

近红外漫反射光谱结合偏最小二乘法快速测定厚朴中酚类成分和水分含量

李化¹, 柯华香^{1,2}, 贺敬霞^{1,3}, 张继丹¹, 何宇新², 李玲², 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: 利用近红外漫反射光谱技术对厚朴药材中水分和酚类成分进行快速、无损的定量分析。方法: 收集不同产地厚朴样品 99 批, 采用偏最小二乘法建立水分和酚类成分的近红外定量模型, 以烘干法和超高效液相色谱法, 分别测定样品中水分和酚类成分的含量, 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: 水分、厚朴酚、和厚朴酚、总酚的校正均方差分别为 0.155, 0.120, 0.133, 0.236; 相关系数分别为 0.872 8, 0.989 9, 0.976 9, 0.981 2; 最佳主成分分别为 4, 6, 9 和 5; 预测误差均方差分别为 0.161, 0.154, 0.179, 0.248。结论: 所建立的近红外分析方法快捷、准确、无损, 可用于厚朴药材质量的快速检测。

[关键词] 近红外光谱法; 厚朴; 水分; 酚类物质; 定量模型

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0072-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220072

Rapid Determination of Phenolic Compounds and Water Contents in Magnoliae Officinalis Cortex Using Near Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy Combined with PLS Algorithm LI Hua¹, KE Hua-xiang^{1,2}, HE Jing-xia^{1,3}, ZHANG Ji-dan¹, HE Yu-xin², LI Ling², 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 quantitative methods for rapid and nondestructive determination of phenolic compounds and water in Magnoliae Officinalis Cortex using near-infrared (NIR) diffuse reflectance spectroscopy. **Method:** 99 batches of Magnoliae Officinalis Cortex samples were collected from different regions of China. Partial least squares (PLS) method was used to establish NIR quantitative models for determinations of water and phenolic compounds in samples. The reference analyses were performed with oven-drying method and ultra performance liquid chromatography method respectively for determination of water and phenolic compounds. Correlation coefficient and predicted root mean square error were also used for evaluating the estimated performance of the models. **Result:** For water, magnolol, honokiol, and magnolol + honokiol, root mean square errors of calibration set were 0.156, 0.120, 0.133 and 0.236, respectively; the correlation coefficients were 0.872 8, 0.989 9, 0.976 9 and 0.981 2, respectively; and principal components were 4, 6, 9 and 5, respectively. Predicted root mean square errors of the four analytes reached 0.161, 0.154, 0.179 and 0.248, respectively. **Conclusion:** The developed analytical method based upon NIR spectroscopy was proved to be rapid, accurate, and non-destructive, which can be used for rapid quality evaluation of Magnoliae Officinalis Cortex.

[Key words] near infrared spectroscopy; Magnoliae Officinalis Cortex; water; phenolic compounds; quantitative model

[收稿日期] 20150814(010)

[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] 李化, 博士, 副研究员, 从事中药化学与质量评价及元素的形态分析的工作, Tel: 010-64014411-2848, E-mail: lihua1976@icmm.ac.cn

[通讯作者] * 杨滨, 博士, 研究员, 从事中药化学与质量评价及抗氧化的工作, Tel: 010-64014411-2848, E-mail: ybinmm@126.com

中药厚朴具有扩张血管、抗炎、抗菌、抗病毒等多种药理作用^[1-2]。主要活性成分厚朴酚、和厚朴酚,是厚朴的主要药效物质基础。2010 年版《中国药典》将其作为厚朴药材的质控指标(厚朴酚与和厚朴酚总量不得少于 2.0%)。同时 2010 年版《中国药典》对药材含水量也明确规定不得超过 15.0%。目前市售厚朴药材质量参差不齐,如产地、采收年限、采收时间、贮藏等因素不同会导致和厚朴酚、厚朴酚含量的差异,以致影响到厚朴临床应用的有效性;药材含水量过高会导致药材的霉烂变质。《中国药典》中厚朴质量评价方法耗时较长,尤其是水分测定需要 5~6 h,因此建立一种快速、准确评价厚朴质量的方法势在必行。

近红外光谱技术(Near Infrared, NIR)是迅速发展的一种绿色分析技术,具有快捷、无损、环境友好等优点,随着计算机和化学计量学的发展,近红外定性定量分析技术在食品业、制药行业、农业等领域已得到了成功的应用^[3-7]。近红外光谱技术应用于厚朴质量评价的研究报道较少,郭念欣等^[8]建立了藿香正气胶囊中厚朴酚的定量预测模型,余驰等^[9]采用近红外漫反射法建立厚朴药材的鉴别模型,准确鉴别了厚朴的真伪品。但尚未见到厚朴药材中主要活性成分和水分的近红外定量分析报道。本文以 99 批不同产地厚朴样本为研究对象,以超高效液相色谱法(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)和烘干法为参考方法,分别测定样品中水分和酚类成分的含量。在此基础上采用 NIR 法建立厚朴中厚朴酚、和厚朴酚、总酚、水分的定量模型。

1 材料

Antaris II 型傅里叶变换近红外光谱仪,配有积分球漫反射附件,铟镓砷(InGaAs)检测器、CaF₂ 分束器、样品旋转器、石英样品杯、Result 样品光谱采集软件和 TQ Analyst 9.1 分析软件(美国 Thermo Scientific 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);2004 MP6 型半微量电子显示天平(德国 Sartorius 公司);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);FW80 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

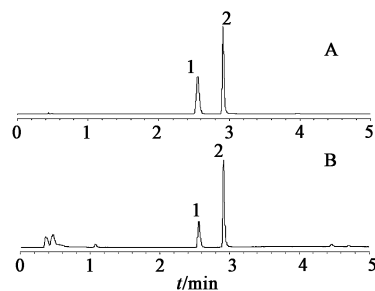
厚朴酚(批号 117029-200411),和厚朴酚(批号 110730-201313)对照品,购自中国食品药品检定研

究院。乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,超纯水自制。99 批厚朴药材在 2015 年 5 月至 9 月期间收集于四川、湖北、湖南、云南、安徽、广西、河北等 7 个产地,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厚朴 *Magnolia officinalis* 或凹叶厚朴 *M. officinalis* var. *biloba* 的干燥干皮。药材粉碎过 40 目筛,编号,封口袋密封置防潮柜中常温保存,备用。

2 方法与结果

2.1 烘干法测定水分含量 采用《中国药典》2010 年版一部附录 IX H 水分测定法(烘干法)测定厚朴药材的含水量^[10]。99 批样品的水分测定结果为 2.04%~3.39%。

2.2 超高效液相色谱法测定指标成分含量 采用 UPLC 法测定厚朴中厚朴酚与和厚朴酚的含量,作为建立模型的化学参考值。取厚朴酚、和厚朴酚对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制得质量浓度为 21.85 mg·L⁻¹厚朴酚和 4.24 mg·L⁻¹和厚朴酚的混合对照品溶液。厚朴粉末约 0.1 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入甲醇 25 mL,摇匀,放置过夜,滤过,精密量取 2 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,取续滤液过 0.2 μm 微孔滤膜,供 UPLC 分析用。色谱条件:Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流动相水(A),乙腈(B),梯度洗脱(0~1 min, 50% A; 1~2 min, 50%~5% A; 2~5 min, 5% A);柱温 30 °C,流速 0.3 mL·min⁻¹,检测波长 294 nm,进样体积 1 μL。色谱图见图 1。以外标法计算厚朴酚与和厚朴酚的含量。总酚以二者含量之和计。每份样品平行测定 2 次,取平均值。结果显示,99 批样品的总酚含量范围为 0.35%~6.63%。



A. 混合对照品; B. 样品; 1. 和厚朴酚; 2. 厚朴酚

图 1 厚朴样品溶液 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of Magnoliae Officinalis Cortex

2.3 近红外模型的建立与评价

2.3.1 样品 NIR 光谱的采集 取厚朴粉末约 5 g,

置石英样品杯中,轻轻振摇使混合均匀。采用积分球漫反射部件进行测样,见图 2。分辨率 8 cm^{-1} ,扫描 64 次,扫描范围 $10\ 000 \sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$,温度 $(20 \pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$,空气相对湿度 $30\% \sim 40\%$,以空气为参比,每批样品重复采集 2 次,平均光谱用于建模分析。

2.3.2 异常样本的剔除与样本集划分 利用 TQ

表 1 校正集及验证集样品中指标成分的含量分布

Table 1 Content distribution of index components of samples

样品组		水分	厚朴酚	和厚朴酚	总酚
校正集	最大值	3.39	5.04	3.68	6.63
	最小值	2.04	0.26	0.09	0.35
	平均值	2.62	1.99	0.98	2.92
验证集	最大值	3.06	4.51	3.35	5.04
	最小值	2.41	0.70	0.17	0.88
	平均值	2.74	1.83	0.94	2.70

2.3.3 近红外光谱模型的建立 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、建模波段及维数;以相关系数 (R) 来评价模型的拟合效果;以预测集均方根误差 (Root Mean Square Error of Prediction, RMSEP) 考核模型对未知样品的预测效果。一般而言,校正集均方根误差 (Root Mean Square Error of Calibration, 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。

2.3.3.1 光谱预处理方法的选择 厚朴样品近红外原始光谱叠加图见图 2。为减少噪声、信号本底、基线漂移、样品颗粒不均匀以及光散射等对光谱的干扰,保证模型的预测性能,本实验分别考察了未处理 (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), 以及上述诸方法的联合运用, 见表 2。最终确定对水分、厚朴酚、和厚朴酚、总酚的最佳预处理方法分别是 SD + SG(7,3), SD + SG(7,3), FD + SG(7,3) 和 SD + ND(5,5)。其对应的 RMSECV 值在所有预处理方法中最小, 分别为 0.184, 0.183, 0.253 和 0.336。

2.3.3.2 光谱波段的选择 偏最小二乘法 (Partial Least Squares, PLS) 可以处理全谱信息, 但这些信息中包含了过多的冗余信息。因此, 在建立模型时, 需

Analyst 9.1 软件的杠杆值剔除异常光谱 2 批。剩余 97 批厚朴药材随机分为校正集和预测集。其中 64 批样品作为校正集, 用于建立测定厚朴样品中厚朴酚、和厚朴酚、总酚和水分的定量校正模型, 33 批作为验证集, 用于验证所建立校正模型的预测能力。校正集和预测集中总酚、厚朴酚、和厚朴酚、水分的最大值、最小值和平均值见表 1。

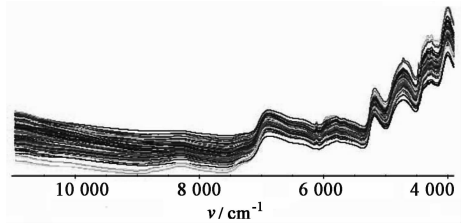


图 2 厚朴粉末近红外原始光谱

Fig.2 Original NIR spectra of Magnolae Officinalis Cortex

要找到能充分反映出样品中各指标成分的化学特征的最佳建模波段, 改善模型性能, 提高计算速度。表 3 是各指标成分不同光谱波段的比较结果。水分、厚朴酚、和厚朴酚、总酚的最优建模波段分别为 $6\ 093.95 \sim 4\ 609.04$, $6\ 079.02 \sim 5\ 328.32$ 及 $4\ 609.04 \sim 4\ 378.18$, $8\ 061.25 \sim 4\ 051.78\text{ cm}^{-1}$, $6\ 127.76 \sim 5\ 397.18$ 及 $4\ 697.80 \sim 332.37\text{ cm}^{-1}$ 。

2.3.3.3 主成分数的选择 采用 PLS 法建立定量模型时, 主成分数 (Factors) 大小的选择对模型预测能力的影响较大。主成分数值太大, 所建模型包含太多的噪音, 会出现过拟合现象; 太少则导致建模信息不全, 模型预测能力较差。本研究采用内部交叉验证法筛选主成分数。研究发现当水分、厚朴酚、和厚朴酚及总酚的主成分数分别是 4, 6, 9 和 5 时, 对应的 RMSECV 值最小。

2.3.3.4 定量模型的建立和验证 采用 TQ Analyst 9.1 分析软件, 建立厚朴药材近红外光谱与待测组分含量间的校正模型, 进而对验证集样品进行分析。水分校正模型的 R 为 0.872 8; RMSEC 为

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	6	0.754 9	0.209	
	SD + ND(5,5)	7	0.796 2	0.192	
	SD + SG(7,3)	4	0.813 6	0.184	
	FD + ND(5,5)	5	0.774 2	0.201	
	FD + SG(7,3)	9	0.814 7	0.187	
	MSC	4	0.720 4	0.221	
	SNV	4	0.729 5	0.217	
	厚朴酚	None	5	0.908 9	0.352
		SD + ND(5,5)	10	0.971 3	0.202
SD + SG(7,3)		6	0.976 3	0.183	
FD + ND(5,5)		2	0.912 7	0.345	
FD + SG(7,3)		10	0.974 2	0.191	
MSC		10	0.923 3	0.327	
SNV		4	0.873 4	0.412	
和厚朴酚		None	5	0.483 3	0.558
		SD + ND(5,5)	5	0.824 4	0.353
	SD + SG(7,3)	6	0.861 3	0.335	
	FD + ND(5,5)	10	0.866 7	0.311	
	FD + SG(7,3)	9	0.914 5	0.253	
	MSC	8	0.631 7	0.501	
	SNV	9	0.664 3	0.481	
	总酚	None	6	0.769 6	0.796
		SD + ND(5,5)	8	0.961 7	0.336
SD + SG(7,3)		3	0.953 3	0.371	
FD + ND(5,5)		9	0.958 8	0.349	
FD + SG(7,3)		9	0.961 2	0.339	
MSC		4	0.770 7	0.784	
SNV		10	0.888 6	0.565	

表 3 不同光谱波段的建模

Table 3 Results of different regions

项目	波数范围/cm ⁻¹	主成分数	R	RMSECV	
水分	6 093.95 ~ 4 609.04	4	0.813 6	0.184	
	6 178.81 ~ 4 195.51	6	0.793 0	0.194	
	7 101.19 ~ 4 041.26	6	0.782 1	0.199	
	7 328.96 ~ 5 014.22	5	0.764 7	0.204	
	7 329.46 ~ 6 868.31,	2	0.787 4	0.195	
	5 319.50 ~ 4 816.62				
	8 000 ~ 4 000 cm ⁻¹	6	0.776 0	0.202	
	厚朴酚	5 542.04 ~ 4 045.08	7	0.969 0	0.209
		6 079.02 ~ 5 328.32,	6	0.980 5	0.166
4 609.04 ~ 4 378.18					
6 557.76 ~ 4 397.18		6	0.976 3	0.183	
6 853.53 ~ 4 137.81		5	0.970 7	0.203	
7 179.02 ~ 5 328.32		7	0.976 5	0.183	
10 000 ~ 4 000		6	0.973 4	0.194	
和厚朴酚		6 151.42 ~ 4 906.16	9	0.856 4	0.321
		6 317.66 ~ 4 084.54	10	0.861 6	0.317
	6 505.25 ~ 5 982.10,	8	0.846 8	0.332	
	4 661.35 ~ 4 103.78				
	7 277.45 ~ 5 118.12	10	0.904 7	0.265	
	8 061.25 ~ 4 051.78	9	0.914 5	0.253	
	10 000 ~ 4 000	10	0.866 6	0.311	
	总酚	4 100 ~ 6 500	7	0.959 0	0.348
		6 062.49 ~ 5 287.41	4	0.949 5	0.385
6 127.76 ~ 5 397.18,		5	0.969 6	0.300	
4 697.80 ~ 4 332.37					
7 290.70 ~ 4 612.72		8	0.961 7	0.336	
8 112.04 ~ 4 124.57		6	0.961 6	0.337	
10 000 ~ 4 000		5	0.964 4	0.325	

0.155;验证模型的 RMSEP 为 0.161。厚朴酚校正模型的 R 为 0.989 9, RMSEC 为 0.120;验证模型的 RMSEP 为 0.154。和厚朴酚校正模型的 R 为 0.976 9, RMSEC 为 0.133;验证模型的 RMSEP 为 0.179。总酚校正模型的 R 为 0.981 2, RMSEC 为 0.236;验证模型的 RMSEP 为 0.248, 见图 3 ~ 6。所建模型 RMSEC 与 RMSEP 接近, 表明所建模型对校正集样本数据有较小的预测误差, 具有好的预测准确度。33 批预测样品中待测组分实测值与预测值比较接近, 水分、厚朴酚、和厚朴酚、总酚验证模型的 R 分别为 0.844 8, 0.981 8, 0.956 5 和 0.972 9, 表明所建立的校正模型具有良好的预测能力。

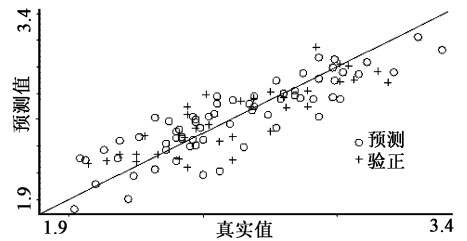


图 3 水分近红外实测值和预测值相关

Fig. 3 Correlation between measured content and predicted content of water

3 讨论

样品粒径的差异会影响入射光与样本相互作用

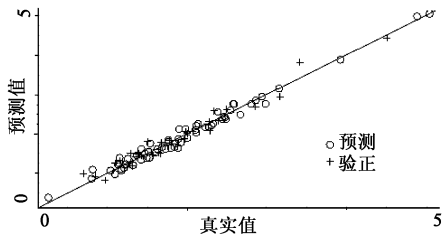


图 4 厚朴酚近红外实测值和预测值相关
Fig. 4 Correlation between measured content and predicted content of magnolol

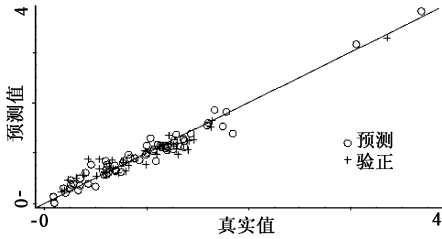


图 5 和厚朴酚近红外实测值和预测值相关
Fig. 5 Correlation between measured content and predicted content of honokiol

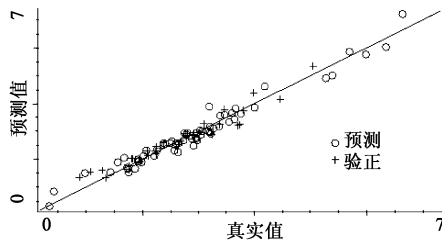


图 6 总酚近红外实测值和预测值相关
Fig. 6 Correlation between measured content and predicted content of total phenolics

的环境,影响到漫反射的光谱特性。为此,还考察了不同粒径(20 目和 40 目)对厚朴近红外模型预测性能的影响。结果显示,粉末粒径在 40 目时所建模型的性能优于 20 目。

本研究采用 NIR 技术对 99 批有代表性的不同产地厚朴样品进行定量研究,结果显示所建立的各项指标成分的近红外定量校正模型的 RMSECV 小, RMSEC 和 RMSEP 接近,表明所建模型具有很好的稳健性和预测精度,可实现厚朴酚、和厚朴酚、总酚、水分的快速同步测定。研究发现所测 99 批市售

厚朴药材的水分合格率为 100%,总酚含量合格率为 81%。其中不同产区的厚朴样品总酚在含量上差异较为显著,达 20 倍之多,推测总酚含量差异可能由于采收年限、采收时间、气候土壤等影响因素的不同所导致。

与常规测定方法相比,本法可以同时进行了多指标成分的测定,且操作简便、快速无损、准确可靠,分析成本低,绿色环保,特别适合流通市场上大批量厚朴药材的快速质量评价。

[参考文献]

- [1] 陈笈,王伯初.厚朴的药理研究进展[J].重庆大学学报:自然科学学报,2005,28(9):136-139.
- [2] 秦洁,李晓庆,赵春娟,等.厚朴酚与和厚朴酚抗鼻咽癌作用机制研究[J].中草药,2015,46(2):226-230.
- [3] 陆婉珍,袁洪福,徐广通,等.现代近红外光谱分析技术[M].北京:中国石化出版社,2001:119
- [4] 严衍禄.近红外光谱分析基础与应用[M].北京:中国轻工业出版社,2005:286-395.
- [5] Wang P, Yu Z G. Species authentication and geographical origin discrimination of herbal medicines by near infrared spectroscopy: A review[J]. J Pharmaceu Anal, 2015,5(5):277-284.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 郭念欣,蔡佳良,李蕾蕾,等.运用近红外技术建立藿香正气胶囊中厚朴酚的定量模型[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(8):146-149.
- [9] 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.
- [10] 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,2010:235.

[责任编辑 顾雪竹]