 方法与结果

**2.1 提取液样品的制备** 将药材五加皮、木香、甘草、当归、桂枝切成段或破碎成颗粒, 过40目筛, 按比例(10:7:5:3:5)混合均匀。取混合药材5 kg, 按药材-50度白酒(1:7.5)的投料比放入50 L的逆流提取装置, 冷浸8 h后, 按逆流提取工艺进行提取。提取条件为: 逆流循环速度  $1.0 \text{ t} \cdot \text{min}^{-1}$ , 提取温度  $(25 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ , 提取时间20 h, 重复进行3次逆流提取实验。每间隔60 min 取样, 得到20个样品, 3次重复试验共获得有60个提取液样品。

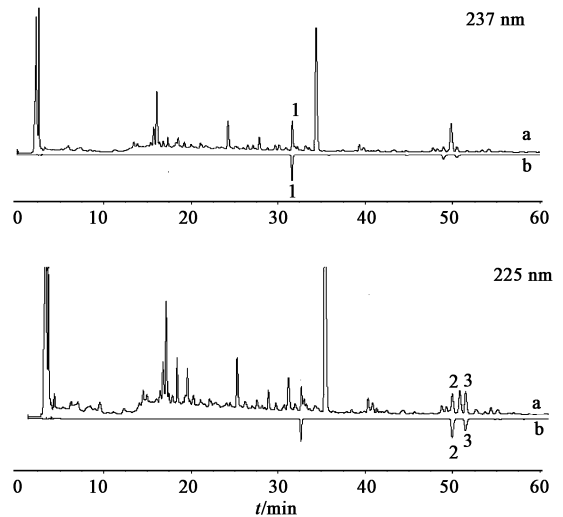
**2.2 甘草酸、木香炔内酯、去氢木香内酯 HPLC 定量测定**

**2.2.1 对照品溶液制备** 分别精密称取甘草酸铵、木香炔内酯、去氢木香内酯对照品适量, 加75%甲

醇制成分别含  $300.80, 158.00, 62.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合对照品储备溶液。

**2.2.2 供试品溶液制备** 精密吸取提取液样品2 mL, 离心, 上清液经  $0.45 \text{ } \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 即得。

**2.2.3 色谱条件** 安捷伦 Eclipse XD8-C<sub>18</sub> 色谱柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$ ), 流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B)洗脱梯度(0~8 min, 12% A; 8~10 min, 12%~19% A; 10~37 min, 19%~50% A; 37~57 min, 50%~70% A; 57~60 min, 70%~12% A), 柱温  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波长 237 nm (甘草酸), 225 nm (木香炔内酯、去氢木香内酯), 进样量  $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。在上述色谱条件下, 样品中其他成分对甘草酸、木香炔内酯、去氢木香内酯的测定无干扰。各色谱峰分离度均  $> 1.5$ , 理论塔板数以去氢木香内酯计算不低于3000。色谱图见图1。



a. 样品; b. 对照品; 1. 甘草酸; 2. 木香炔内酯; 3. 去氢木香内酯  
图1 五加皮酒 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of Wujiapi liquor extract

**2.2.4 方法学考察** 进行系统的方法学考察, 其中甘草酸线性范围  $30.08 \sim 601.60 \text{ } \mu\text{g}$ , 回归方程  $Y = 61.55X + 4.025$  ( $R^2 = 0.9998$ ); 精密度 RSD 0.2% ( $n = 6$ ), 重复性 RSD 0.2% ( $n = 6$ ), 24 h 内稳定性 RSD 0.4% ( $n = 6$ )。木香炔内酯线性范围  $15.80 \sim 316.00 \text{ } \mu\text{g}$ , 回归方程  $Y = 89.34X + 1.434$  ( $R^2 = 0.9999$ ), 精密度 RSD 0.1% ( $n = 6$ ), 重复性 RSD 0.3% ( $n = 6$ ), 24 h 内稳定性 RSD 0.1% ( $n = 6$ )。去氢木香内酯线性范围  $6.26 \sim 125.20 \text{ } \mu\text{g}$ , 回归方程  $Y = 144.7X + 0.685$  ( $R^2 = 0.9997$ ); 精密度 RSD 0.1% ( $n = 6$ ), 重复性 RSD 0.2% ( $n = 6$ ), 稳定性 RSD 0.1% ( $n = 6$ )。

甘草酸、木香烯内酯、去氢木香内酯回收率分别为 100.1%、102.8%、101.8%，RSD 分别为 1.5%、1.2%、1.1%。根据方法学考察结果，可知建立的测定方法符合定量分析的要求，具有较高的准确性。

**2.3 光谱采集** 将 60 份不同批号的提取液样品离心，分别精密吸取液体样品 1 mL 于测量管中，测量参数透射，分辨率  $8\text{ cm}^{-1}$ ，扫描次数 64 次，扫描范围  $4\ 000\sim 10\ 000\text{ cm}^{-1}$ ，每个样品重复扫描 3 次，求平均光谱。提取液近红外光谱叠加见图 2。

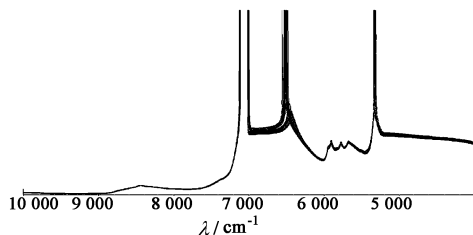


图 2 五加皮酒提取液样品的近红外原始光谱  
Fig.2 NIRS original spectra of extract sample

**2.4 数据处理** 采用化学计量学中的偏最小二乘法(PLS)建立定量校正模型。采用 TQ 软件中的 Outliers 优化，剔除异样样品后，校正集和验证集的组成见表 1。

表 1 五加皮酒中 3 种成分校正集和验证集样本组成

组别	mg·L <sup>-1</sup>		
	甘草酸	木香烯内酯	去氢木香内酯
校正集	156.5~308.8(50)	39.5~152.9(45)	29.3~102.6(49)
验证集	169.8~302.3(10)	53.6~136.2(15)	36.6~101.1(11)

注:括号中为样品数。

**2.4.1 建模谱段的选择** 水含有 OH 基，在近红外光谱区的  $1\ 400\text{ nm}(6\ 944\text{ cm}^{-1})$  和  $1\ 940\text{ nm}(5\ 155\text{ cm}^{-1})$  附近有很强的合频与倍频吸收谱带，即  $4\ 500\sim 5\ 450, 6\ 500\sim 7\ 500\text{ cm}^{-1}$  光谱区间<sup>[5]</sup>。因此，对样品溶液进行分析时，需要扣除有水分子带入的吸收峰以减少干扰，提高模型的精度。以相关系数( $R^2$ )和校正均方差(RMSEC)为指标，通过 TQ Analyst 软件推荐，最终选择  $5\ 674\sim 6\ 016\text{ cm}^{-1}$  波段对甘草酸建模， $5\ 586\sim 6\ 145\text{ cm}^{-1}$  波段对木香烯内酯的建模，去氢木香内酯模型则选择  $5\ 739\sim 5\ 800, 6\ 471\sim 8\ 836\text{ cm}^{-1}$  波段。

**2.4.2 因子数选择** 建立模型时，所选的主因子数对预测结果的影响相对比较大。如果 PLS 所用的因子数过少，光谱中一些有用信息因不被包含而导致模型的预测能力较差；反之，选择的因子数过多，则出现过拟合现象影响其结果。主因子数

(Factor)、交叉验证均方差(RMSECV)，预测残差平方和(PRESS)相关图见图 3，采用内部验证法，根据 RMSECV 随主因子数的变化，选择合适的因子数。

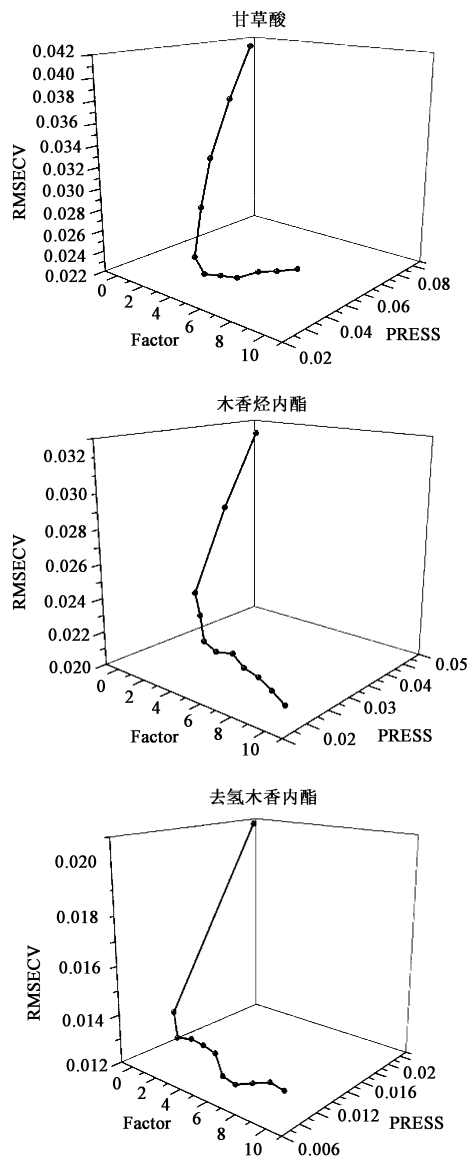


图 3 五加皮酒中 3 种成分校正集 Factor, RMSECV, PRESS 之间的相关性

Fig.3 Correlogram of number of PLS factors and PRESS and RMSECV values for calibration model

**2.4.3 光谱预处理方法的选择** 通过不同的滤噪方法以及不同的模型校正方法进行组合，比较不同方法组合条件下的  $R^2$ ，RMSEC，RMSECV，预测均方差(RMSEP)和 Factors，结果见表 2。经过多次手动选择及综合比较，最终以 2-Der 处理效果最好。

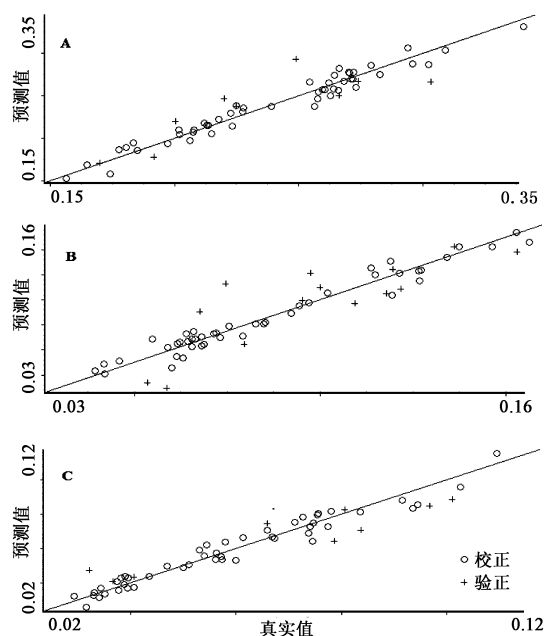
**2.4.4 校正模型的建立** 运用 PLS 法建立提取液甘草酸、木香烯内酯、木香去氢内酯的定量校正模型。运用建立的最佳校正模型，取一定数量样品作为预测集，对其甘草酸、木香烯内酯、木香去氢内酯

表 2 不同预处理方法对五加皮酒 3 种成分 PLS 校正模型性能的影响

Table 2 Impact of different pretreatment methods on performance of PLS calibration models

预处理方法	甘草酸					木香烯内酯					去氢木香内酯				
	$R^2$	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Factor	$R^2$	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Factor	$R^2$	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Factor
Original spectrum	0.897 1	0.018 0	0.025 4	0.026 5	7	0.979 1	0.006 44	0.016 4	0.026 9	10	0.720 9	0.014 1	0.014 9	0.019 4	2
1-Der <sup>1)</sup>	0.953 7	0.012 3	0.036 1	0.030 7	6	0.938 3	0.011 0	0.019 5	0.027 5	4	0.868 8	0.010 1	0.012 4	0.010 6	5
2-Der <sup>2)</sup>	0.978 0	0.008 51	0.023 9	0.023 7	5	0.978 7	0.006 51	0.021 8	0.018 8	5	0.975 7	0.004 5	0.012 6	0.010 7	7
1-Der + SG <sup>3)</sup>	0.913 8	0.016 6	0.024 9	0.028 2	6	0.880 4	0.015 0	0.026 8	0.030 0	4	0.861 4	0.010 3	0.011 9	0.012 0	5
2-Der + SG	0.769 7	0.020 1	0.032 1	0.023 9	3	0.938 4	0.010 9	0.020 1	0.021 6	4	0.795 3	0.012 3	0.013 4	0.012 2	2
1-Der + Norris <sup>4)</sup>	0.870 1	0.020 1	0.030 9	0.030 4	6	0.976 2	0.006 86	0.015 0	0.026 4	10	0.853 0	0.010 6	0.011 9	0.013 3	5
2-Der + Norris	0.907 6	0.017 1	0.027 5	0.030 4	7	0.874 2	0.015 4	0.019 5	0.036 7	5	0.857 6	0.010 5	0.011 8	0.013 2	5

注: 1) 一阶导数; 2) 二阶导数; 3) Savitzky-Galoy 平滑滤波, 采用 2 次多项式 5 点平滑; 4) Norris 平滑滤波, 段长为 5, 段间距为 3。



A. 甘草酸; B. 木香烯内酯; C. 去氢木香内酯

图 4 五加皮酒中 3 种成分近红外预测值与实际值相关性

Fig. 4 Correlation between NIRS predicted and actually - measured values for calibration models

含量进行预测, 结果见图 4。RMSEP 分别为 0.023 7, 0.018 8, 0.010 7, 相关系数  $R^2$  分别为 0.978 0, 0.978 7, 0.975 7。以甘草酸为例, 对预测集进行  $t$  检验, 结果显示,  $t = 2.12$ , 小于  $t_{(0.05, 9)} = 2.26$ , 结果未见显著性差异, 因此, 可以认为该校正模型可靠。

### 3 讨论

本实验将近红外光谱法与化学计量法结合, 运用偏最小二乘法建立了五加皮保健酒提取液中甘草酸、木香烯内酯、木香去氢内酯的定量模型, 该模型对 3 种化学成分的含量有较好的预测能力。实验过程中不需要样品的前处理, 扫描提取液的近红外光谱只需 64 s (扫描 64 次), 将光谱导入包含 3 个定量模型的工作流便可快速得到 3 种化学成分的含量,

与 HPLC 完成 1 次测量至少需要 1 h 相比, 大大节省了分析时间。该方法适合大批量样品的含量测定和在线质量控制, 实现提取过程中甘草酸、木香烯内酯、木香去氢内酯的快速、无损、多组分同时定量分析, 为五加皮酒生产过程的质量监控提供一种新的方法和思路。

#### [参考文献]

- [1] 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; 57-58, 80-81.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 21821 ~ 2008. 地理标志产品严东关五加皮酒[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [3] 王建国. 五加皮酒各时期组方、制法、功效和历史渊源[J]. 中国酿造, 2008, 27(18): 103-104.
- [4] 王亚东, 王海玉, 李立, 等. 五加皮酒抗疲劳作用的实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6): 1404-1405.
- [5] 金叶, 丁海樱, 吴永江, 等. 近红外光谱技术用于血必净注射液提取过程的在线检测研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1214-1221, 1234.
- [6] 黄红霞, 李文龙, 瞿海斌, 等. 丹红注射液提取过程轨迹及质量在线监控研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1663-1666.
- [7] 封银曼, 张威, 白杨, 等. 黄芩提取物有效成分的近红外光谱定量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 84-87.
- [8] 许崇瑶, 叶正良, 李德坤, 等. 近红外透射光谱法快速测定赤芍提取液中芍药苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 134-137.
- [9] 陈晨, 李文龙, 瞿海斌, 等. 复方苦参注射液渗漏过程的近红外光谱在线监测方法[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(21): 1698-1701.
- [10] 刘爽悦, 李文龙, 瞿海斌, 等. 基于近红外光谱的丹红注射液提取过程质量在线检测方法研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1657-1662.

[责任编辑 顾雪竹]