

近红外光谱用于甘草中甘草苷、甘草酸及水分测定

王遥琼, 王维皓*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**运用近红外光谱(NIR)技术检测甘草药材中的甘草苷、甘草酸及水分。**方法:**采用积分球漫反射扫描近红外光谱,以TQ Analyst软件进行数据分析,建立甘草中甘草苷、甘草酸及水分测定的NIR。**结果:**甘草苷的预测均方根误差(RMSEP)为0.165,预测集相关系数(R_p)0.986 8;交叉验证均方根误差(RMSECV)为0.393,校正集相关系数(R_v)0.904 6。甘草酸的RMSEP = 0.166, R_p = 0.995 5; RMSECV = 0.575, R_v = 0.954 0。水分的RMSEP = 0.137, R_p = 0.995 2; RMSECV = 0.498, R_v = 0.931 9。**结论:**该方法快速、简便。可以用于甘草中甘草苷、甘草酸及水分的含量测定。

[关键词] 甘草; 近红外光谱; 甘草苷; 甘草酸; 水分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0059-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190059

Application of Near-infrared Spectrum to Quantify Licorice Glycoside, Licorice Acid and Moisture in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

WANG Yao-qiong, WANG Wei-hao*

(Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of liquiritin, licorice acid and moisture in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by using near-infrared (NIR) quantification method. **Method:** Near-infrared diffused reflected spectroscopy was applied to obtain the NIR spectra of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and the content values were analyzed by using TQ Analyst software. The NIR method was established with partial least squares (PLS). **Result:** The root-mean-square error of prediction (RMSEP) value of licorice glycosides was 0.165, with correlation coefficient R_p value 0.986 8; root-mean-squares error of cross-validation (RMSECV) value was 0.393, with correlation coefficient R_v value 0.904 6. The RMSEP value of glycyrrhizic acid was 0.166, with correlation coefficient R_p value 0.995 5; the RMSECV value was 0.575, with correlation coefficient R_v value 0.954 0. The RMSEP value of moisture was 0.137, with correlation coefficient R_p value 0.995 2; RMSECV value was 0.498, with correlation coefficient R_v 0.931 9. **Conclusion:** The established method is accurate, rapid and convenient, which could be used for the content determination of liquiritin, licorice acid and moisture in Glycyrrhizae Radix.

[Key words] Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; NIR; quantification; liquiritin; licorice acid; moisture

甘草为中药大宗药材,是豆科甘草属的植物,《中国药典》收载有甘草 *Glycyrrhiza uralensis*,光果甘草 *G. inflata* 和胀果甘草 *G. glabra* 3种,根及根茎入药。具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药^[1-2]等功效,此外它还具有抗炎、抗病

毒和保肝解毒及增强免疫功能^[3]等作用。《中国药典》一部中采用HPLC法对其甘草苷、甘草酸进行了含量研究,采用烘干法对药材的水分进行了测定^[1]。但上述方法耗时、操作不便且成本较高。而近红外光谱技术具有快速、简便、对样品无损伤、适

[收稿日期] 20150918(003)

[基金项目] 国家重点实验室培育项目(G220140107)

[第一作者] 王遥琼,在读硕士,Tel:18810915674,E-mail: m18810915674@163.com

[通讯作者] *王维皓,博士,助理研究员,从事中药化学及质量研究,Tel:010-64014411-2848,E-mail:olive_wh@126.com

于实时在线分析、可用于样品的定量和定性分析的特点^[4],已经广泛应用于农产品、食品、石油化工、烟草、制剂等领域^[5-9]。近红外光谱主要是由于分子振动的非谐性使分子振动从基态向高能级跃迁时产生的,主要反映的是 C-H, O-H, N-H, S-H, P-H 等含氢基团振动的倍频及合频吸收,含有丰富的化学信息。通过对光谱特征的解析或是数学运算,可以获得受试物的结构及成分组成信息,非常适合复杂体系的快速分析。其采集方式可以是透射、反射、漫反射。分析的样品可以是固、液、气任何一种形态^[10]。本研究建立了近红外光谱法用于甘草苷、甘草酸的含量测定及甘草中的水分测定,结果表明该方法的测定结果准确、快速,是《中国药典》方法的有益补充。

1 材料

1.1 仪器 BXZ Series II 型红外线干燥箱(北京兴争仪器设备厂),1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),Antaris 型近红外扫描仪(美国 Thermo Scientific),XS105 型 1/10 万分析天平(梅特勒)。

1.2 试剂 对照品甘草酸(批号 110731-200615),甘草苷(批号 111610-201005)均购自中国食品药品检定研究院。甘草药材收集于 15 个产地共 100 份样品,经中国中医科学院资源中心袁媛副研究员鉴定符合 2015 年版《中国药典》要求。

2 方法与结果

2.1 水分的测定^[1] 参照 2015 年版《中国药典》附录水分测定第一法(烘干法)操作进行。

2.2 HPLC 测定甘草苷与甘草酸含量^[1] 参照 2015 年版《中国药典》甘草项下。取药材粉末(过三号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 100 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 70% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,备用。色谱条件为采用 Alltech 反相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 8 min, 19% A; 8 ~ 35 min, 19% ~ 50% A; 35 ~ 36 min, 50% ~ 100% A; 36 ~ 40 min, 100% ~ 19% A; 40 ~ 46 min, 100% A),进样量 10 μL,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 237 nm,柱温 35 °C。

2.3 近红外(NIR)光谱的采集 将收集的甘草样品 100 份,粉碎过 80 目筛。取约 10 g,混合均匀后装入石英样品杯中,摊平。以空气作参比,扣除背

景,采集光谱图。采样方式积分球漫反射法,采集区域 4 000 ~ 10 000 cm⁻¹;分辨率 32.0 cm⁻¹,扫描次数 64 次,增益 2X,温度 25 °C。每份样品扫描 1 次作为样品 NIR 光谱。扫描结果见图 1。

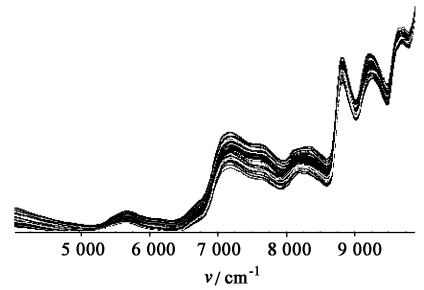


图 1 100 个批次的样品近红外光谱

Fig. 1 Near-infrared spectra of one hundred batches of samples

2.4 NIR 光谱数据处理及含量测定 采用 TQ Analyst 软件进行数据处理。采用偏最小二乘法(partial least squares, PLS)对数据进行划分。水分:选择了 62 个样品进行试验,剔除 4 个极端值后将剩余样品中的 43 个选为校正集,15 个作为检验集进行建模。甘草苷:100 个样品中剔除 5 个极端值后将剩余样品中的 64 个选为校正集,31 个选为验证集进行建模。甘草酸:100 个样品中剔除 6 个极端值后将剩余样品中的 70 个选为校正集,24 个选为验证集进行建模。使用多元信号修正(multiplicative signal correction, MSC)或标准归一化变换(standard normal variate, SNV)来消除样品粒度、均匀性以及光的散射等影响。以预测均方根误差(RMSEP),预测集相关系数(Rp);交叉验证均方根误差(RMSECV),校正集相关系数(Rv)为指标,筛选合理的光谱预处理方法及最佳光谱区间。光谱预处理方法有^[11]一阶导数(first derivative, FD),二阶导数(second derivative, SD),标准正态变量变换(standard normal variate transform, SNV),平滑滤波(Savitzky-Golay Filter, SG),小波变换(wavelet transform, WT)。经参数筛选与优化确定了水分、甘草苷、甘草酸的含量测定参数均为 SNV,一阶导数并结合 SG55(SG5 点平滑处理)。其中水分的光谱区间为 4 430 ~ 7 980 cm⁻¹,甘草苷的光谱区间为 4 250 ~ 9 680 cm⁻¹,甘草酸的光谱区间为 4 410 ~ 9 700 cm⁻¹。水分、甘草苷、甘草酸分别选择 14, 7, 8 个主因子数建立 PLS 模型,三者的因子数筛选见图 2 ~ 4。水分、甘草苷及甘草酸的预测值与参考值的相关性见图 5 ~ 7。参数筛选过程见表 1, 2。

表 1 不同光谱预处理方法对甘草水分 PLS 模型参数的影响

Table 1 Optimization of different spectra pretreatment method for water determination of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

预处理方法	RMSEP	R _p	RMSECV	R _v
无处理	0.259	0.794 1	0.546	0.449 1
MSC	0.250	0.814 0	0.494	0.553 1
SNV	0.242	0.827 7	0.499	0.541 6
SNV + 一阶导数	0.075	0.987 2	0.288	0.867 7
SNV + 二阶导数	0.195	0.899 8	0.426	0.697 9
SNV + 一阶导数 + SG55	0.072	0.988 6	0.289	0.867 5
SNV + 一阶导数 + ND55	0.228	0.868 0	0.437	0.702 9
MSC + 一阶导数 + SG55	0.074	0.988 1	0.289	0.867 3

注:MSC. 多元信号修正;SNV. 标准归一化变换;SG55. SG5 点平滑处理;ND55. 平滑处理(表 2 同)。

表 2 不同光谱预处理方法对甘草苷、甘草酸 PLS 模型参数的影响

Table 2 Optimization of different spectra pretreatment method for liquiritin, glycyrrhizic acid determination

预处理方法	甘草苷				甘草酸			
	RMSEP	R _p	RMSECV	R _v	RMSEP	R _p	RMSECV	R _v
无处理	0.456	0.851 1	0.596	0.769 1	0.423	0.972 7	0.790	0.911 5
MSC	0.296	0.934 8	0.440	0.879 5	0.682	0.926 3	0.874	0.889 0
SNV	0.303	0.930 3	0.440	0.879 5	0.683	0.926 0	0.874	0.889 0
MSC + 一阶导数	0.159	0.987 5	0.430	0.885 4	0.178	0.994 9	0.578	0.953 6
MSC + 二阶导数	0.267	0.974 4	0.369	0.916 8	0.339	0.982 2	0.578	0.953 6
MSC + 一阶导数 + SG55	0.166	0.987 0	0.395	0.903 9	0.167	0.995 5	0.577	0.953 7
MSC + 一阶导数 + ND55	0.233	0.963 1	0.445	0.876 6	0.343	0.982 8	0.662	0.938 1
SNV + 一阶导数 + SG55	0.165	0.986 8	0.393	0.904 6	0.166	0.995 5	0.575	0.954 0

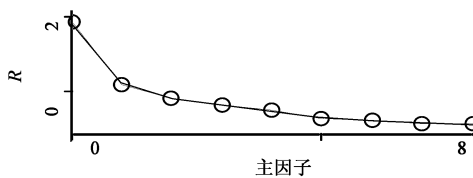


图 4 甘草酸因子筛选

Fig. 4 Factor diagram for glycyrrhizic acid detection

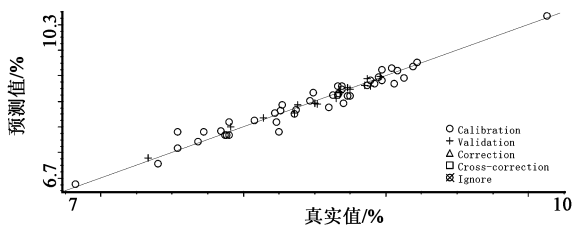


图 5 甘草水分含量预测值与参考值之间的相关性分析

Fig. 5 Correlation diagram between predicted values and reference value of moisture contents

3 讨论

在使用积分球漫反射进行近红外波谱扫描时,药

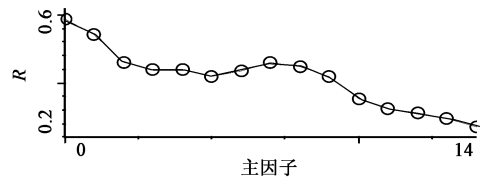


图 2 水分因子筛选

Fig. 2 Factor diagram for moisture detection

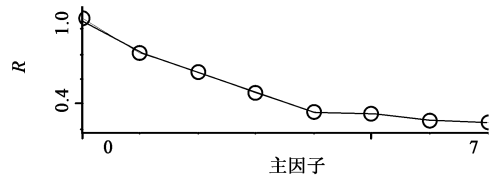


图 3 甘草苷因子筛选

Fig. 3 Factor diagram for liquiritin detection

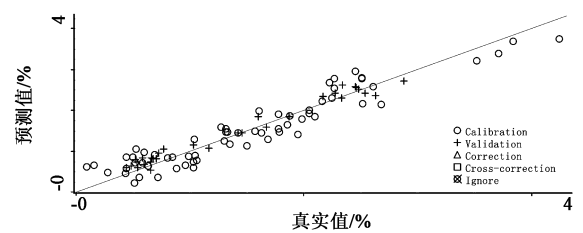


图 6 甘草苷含量预测值与参考值之间的相关

Fig. 6 Correlation diagram between predicted values and reference value of liquiritin contents

材的粉碎粒度对谱图的重复性存在影响。本文最初曾采用过 40 目筛的药材进行谱图采集,发现同一份样品,2 次扫描的图谱重复性较差。后经试验确定以过 80 目的药材进行了近红外谱图扫描,所得图谱的重复性良好。由此提示,药材的粒度,以及由此产生的待测物均匀程度对光谱的扫描效果存在显著影响。

将预测值与参考值相差较大的数据(极端值)剔除更有利于模型的建立;此外验证集的选择对模

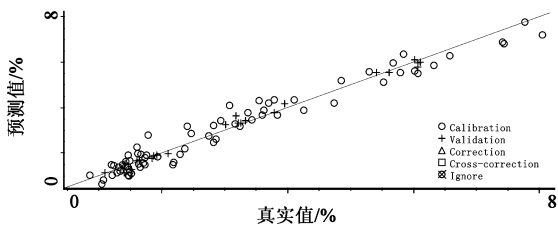


图 7 甘草酸含量预测值与参考值之间的相关

Fig. 7 Correlagram between predicted values and reference value of glycyrrhizic acid contents

型的好坏影响较大,验证集选择不当会使模型中原有信息错失,导致模型误差较大、相关系数较小或者模型的代表性较差。

因子数的选择对验证集的结果影响较大。选择 PLS 方法进行数据处理时,因子数较小会造成光谱模型误差较大,模型不适宜应用;因子数过多时,可能造成模型的过度拟合,即无法适用于预测检验样品。

[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,2015:80,197.

[2] 杨柏灿,潘颖宜. 甘草“调和”的影响因素探析[J]. 中成药,2013,35(1):154-156.

[3] 曾超珍,刘志祥,吴耀辉,等. 超声波提取甘草黄酮及其抑菌活性研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(10):2402-2403.

[4] 姜爽,杨海龙,臧恒昌. 近红外光谱分析技术在中药生产过程质量控制领域的应用[J]. 食品与药品,2013,15(2):135-138.

[5] Nicolaia B M, Beullens K, Bobelyn E, et al. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review [J]. Postharvest Biol Technol, 2007, 46(2): 99-118.

[6] Cen H Y, He Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality [J]. Trends Food Sci Tech, 2007, 18(2): 72-83.

[7] Balabin R M, Syunyaev R Z. Petroleum resins adsorption onto quartz sand; near infrared (NIR) spectroscopy study [J]. J Colloid Interface Sci, 2008, 318(2): 167-174.

[8] He Z H, Lian W L, Wu M J, et al. Determination of tobacco constituents with acousto-optic tunable filter-near infrared spectroscopy [J]. J Near Infrared Spec, 2006,14(1):45-50.

[9] 谢慧军,甘勇,陈庆华. 近红外光谱分析技术在制剂领域中的应用[J]. 中国药学杂志,2009,44(2):87-91.

[10] 刘建学. 实用近红外光谱分析技术[M]. 北京:科学出版社,2008.

[11] 张彦周,闵顺耕,刘霞. 近红外光谱技术在中草药分析中的应用[J]. 光谱学与光谱分析,2008,28(7):1549-1552.

[责任编辑 顾雪竹]