

# 基于近红外光谱技术的黄柏药材定量分析

苏秀红<sup>1</sup>, 谢惠英<sup>1</sup>, 王丰青<sup>2</sup>, 雷敬卫<sup>1</sup>, 王丽娜<sup>1</sup>, 谢彩侠<sup>1\*</sup>

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 河南农业大学, 郑州 450002)

**[摘要]** **目的:**建立一种能够同时快速测定黄柏药材中小檗碱和黄柏碱含量的方法。**方法:**以 HPLC 所测样品中小檗碱和黄柏碱的含量为参考值,利用近红外光谱分析技术,将参考值与样品的近红外光谱进行关联,采用偏最小二乘法(PLS)建立黄柏中小檗碱和黄柏碱的定量分析模型。**结果:**所建立的小檗碱和黄柏碱的定量分析模型的内部交叉验证决定系数( $R^2$ )分别为 0.997 13,0.989 23,校正均方差(RMSEC)分别为 0.082 3,0.021 5,验证均方差(RMSEP)分别为 0.071 7,0.016 6,性能指数 PI 分别为 95.6,93.5。**结论:**利用近红外光谱技术建立的定量分析模型,能够对黄柏药材中小檗碱和黄柏碱的含量进行无损快速测定。

**[关键词]** 近红外光谱技术; 偏最小二乘法; 黄柏; 定量分析

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0087-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080087

## Quantitative Analysis of Phellodendron Bark Based on Near Infrared Spectroscopy

SU Xiu-hong<sup>1</sup>, XIE Hui-ying<sup>1</sup>, WANG Feng-qing<sup>2</sup>, LEI Jing-wei, WANG Li-na<sup>1</sup>, XIE Cai-xia<sup>1\*</sup>

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for simultaneous rapid determination of berberine content and phellodendrine content in Phellodendron Bark. **Method:** With the berberine content and phellodendrine content determined in high performance liquid chromatography (HPLC) as the reference values, near infrared spectra of the samples were associated with the reference values above, and then the quantitative analysis models of berberine and phellodendrine were established by using partial least squares (PLS) method. **Result:** The correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.997 13 and 0.989 23 respectively for quantitative analysis model of berberine and phellodendrine. The root mean square error of calibration (RMSEC) was 0.082 3 and 0.021 5 respectively. The root mean square error of predication (RMSEP) was 0.071 7 and 0.016 6 respectively. The performance index (PI) was 95.6 and 93.5 respectively. **Conclusion:** The quantitative analysis model established by using near-infrared spectroscopy is rapid and nondestructive to determine the content of berberine and phellodendrine in Phellodendron Bark.

**[Key words]** near infrared spectroscopy; PLS; Phellodendron Bark; quantitative analysis

黄柏为芸香科植物黄皮树的干燥树皮,习称“川黄柏”。其味苦、性寒,归肾、膀胱经,临床上用于治疗湿热泻痢、黄疸、带下、热淋、等<sup>[1]</sup>,主产于四川、湖北、贵州、云南等省。

2010年版《中国药典》以小檗碱和黄柏碱的含量为指标来控制黄柏药材的质量,虽然药典规定的检测方法测定结果相对准确,但前处理较为复杂,且需要消耗大量的有机试剂,费用较高,不符合中药现

**[收稿日期]** 20150511(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473299);河南中医学院科技创新人才计划项目(2012XCXRC03)

**[第一作者]** 苏秀红,博士,副教授,从事中药资源研究,Tel:15838368176,E-mail:407829505@qq.com

**[通讯作者]** \* 谢彩侠,副教授,博士,从事现代仪器分析方法在中药质量控制中应用研究,Tel:13673651577,E-mail:942478100@qq.com

代化发展的要求,因此,迫切需要建立一种高效、快速、准确、环保的绿色检测方法来评价黄柏药材的质量。近红外(NIR)光谱技术是 1980 年代后期发展起来的一种绿色分析技术,与传统分析技术相比,该技术通过对样品的一次近红外光谱简单测量,即可快速获取一个或多个样品的几种至十几种性质数据或浓度数据,具有高效、快速、廉价和绿色的优点<sup>[2]</sup>,已经被广泛应用于中药的真伪、产地、品种、厂家鉴别及指标性成分的定量分析研究<sup>[3-5]</sup>,但至今还未见有关利用近红外光谱技术同时测定黄柏药材中小檫碱及黄柏碱等多种指标性成分的含量,从而实现快速评价黄柏药材质量的报道。本试验拟采用近红外光谱分析技术结合偏最小二乘法(PLS)同时建立黄柏药材中小檫碱和黄柏碱的定量分析模型,从而为黄柏药材质量快速评价提供一种绿色、简便的分析方法。

### 1 材料

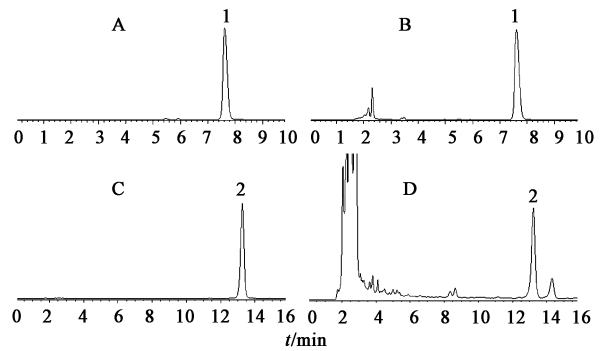
1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司), Nicolet 6700 型傅立叶变换近红外光谱仪(配有积分球漫反射采样系统, OMNIC 光谱采集软件和 TQ Analyst 8.0 分析软件, 美国 Thermo Nicolet 公司), FW-100 型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司), CPA 225D 型 1/10 万分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司), AL 204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Milli-Q Academic A10 型超纯水机(美国 Millipore 公司), 101-3AB 型电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司)。

对照品盐酸小檫碱和盐酸黄柏碱(批号 MUST-13112110, 纯度 98.95%, 批号 MUST-13021407, 纯度 99.50%, 成都曼思特生物科技有限公司), 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂为分析纯。

本试验所用样品共 100 份, 购自四川雅安、宜宾等地, 经河南中医学院董诚明教授鉴定为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* 的干燥树皮。样品粉碎后过 50 目筛, 置干燥器中, 备用。

### 2 方法与结果

**2.1 黄柏药材中小檫碱和黄柏碱的含量测定** 按照 2010 年版《中国药典》规定, 小檫碱和黄柏碱的含量测定采用 HPLC 法。结果小檫碱的含量在 2.83% ~ 8.80%, 黄柏碱的含量在 0.30% ~ 1.23%, 并将其测定结果作为参考值。黄柏中小檫碱和黄柏碱的 HPLC 色谱见图 1。



A, C. 对照品; B, D. 黄柏供试品; 1. 小檫碱; 2. 黄柏碱

图 1 黄柏供试品 HPLC

Fig. 1 HPLC of control substance and testing substance of *Phellodendron Bark*

**2.2 黄柏样品近红外光谱的采集** 取黄柏样品粉末约 5 g 放入石英样品杯中, 均匀铺平, 采用积分球漫反射, 以空气为参比采集近红外光谱图。采集条件为分辨率  $8\text{ cm}^{-1}$ , 光谱采集波段  $12\ 000 \sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$ , 扫描次数 32 次。温度  $(25 \pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ , 相对湿度 25% ~ 35%。每份样品重复采集 3 次, 求平均光谱, 100 份黄柏样品的近红外光谱叠加见图 2。

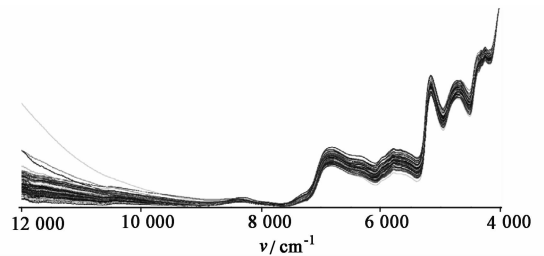


图 2 100 份黄柏样品的近红外光谱叠加

Fig. 2 Near infrared spectra of 100 batches of *Phellodendron Bark*

从图 2 中可知各批次黄柏饮片的近红外原始光谱十分接近, 难以通过原始图谱直接判定小檫碱和黄柏碱的含量与每个波长点吸光度之间的相关性进而确定小檫碱和黄柏碱的含量, 因此, 必须在一定的波段范围内通过化学计量学的方法, 从近红外光谱图中提取与小檫碱和黄柏碱含量有关的主要光谱信息, 并建立数学模型来确定近红外光谱信息和含量之间的关系<sup>[6]</sup>。

**2.3 模型的建立与预测** 应用 TQ Analyst 8.0 分析软件对黄柏样品的近红外光谱图进行处理, 采用偏最小二乘法(PLS)建立定量分析模型, 以内部交叉验证决定系数( $R^2$ )、校正均方差(RMSEC)、验证均方差(RMSEP)和性能指数(performance index, PI)作为模型性能的综合评价指标。 $R^2$  越接近 1, 参考值与近红外预测值越接近; 均方差越小, 且 RMSEP 与 RMSEC 越接近, 所建模型适用性越强、预

测效果越好<sup>[7]</sup>;性能指数以相对残差和计算,越接近 100 模型性能越好。

**2.3.1 校正集和验证集样本的选择** 根据样品中小檗碱和黄柏碱的含量分布情况,采用 SPXY 法<sup>[8]</sup>选择 80 个样本作为校正集样本,其余 20 个为验证集样本。校正集与验证集样本小檗碱和黄柏碱含量分布范围见表 1。

表 1 校正集与验证集样本含量分布范围

样本集	样本数	小檗碱	黄柏碱
校正集	80	2.83 ~ 8.80	0.30 ~ 1.23
验证集	20	3.98 ~ 5.89	0.42 ~ 0.80

**2.3.2 建模波段的确定** 近红外光谱的波段扫描范围是 12 000 ~ 4 000  $\text{cm}^{-1}$ ,这个波段范围内包含待测组分信息和一些冗余信息,因此,选择建模的波段应在包含大量待测组分信息的条件下,尽量避免冗余信息以降低噪声干扰,这样才能选择与小檗碱和黄柏碱含量相关的特征光谱信息,提高模型的预测效果。由

表 2 不同预处理方法对  $R^2$ , RMSEC, RMSEP 和 PI 值的影响

Table 2 Influence of different regression methods on  $R^2$ , RMSEC, RMSEP and PI

预处理方法	$R^2$		RMSEC		RMSEP		PI	
	小檗碱	黄柏碱	小檗碱	黄柏碱	小檗碱	黄柏碱	小檗碱	黄柏碱
Constant	0.994 10	0.988 98	0.118 0	0.021 7	0.201 0	0.042 4	87.7	83.5
MSC + 1D	0.998 92	0.972 40	0.050 5	0.034 2	0.122 0	0.040 3	92.5	84.3
SNV + 2D	0.998 43	0.999 47	0.060 7	0.047 8	0.187 0	0.062 2	88.6	75.8
SNV + 2D + ND	0.997 57	0.995 37	0.075 7	0.014 1	0.162 0	0.036 4	90.1	85.8
MSC + 2D + SG	0.997 11	0.989 23	0.082 6	0.021 5	0.072 7	0.016 6	95.6	93.5
SNV + 2D + SG	0.997 13	0.991 31	0.082 3	0.019 3	0.071 7	0.022 5	95.6	91.2

**2.3.4 主成分数的选择** 采用 PLS 法建立校正模型,主成分数对所建模型的预测效果有较大影响<sup>[11]</sup>,因此在建模过程中笔者以校正样品集 RMSECV 为优化参数,选择合适的主成分数,当 RMSECV 值最小时,所选主成分数最佳,经比较分析,确定了小檗碱和黄柏碱模型的最佳主成分数分别为 5 和 9,对应的 RMSECV 分别为 0.229 34 和 0.056 57,见图 3,4。

**2.3.5 定量模型的建立** 经过多次建模筛选出最优模型,模型的具体参数见表 3。按照表 3 的建模参数建立小檗碱和黄柏碱的定量分析校正模型,80 份样品交互验证得到的 NIR 预测值与参考值之间的相关见图 5,6。由图可以看出,校正集样品均匀地分布在回归线的两侧。校正集样本与预测集样本的 NIR 预测值与参考值之间的绝对偏差,见图 7,8。

图 1 可知,在 12 000 ~ 10 000  $\text{cm}^{-1}$  曲线平滑,吸光度无明显改变,10 000 ~ 4 000  $\text{cm}^{-1}$  信息量比较丰富,能反映出样品的性质和组成与光谱间的关联性,所以选择在此区间内进行建模研究。

**2.3.3 光谱预处理方法的确定** 在近红外光谱仪采集光谱时,由于温度、湿度、仪器状态、样品性质等的差异会影响模型的准确性,而通过对光谱进行预处理可以最大限度的降低其影响。本试验利用 TQ Analyst 8.0 软件,考察分析了多元信号修正 (multivariate scatter correction, MSC) 和标准正态变换 (standard normal variate, SNV) 等散射校正法、一阶导数 (1st derivative, 1D)、二阶导数 (2nd derivative, 2D), Savitzky-Golay (SG) 平滑和 Norris derivative (ND) 平滑等多种光谱数据预处理方法对所得模型的  $R^2$ , RMSEC, RMSEP 和 PI 值的影响,并确定了小檗碱和黄柏碱最佳的光谱预处理方法为 SNV + 2D + SG, MSC + 2D + SG。各种光谱预处理方法所得模型的  $R^2$ , RMSEC, RMSEP 和 PI 值见表 2。

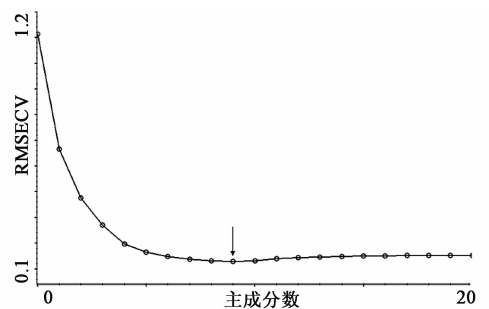


图 3 小檗碱模型的主成分数对 RMSECV 的影响

Fig. 3 Effect of main factor number of Berberine model on RMSECV

由图可以看出,小檗碱和黄柏碱的 NIR 预测值与药典法测定值之间的绝对偏差分别在  $\pm 0.2$ ,  $\pm 0.05$ , 表明预测值接近于参考值,模型的预测效果良好。

**2.3.6 定量模型的内部验证** 为检验所建数学模

表 3 最优建模参数及评价指标

Table 3 Modeling parameters and evaluation index of Berberine and Phellodendrine

组别	建模参数			评价指标				
	光谱预处理方法	光谱范围/cm <sup>-1</sup>	主成分数	RMSECV	R <sup>2</sup>	RMSEC	RMSEP	PI
小檗碱	SNV + 2D + SG	7 494 ~ 4 007	9	0.229 34	0.997 13	0.082 3	0.071 7	95.6
黄柏碱	MSC + 2D + SG	10 024 ~ 3 999	5	0.056 57	0.989 23	0.021 5	0.016 6	93.5

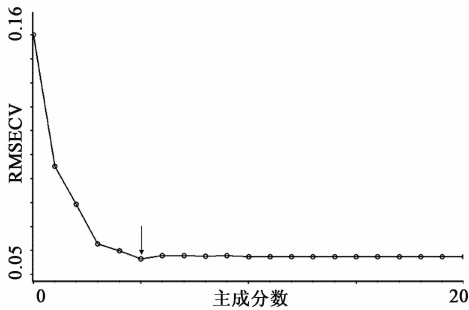


图 4 黄柏碱模型的主成分数对 RMSECV 的影响

Fig. 4 Effect of main factor number of Phellodendrine model on RMSECV

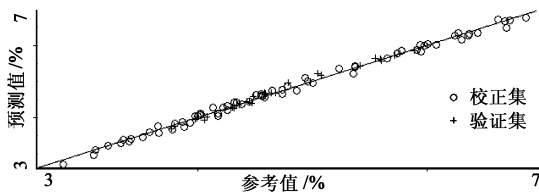


图 5 小檗碱的 NIR 预测值与参考值的相关性

Fig. 5 Correlation diagram between NIR prediction values and reference values of berberine

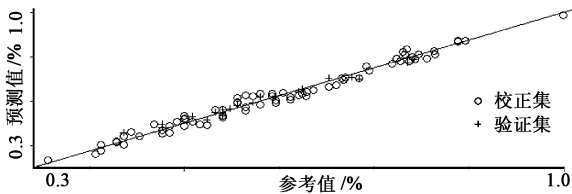


图 6 黄柏碱的 NIR 预测值与参考值的相关性

Fig. 6 Correlation diagram between NIR prediction values and reference values of phellodendrine

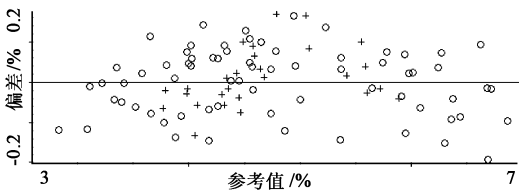


图 7 小檗碱的 NIR 预测值与参考值的偏差

Fig. 7 Deviation diagram of NIR predicted values and reference values of berberine

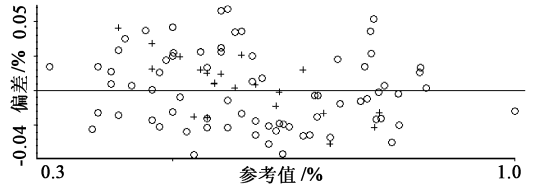


图 8 黄柏碱的 NIR 预测值与参考值的偏差

Fig. 8 Deviation diagram of NIR predicted values and reference values of phellodendrine

《中国药典》方法测得值进行比较,结果见表 4,5。两个模型的最大相对偏差分别为 0.17%,0.04%,以验证集样品的 NIR 预测值与 HPLC 测定值的比值作为预测回收率<sup>[16]</sup>,所得平均回收率分别为 100.51%,100.62%,预测结果较为准确,表明,所建立的校正模型具有良好的预测能力。

表 4 小檗碱 NIR 预测值与参考值的比较

Table 4 Comparison of berberine between NIR predicted values and reference values

No.	参考值	NIR 预测值	相对偏差	平均回收率
1	4.68	4.69	0.01	100.51
2	4.79	4.96	0.17	
3	4.34	4.35	0.01	
4	5.55	5.65	0.10	
5	5.08	5.16	0.08	
6	5.42	5.44	0.02	
7	5.59	5.63	0.04	
8	5.89	5.85	0.04	
9	5.05	5.21	0.16	
10	4.58	4.67	0.09	
11	4.59	4.66	0.07	
12	4.49	4.59	0.10	
13	4.47	4.39	0.08	
14	4.64	4.67	0.03	
15	3.98	3.95	0.03	
16	4.36	4.34	0.02	
17	4.32	4.26	0.06	
18	4.08	4.02	0.06	
19	3.99	3.97	0.02	
20	4.30	4.27	0.03	

表 5 黄柏碱 NIR 预测值与参考值的比较

Table 5 Comparison of phellodendrine between NIR predicted values and reference values %

No.	参考值	NIR 预测值	相对偏差	平均回收率
1	0.79	0.77	0.02	
2	0.80	0.79	0.01	
3	0.66	0.65	0.01	
4	0.72	0.71	0.01	
5	0.73	0.70	0.03	
6	0.56	0.56	0.00	
7	0.59	0.59	0.00	
8	0.60	0.62	0.02	
9	0.69	0.70	0.01	
10	0.65	0.64	0.01	
11	0.54	0.55	0.01	100.62
12	0.53	0.51	0.02	
13	0.47	0.48	0.01	
14	0.51	0.53	0.02	
15	0.56	0.56	0.00	
16	0.57	0.58	0.01	
17	0.42	0.46	0.04	
18	0.55	0.53	0.02	
19	0.47	0.50	0.03	
20	0.55	0.56	0.01	

### 3 结论

本试验利用 Nicolet 6700 型傅立叶变换近红外光谱仪采集黄柏的近红外漫反射光谱,并结合 HPLC 分析技术,采用 PLS 建立其小檗碱和黄柏碱指标性成分的定量分析校正模型。分析结果表明,NIR 预测值与参考值的相关系数( $R^2$ )分别为 0.997 13,0.989 23,结果准确,符合生产中检测的要求。该法与常规检测方法相比,具有快速、简便、无损、无污染的优点,是一种适合于快速评价黄柏药材质量的绿色分析方法,具有一定的实用性。

#### [参考文献]

[ 1 ] 胡俊青,胡晓. 黄柏化学成分和药理作用的现代研究[J]. 当代医学,2009,15(7):139-141.  
[ 2 ] 马冬红,王锡昌,刘利平,等. 近红外光谱技术在食品

产地溯源中的研究进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2011,31(4):877-881.  
[ 3 ] 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.  
[ 4 ] 李季静. 近红外光谱分析技术在药学领域的应用[J]. 首都医药,2010,17(4):15-16.  
[ 5 ] 张延莹,张金巍,张培,等. 近红外光谱技术在丹酚酸 B 纯化在线质控中的应用研究[J]. 时珍国医国药, 2010,21(1):220-222.  
[ 6 ] 黄倩倩,潘瑞乐,魏建和,等. 近红外漫反射光谱法测定黄芩中总黄酮及黄芩苷的含量[J]. 光谱学与光谱分析,2009,29(9):2425-2428.  
[ 7 ] 白雁,段小彦,雷敬卫,等. 近红外漫反射光谱法在青翘含量测定中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(23):111-114.  
[ 8 ] 徐冰,罗赣,林兆洲,等. 基于过程分析技术和设计空间的金银花醇沉加醇过程终点检测[J]. 高等学校化学学报,2013,34(10):2284-2289.  
[ 9 ] 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,2000:170.  
[ 10 ] 赵娜,吴志生,袁瑞娟,等. 近红外漫反射光谱法快速测定积雪草总苷中积雪草苷的含量[J]. 世界中医药,2013,8(11):1280-1286.  
[ 11 ] 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,2005:175.  
[ 12 ] 周照艳,岳勇,王涛,等. PLS 因子数对定量模型性能稳定性的影响分析[J]. 计算机工程与设计,2014,35(5):1788-1791.  
[ 13 ] Kohonen J, Reinikainen S P, Aaljoki K, et al. Nonlinear PLS approach in score surface[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory System,2009,97(2):159-163.  
[ 14 ] 段焰青,王家俊,杨涛,等. FT-NIR 光谱法定量分析烟草薄片中的 5 种化学成分[J]. 激光与红外,2007,37(10):1058-1061.  
[ 15 ] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 2 版. 北京:中国石化出版社,2006.  
[ 16 ] 龚海燕,胡亚楠,谢彩侠,等. 近红外漫反射光谱法快速测定山茱萸水分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(23):115-118.

[责任编辑 顾雪竹]