

近红外漫反射光谱法快速测定五味子中 五味子醇甲和水分的含量

张继丹¹, 李化¹, 柯华香^{1,2}, 贺敬霞^{1,3}, 邵爱娟¹, 杨滨^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;
2. 西华大学 食品与生物工程学院, 成都 610039; 3. 成都中医药大学 药学院, 成都 611137)

[摘要] **目的:**建立五味子中五味子醇甲和水分的近红外光谱定量模型。**方法:**收集不同产地五味子样品 93 批,采用偏最小二乘法建立五味子中水分和五味子醇甲含量的近红外光谱校正模型,以烘干法和超高效液相色谱法,分别测定样品中水分和五味子醇甲含量,作为参考值,并用相关系数和预测均方差对模型预测性能进行评价。**结果:**验证模型样品中水分和五味子醇甲的相关系数分别为 0.876 7 和 0.889 0,预测误差均方差分别为 0.121 和 0.021 9。**结论:**所建立的近红外光谱测定五味子水分及五味子醇甲含量的方法快速无损、准确可靠,可用于五味子质量的现场快速评价。

[关键词] 近红外漫反射光谱; 五味子; 五味子醇甲; 水分; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0068-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220068

Rapid Determinations of Schisandrin and Water in Schisandra Chinensis Fruit by Near Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy ZHANG Ji-dan¹, LI Hua¹, KE Hua-xiang^{1,2}, HE Jing-xia^{1,3}, SHAO Ai-juan¹, YANG Bin^{1*} (1. Institute of Chinese Materia Medica, State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. School of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China; 3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Sichuan, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To develop rapid determination models of water and schisandrin in Schisandra Chinensis Fruit using near infrared (NIR) spectroscopy. **Method:** 93 batches of Schisandra Chinensis Fruit samples were collected from different regions of China. Near infrared spectrum correction models for determinations of schisandrin and water contents in samples were developed with the application of partial least squares regression. The reference analyses were performed with oven-drying method and ultra performance liquid chromatography method respectively for water and schisandrin. Correlation coefficient and predicted root mean square error were also used for evaluating the estimated performance of models. **Result:** The correlation coefficients for calibration models were 0.876 7 and 0.889 0 respectively for water and schisandrin; and root mean square error of prediction set was 0.121 and 0.021 9 respectively. **Conclusion:** This established near infrared spectrum method is rapid, reliable and has no pollution, which can be used for the quality evaluation of Schisandra Chinensis Fruit on site.

[Key words] near infrared diffuse reflectance spectroscopy; Schisandra Chinensis Fruit; schisandrin; water; content determination

近红外(Near Infrared, NIR)光谱介于可见光区和
和中红外光区之间,波数范围为 4 000 ~ 12 800
cm⁻¹。其光谱信息来源于有机分子中含氢基团(如
C-H, O-H, N-H 等)振动的合频与各级倍频的吸收,

[收稿日期] 20150815(003)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201407003)

[第一作者] 张继丹, 硕士研究生, 从事中药化学与质量评价的研究, Tel:010-64014411-2848, E-mail: zjdjy620@163.com

[通讯作者] * 杨滨, 研究员, 从事中药化学与质量评价的研究, 抗氧化研究, Tel:010-64014411-2848, E-mail: ybinmm@126.com

能有效反映样品中有机分子含氢基团的特征振动信息,其包含的化学信息量非常丰富。NIR 分析技术是近年来发展起来的一种新技术,具有快速、无损、原位与无污染等优点,目前已广泛应用于中药材质量鉴定^[1-2],有效成分含量的快速测定^[1,3-4]等。

五味子具有收敛固涩,益气生津,补肾宁心的功效^[1]。木脂素类成分是五味子的主要功效成分,其中五味子醇甲的含量最高,具有显著的保肝、抗衰老等药理作用^[5-7]。水分的高低也会影响到五味子的质量优劣,含水量过高时药材易发霉变质。2010 年版《中国药典》对五味子中五味子醇甲和水分做了明确规定,水分不得超过 16.0%,五味子醇甲不得低于 0.4%。由于传统测定方法繁琐、费时、成本高,拟采用 NIR 法结合偏最小二乘法(Partial Least Squares, PLS)建立五味子中五味子醇甲和水分含量测定模型,对不同产地 93 批样品进行分析。

1 材料

Antaris II 型傅里叶变换近红外光谱仪,配有积分球漫反射采样系统,RESULT™ 光谱采集软件和 TQ 9.1 分析软件(美国 Thermo Fisher 公司);ACQUITY H-Class UPLC™ 型超高效液相色谱仪(包括四元低压梯度泵,真空脱气机,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器,Empower II 色谱工作站,美国 Waters);KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 型超纯水制备仪(法国 Millipore 公司);电热恒温鼓风干燥箱(天津市中环实验电炉有限公司);BT125D 型电子天平(德国 Sartorius);FW80 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

五味子醇甲(批号 MUST-13061206,纯度 ≥ 98%)购自成都曼思特生物科技有限公司;乙腈和甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司);五味子药材购自 6 个省区的大型药材市场,经中国中医科学院中药研究所杨滨研究员鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 的干燥成熟果实。药材经干燥粉碎后过 40 目筛,保存于自封袋,置于干燥箱中备用。

2 方法与结果

2.1 近红外光谱采集 取样品约 5 g,混合均匀后放入石英样品杯中,摊平,以空气为参比,扣除背景,采集近红外光谱图。采样方式积分球漫反射,光谱扫描范围 4 000 ~ 12 000 cm^{-1} ,分辨率 8 cm^{-1} ,扫描次数 64 次,温度(20 ± 2) °C,相对湿度 30% ~ 40%。每批样品扫描 2 次,以其平均光谱作为最终

光谱。93 批五味子样品的 NIR 光谱图见图 1。

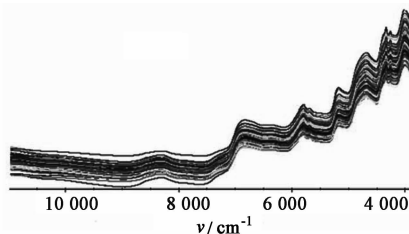
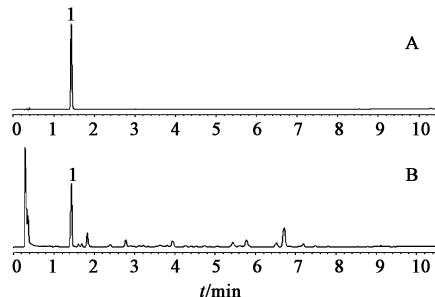


图 1 五味子样品的近红外原始光谱
Fig.1 Original NIR spectra of samples

2.2 水分的测定 采用《中国药典》2010 年版一部附录 IX H 水分测定法中的“烘干法”对五味子药材粉末进行水分测定^[8]。93 批样品的水分含量在 1.45% ~ 2.57%。

2.3 五味子醇甲含量测定 采用 UPLC 法测定五味子中五味子醇甲的含量,精密称取五味子醇甲适量,配制成质量浓度为 22.16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的五味子醇甲对照品溶液;取样品粉末约 0.25 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入甲醇 20 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 20 kHz)20 min,取出,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液过 0.2 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。色谱条件:Acquity BEH C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱,流动相(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 1 min, 45% B; 1 ~ 5 min, 45% ~ 57% B; 5 ~ 7 min, 57% ~ 70% B; 7 ~ 7.5 min, 70% ~ 90% B; 7.5 ~ 10 min, 90% ~ 100% B),流速 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 235 nm,柱温 45 °C,进样量 1 μL 。见图 2。以外标法计算五味子醇甲含量。每批样品平行测定 2 次,取平均值。结果显示,93 批样品的五味子醇甲含量范围为 0.33% ~ 0.60%。



A. 对照品; B. 样品; 1. 五味子醇甲
图 2 五味子样品的 UPLC
Fig.2 UPLC chromatograms of Schisandra chinensis Fruit

2.4 样本集划分 以 2/3 五味子样品作为校正集,用于建立测定五味子样品中五味子醇甲和水分的定量校正模型,剩余 1/3 样品作为验证集,用于验证所

建立校正模型的预测能力。样品中五味子醇甲和水分含量分布见表 1。

表 1 校正集及验证集样品中指标成分的含量分布

样品组		水分	五味子醇甲
校正集	最大值	2.57	0.60
	最小值	1.45	0.33
	平均值	2.07	0.46
验证集	最大值	2.50	0.56
	最小值	1.56	0.38
	平均值	2.12	0.47

2.5 模型的建立与评价 近红外光谱易受到样品的颜色、粒度、杂散光以及噪音信号等影响,为保证谱图基线平稳和所建立校正模型的准确性,必须对原始光谱进行预处理。常用的预处理方法有未处理 (None), Savitsky Golay (SG) 平滑, Norris Derivative (ND) 平滑, 一阶导数 (First Derivative, FD), 二阶导数 (Second Derivative, SD), 多元散射校正 (Multiplicative Scatter Correction, MSC), 标准正态变量校正 (Standard Normal Variate, SNV) 等。光谱数据经过预处理后, 结合 PLS 法, 以内部交叉验证相关系数 (R), 内部交叉验证均方差 (Root Mean Square Error of Cross Validation, RMSECV) 为综合指标, 考察不同预处理方法对模型性能的影响。当 R 越趋于 1, RMSECV 越小时, 校正模型预测效果越好。表 2 结果表明, 水分模型适宜的预处理方法是 FD + ND(5,5), 五味子醇甲的最佳预处理方法为 MSC。本研究利用 TQ Analyst 9.1 软件的杠杆值剔除异常光谱 3 批。

由于不同产区五味子样品的近红外光谱非常相似, 很难直接判定五味子醇甲和水分的含量与个别波长点吸光度之间的相关性。通过对光谱区间的筛选, 发现在 $10\ 000 \sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$, 样品光谱信息与五味子醇甲的含量有很好的关联性, $R = 0.891\ 2$; 在 $6\ 062.49 \sim 5\ 287.41\ \text{cm}^{-1}$, 样品光谱信息与水分含量有很好的关联性, $R = 0.857\ 4$, 见表 3。

比较了不同主成分数主成分数对应的 RMSECV, 当五味子醇甲与水分主成分数分别为 6 和 10 时, 其 RMSECV 最小, 分别为 0.023 7 和 0.135, 模型性能最好, 没有出现模型过拟或拟合不足。

综上, 在 $6\ 062.49 \sim 5\ 287.41\ \text{cm}^{-1}$, 采用 FD + ND(5,5) 预处理方法, 以 Factors 为 6 建立了水分的

表 2 不同光谱预处理方法的建模

Table 2 Results of different spectra preprocessing methods

项目	预处理方法	主成分数	R	RMSECV	
水分	None	4	0.805 8	0.155	
	SD + ND(5,5)	5	0.846 0	0.14	
	SD + SG(7,3)	4	0.811 9	0.153	
	FD + ND(5,5)	6	0.857 4	0.135	
	FD + SG(7,3)	7	0.853 8	0.137	
	MSC	7	0.839 8	0.143	
	SNV	7	0.840 4	0.143	
	五味子醇甲	None	7	0.836 8	0.028 7
		SD + ND(5,5)	6	0.859 8	0.026 7
SD + SG(7,3)		5	0.808 6	0.030 7	
FD + ND(5,5)		6	0.864 0	0.026 3	
FD + SG(7,3)		6	0.836 7	0.028 7	
MSC		9	0.889 8	0.023 8	
SNV		5	0.824 0	0.029 5	

表 3 不同光谱波段的建模

Table 3 The results of different regions

项目	波数范围/ cm^{-1}	主成分数	R	RMSECV
水分	6 062.49 ~ 4 910.54	7	0.853 5	0.137
	6 000.00 ~ 5 500.00	4	0.692 9	0.190
	6 062.49 ~ 5 287.41	6	0.857 4	0.135
	7 225.11 ~ 4 135.46	6	0.849 1	0.139
	10 000.00 ~ 4 000.00	6	0.835 7	0.144
五味子醇甲	5 788.51 ~ 4 330.93	9	0.889 8	0.024
	6 036.10 ~ 4 204.06	8	0.873 0	0.026
	7 038.90 ~ 5 662.76,	10	0.880 0	0.025
	5 894.37 ~ 4 427.76			
	7 042.52 ~ 4 632.22	8	0.863 8	0.027
10 000.00 ~ 4 000.00	10	0.891 2	0.024	

近红外预测模型。其校正模型的 R 为 0.896 4, 校正集均方根误差 (Root Mean Square Error of Calibration, RMSEC) 为 0.116。在 $10\ 000 \sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 区间, 采用 MSC 预处理方法, 以 Factors 为 10 建立了五味子醇甲的近红外预测模型。其校正模型的 R 为 0.945 2, RMSEC 为 0.017 0。经验证, 26 份验证集样品的 NIR 预测值与参考法的实测值比较接近, 水分和五味子醇甲的预测 R 分别为 0.876 7 和 0.889 0, 预测均方根误差 (Root Mean Square Error of Prediction, RMSEP) 分别为 0.121 和 0.022 9, 见图 3,

4. 结果表明所建立的校正模型具有良好的预测能力。

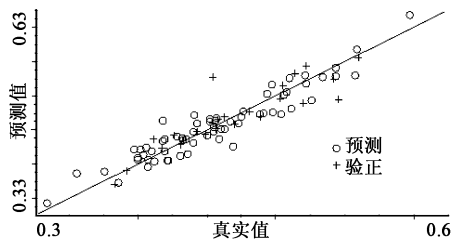


图 3 五味子醇甲预测值与实测值相关
Fig. 3 Correlation diagram of predicted value and measured value of schisandrins

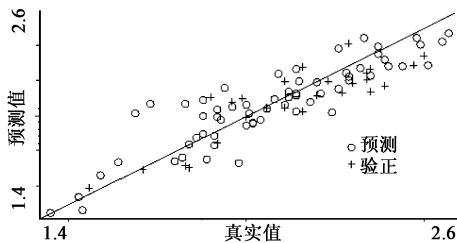


图 4 水分预测值与实测值相关
Fig. 4 Correlation diagram of predicted value and measured value of water

3 讨论

本次实验旨在利用 NIR 技术简便、快速、无污染的优点,建立五味子质量的现场快速检测方法,提高效率 and 降低成本。所建立近红外定量模型在不到 1 min 分析时间内,能同时预测未知五味子样品中

五味子醇甲和水分的含量,比常规的烘干法和液相色谱法的测定效率提高了几十倍。

[参考文献]

- [1] Escamilla M Navarro, Sanz F Rodenas, Li H, et al. Rapid determination of baicalin and total baicalein content in Scutellariae Radix by ATR-IR and NIR spectroscopy [J]. Talanta, 2013, 114(10):304-310.
- [2] 余驰,姜红,刘爱萍. 近红外漫反射法建立厚朴药材的定性模型[J]. 药物分析杂志, 2009, 2(4):656-658.
- [3] 李化,苏建春,柯华香,等. 基于近红外漫反射光谱和多元数据分析的黄芩质量标准的快速评价方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3):58-64.
- [4] 涂瑶生,全智慧,孙冬梅,等. 近红外漫反射光谱法快速测定制川乌中生物碱及水分含量[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(3):399-408, 443.
- [5] 李海涛,胡刚. 五味子醇甲抑制 6-羟基多巴胺诱导 PC12 细胞凋亡的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2004, 20(2):96-98.
- [6] 周妍妍,刘艳丽,董春雪,等. 五味子醇甲对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠脑组织突触素, α -突触核蛋白表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8):1076-1078.
- [7] 王洋,戚好文,胡咏武,等. 五味子醇甲对 KC 介导的肝纤维化抑制作用的初步研究[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(9):816-818.
- [8] 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, 2010:61.

[责任编辑 顾雪竹]