

近红外光谱法快速测定丹皮中丹皮酚和水分的含量

贺敬霞^{1,2}, 杨滨¹, 柯华香^{1,3}, 尹蓉莉², 张继丹¹, 李化^{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. 成都中医药大学 药学院, 成都 611137; 3. 西华大学 食品与生物工程学院, 成都 610039)

[摘要] **目的:**采用近红外光谱技术结合偏最小二乘法(Partial Least Squares, PLS)快速测定丹皮中丹皮酚与水分含量。**方法:**收集不同产地丹皮样品108批,采用PLS法建立丹皮中水分和丹皮酚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丹皮酚含量,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:**丹皮酚和水分校正集的相关系数分别为0.959 3, 0.873 8,校正均方根误差分别为0.114, 0.167;预测集均方根误差分别为0.136, 0.157。**结论:**该方法快速、简便、无污染,实验结果实现了丹皮样品中丹皮酚和水分含量的快速测定。

[关键词] 近红外光谱; 丹皮; 丹皮酚; 水分; 偏最小二乘法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0064-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220064

Rapid Content Determination of Paeonol and Water in Moutan Cortex Using Near Infrared Spectroscopy

HE Jing-xia^{1,2}, YANG Bin¹, KE Hua-xiang^{1,3}, YIN Rong-li², ZHANG Ji-dan¹, LI Hua^{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. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 3. School of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

[Abstract] **Objective:** To rapidly determine the contents of paeonol and water in Moutan Cortex using near infrared (NIR) spectroscopy combined with partial least squares (PLS). **Method:** 108 batches of Moutan Cortex samples were collected from different regions of China. Near infrared spectrum correction models were established using PLS method for determination of paeonol and water content. The reference analyses were performed with oven-drying method and ultra performance liquid chromatography method respectively for water and paeonol content. Correlation coefficient and predicted root mean square error were also used for evaluating the estimated performance of the models. **Result:** The correlation coefficients for calibration set were 0.959 3 and 0.873 8 respectively for paeonol and water content; root mean square error of calibration was 0.114 and 0.167, respectively; root mean square error of prediction set was 0.136 and 0.157, respectively. **Conclusion:** This method is rapid, simple, and has no pollution, which can be used for rapid determination of paeonol and water in Moutan Cortex.

[Key words] near infrared spectroscopy; Moutan Cortex; paeonol; water; partial least squares

丹皮俗称牡丹皮,具有清热凉血、活血散瘀的功能^[1],在临床上有抗凝血、降压、抗炎、抑制中枢神经系统等作用^[2-3]。丹皮酚是丹皮的主要成分,具有抗炎、抗血栓、抗动脉粥样硬化、降血糖、保肝护肾

等药理活性^[3-4]。由于丹皮地域分布较广,采收加工条件不一,导致市场上丹皮的质量参差不齐^[5-7],进而造成疗效上的差异,因此建立一种快速无损、准确可靠的药材质量现场评价方法势在必行。丹皮酚

[收稿日期] 20150815(002)

[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] 贺敬霞,在读硕士,从事中药质量评价和中药新剂型的研究, Tel:010-64014411-2848, E-mail: hejingxia123@163.com

[通讯作者] *李化,副研究员,从事中药化学与质量评价、元素的形态分析研究, Tel:010-64014411-2848, E-mail: lihua1976@icmm.ac.cn

与水分是丹皮药材质量控制的重要指标,2010 年版《中国药典》规定了丹皮中丹皮酚含量不低于 1.2%,水分不高于 13.0%。虽然《中国药典》记载的测定方法准确可靠,但存在操作繁琐、测定时间长等不足之处。近红外光谱技术(Near Infrared, NIR)近年来发展较快,具有测定速度快、准确度高,绿色环保等优点,目前已逐步推广应用于中药的定性定量研究中^[8-11]。本研究拟采集丹皮样品的近红外光谱数据,以超高效液相色谱法(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)测定丹皮酚含量、烘干法测定水分含量作为参考值,结合偏最小二乘法(Partial Least Squares, PLS)建立丹皮样品中丹皮酚和水分同时定量的 NIR 模型,以实现丹皮中有效成分快速检测的目的。

1 材料

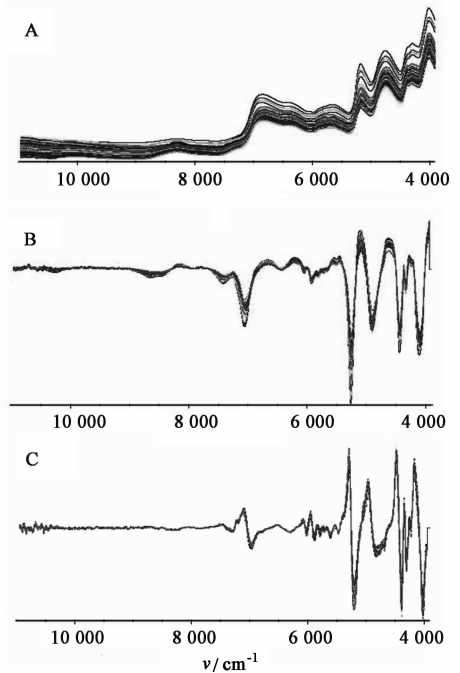
Antaris II 型傅里叶变换近红外光谱仪,配有积分球漫反射采样系统,RESULT™ 光谱采集软件和 TQ 9.1 分析软件(美国 Thermo Fisher 公司),ACQUITY H-Class UPLC™ 型超高效液相色谱仪(包括四元低压梯度泵,真空脱气机,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器,Empower II 色谱工作站,美国 Waters),KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q 型超纯水制备仪(法国 Millipore 公司),BT125D 型电子天平(德国 Sartorius),FW80 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公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

丹皮酚(纯度 ≥ 98%,批号 110708-200506)购自成都曼思特生物科技有限公司,乙腈、甲醇均为色谱纯(美国 Fisher 公司),其余试剂均为分析纯,超纯水由 Milli-Q 纯水机制备。108 批丹皮药材购自全国各地大型药材市场,经中国中医科学院中药研究所杨滨研究员鉴定为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* 的干燥根皮。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 近红外光谱采集 取样品粉末约 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,求平均 NIR 光谱值。108 批丹皮样品经不同预处理方法处理后的 NIR 光谱图见图 1。

2.2 水分的含量测定 取样品粉末 2.0 g,精密称



A. 无处理;B. 一阶导数 + Norris 导数滤波平滑;C. 二阶导数 + Norris 导数滤波平滑

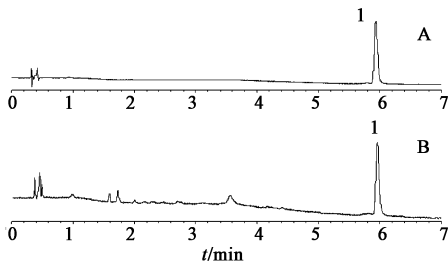
图 1 方法预处理的丹皮样品近红外光谱

Fig. 1 NIR spectra of Moutan Cortex using different pretreatments

定,参考《中国药典》2010 年版一部附录 IX H 水分测定法(烘干法)测定 108 批丹皮药材的含水量^[1],结果为 2.66% ~ 4.40%。

2.3 丹皮酚的含量分析 取丹皮酚对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制得质量浓度为 4.12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丹皮酚对照品溶液。取丹皮粉末约 0.1 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 20 kHz) 30 min,取出,放冷,用甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液过 0.2 μm 微孔滤膜,供 UPLC 分析用。色谱条件: Aquity BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流动相水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 0.5 min, 90% ~ 85% A; 0.5 ~ 2.5 min, 85% A, 2.5 ~ 3 min, 85% ~ 80% A; 3 ~ 6.5 min, 80% ~ 58% A; 6.5 ~ 7 min, 58% ~ 90% A);柱温 40 °C,流速 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 274 nm,进样体积 1 μL 。见图 2。以外标法计算丹皮酚含量。每批样品平行测定 2 次,取平均值。结果显示,108 批样品的丹皮酚含量范围为 0.26% ~ 2.42%。

2.4 样本集划分 以 2/3 丹皮样品作为校正集,用于建立测定丹皮样品中丹皮酚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



A. 对照品; B. 样品; 1. 丹皮酚

图 2 丹皮样品溶液的 UPLC

Fig. 2 UPLC chromatograms of Moutan Cortex

模型的预测能力。校正集和验证集中丹皮酚和水分的最大值、最小值和平均值见表 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	丹皮酚
校正集	最大值	4.40	2.42
	最小值	2.66	0.26
	平均值	3.49	1.24
验证集	最大值	4.30	2.09
	最小值	2.75	0.33
	平均值	3.52	1.24

2.5 光谱预处理方法的选择 在 NIR 采集过程中,样品状态、杂散光、测量条件等因素会引起基线不稳,为提高模型的稳健性和准确性,应选择合适的光谱预处理法,剔除基线不稳、仪器噪音等干扰信号。本实验以相关系数(R),内部交叉验证均方差(Root Mean Square Error of Cross Validation, RMSECV)为评价参数,通过对未处理(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)等不同预处理方法进行筛选,分别确定水分与丹皮酚定量模型的最佳预处理方法为 SD + ND(5,5)和 FD + ND(5,5),详见表 2。

2.6 建模波段的选择 全波段光谱中包含大量的信息,由于所测指标性成分的化学结构不同,其吸收峰的主要信息仅与某些波段关系密切,因此需要进一步优化建模波段来提高模型的准确性。本实验以 R 与 RMSECV 作为评价指标,确定丹皮酚和水分最佳建模波段范围分别为 $7\ 277.45 \sim 4\ 031.93\ \text{cm}^{-1}$ 和 $6\ 321.1 \sim 4\ 951.77\ \text{cm}^{-1}$,详见表 3。

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	0.648 8	0.261
	SD + ND(5,5)	5	0.820 5	0.196
	SD + SG(7,3)	7	0.815 7	0.198
	FD + ND(5,5)	7	0.794 9	0.210
	FD + SG(7,3)	6	0.811 5	0.201
	MSC	4	0.706 9	0.243
	SNV	4	0.717 9	0.240
	丹皮酚	None	10	0.821 1
SD + ND(5,5)		6	0.883 3	0.189
SD + SG(7,3)		4	0.870 8	0.198
FD + ND(5,5)		10	0.894 5	0.182
FD + SG(7,3)		4	0.854 3	0.209
MSC		10	0.842 6	0.219
SNV		10	0.819 6	0.233

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	6 321.18 ~ 4 951.77	6	0.822 5	0.195
	6 548.23 ~ 5 553.72	8	0.738 2	0.239
	7 035.00 ~ 5 115.00	5	0.820 5	0.196
	7 348.23 ~ 6 853.72,	7	0.798 3	0.208
	5 484.32 ~ 4 292.43			
	7 360.91 ~ 4 190.99	7	0.804 0	0.206
	10 000.00 ~ 4 000.00	6	0.770 9	0.221
	丹皮酚	4 365.49 ~ 4 261.91,	10	0.854 1
5 916.54 ~ 5 577.69				
7 264.20 ~ 4 111.32		6	0.825 0	0.231
7 277.45 ~ 4 031.93		10	0.906 8	0.170
7 277.45 ~ 4 906.16		9	0.864 7	0.203
8 475.67 ~ 4 031.93		9	0.892 5	0.183
10 000.00 ~ 4 000.00		10	0.893 3	0.182

2.7 主成分数的选择 PLS 法建立定量分析模型时,若主成分数选择不当,模型会出现过拟合或拟合不完全的现象,故需对主成分数进行筛选。本实验通过比较不同主成分数对应的 RMSECV 值,发现当丹皮酚与水分的主成分数分别为 10 和 6 时, RMSECV 值最小,分别为 0.170 和 0.195,所建的模型性能最好。

2.8 定量模型的建立与验证 采用 TQ Analyst 9.1 软件,从 108 批丹皮样品中随机选择 72 批建立水分和丹皮酚的校正模型,36 批样品组成验证集,进行模型验证。对于水分,预处理方法是 SD + ND(5, 5),建模范围 $6\ 321.1 \sim 4\ 951.77\ \text{cm}^{-1}$,主成分数 6 时,验证集的 $R=0.889\ 7$,预测集均方根误差(Root Mean Square Error of Prediction, RMSEP) = 0.157;对于丹皮酚,预处理方法是 FD + ND(5, 5),建模范围 $7\ 277.45 \sim 4\ 031.93\ \text{cm}^{-1}$,主成分数 10 时,验证集的 $R=0.933\ 9$,RMSEP = 0.136,见表 3。图 3,4 中直线表明的是近红外模型的预测值与实测值之间的关系,当图中样品点越靠近这条直线,说明近红外预测值越接近化实测值,表明模型预测的准确度越高。研究结果表明,基于 NIR 法建立的水分和丹皮酚含量的校正模型达到了较高的预测准确度,可以用于丹皮中水分和丹皮酚含量的快速检测。

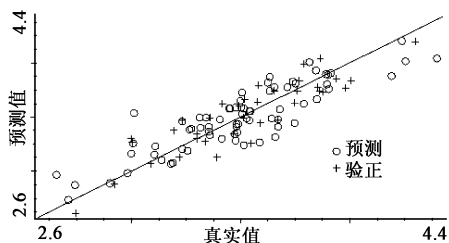


图 3 水分预测值与实测值相关
Fig.3 Correlation diagram of predicted value and measured value of water

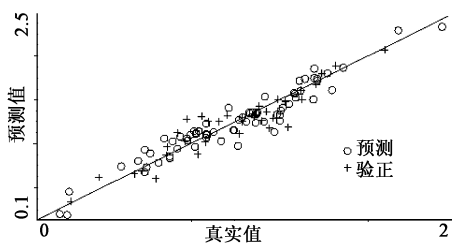


图 4 丹皮酚预测值与实测值相关
Fig.4 Correlation diagram of predicted value and measured value of paeonol

3 讨论

光谱的预处理有助于提高光谱和噪声的分辨率,便于寻找被较强吸收覆盖的一个吸收较小光谱的确切值位置。故在建立水分、丹皮酚的定量模型时,我们分别采用 SD + ND(5, 5) 和 FD + ND(5, 5)

对近红外光谱进行预处理以提取光谱的特征信息。通过对丹皮近红外光谱在 $7\ 277.45 \sim 4\ 031.93\ \text{cm}^{-1}$ 和 $6\ 321.1 \sim 4\ 951.77\ \text{cm}^{-1}$ 的光谱区间的 PLS 分析,分别建立了丹皮酚和水分的近红外定量模型。内部交叉验证和外部验证结果表明,近红外光谱技术可以用于丹皮中丹皮酚和水分的快速测定,方法简便,结果准确可靠。本法测得市售 108 批丹皮药材的水分合格率为 100%,丹皮酚合格率为 82%,其中不同产地的丹皮酚含量差异高达 10 倍左右,这可能与药材生长环境的气候土壤因子的差异性有关。

[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,2010:160.
- [2] 张健萍,李连珍,赵红江,等. 牡丹皮的化学成分、药理作用及临床应用研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2006,21(5):295-297.
- [3] 胡云飞,徐国兵. 牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展[J]. 安徽医药,2014,18(4):589-592.
- [4] 孙言才,沈玉先,孙国平. 丹皮酚的主要药理活性研究进展[J]. 中成药,2004,26(7):579-582.
- [5] 李向阳,屠万情,张留记. RP-HPLC 法测定不同产地的牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的含量[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(5):563-565.
- [6] 杨晨,方成武,韩燕全,等. HPLC 测定不同产地不同采收期牡丹皮中丹皮酚的含量[J]. 中国当代医药, 2010,17(5):5-7.
- [7] 丘志春,孙冬梅,张诚光. 不同炮制方法对牡丹皮中丹皮酚及芍药苷含量的影响[J]. 医学研究杂志, 2009,38(4):131-133.
- [8] 万楷杨,高慧敏,张启伟,等. 近红外漫反射光谱法快速测定苦参和白土苓药材的水分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):56-59.
- [9] 张雯雯,刘绍光,丛晓东,等. 近红外光谱法快速测定五加皮酒提取液特征性成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(11):61-64.
- [10] 于晓雪,乙引,周宁,等. 近红外光谱法快速测定淫羊藿中淫羊藿苷和朝藿定 C[J]. 光谱实验室,2012,29(3):1379-1383.
- [11] 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.

[责任编辑 顾雪竹]