

近红外光谱技术快速测定醋香附中 α -香附酮的含量

曹庆玺, 贾灿潮, 黄柳芳, 刘喜乐, 王东*
(广东药科大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:醋香附的含量测定采用挥发油测定法,检测耗时长、操作复杂,且未规定具体有效成分及其含量评价指标。为解决此问题,探索采用先进的检测技术测定醋香附中具体有效成分的含量,结合近红外光谱技术,建立快速、准确的定量分析模型。**方法:**采用 HPLC 检测 α -香附酮的含量,流动相甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,30%~73% A;10~40 min,73%~76% A;40~50 min,76%~30% A),检测波长 252 nm;采用近红外光谱仪采集醋香附的近红外光谱图,以醋香附中 α -香附酮的 HPLC 测量值为参考,建立偏最小二乘法(PLS)定量分析模型。**结果:**建立了 α -香附酮定量模型,模型的内部交叉验证系数(R^2),校正均方差(RMSEC),预测均方差(RMSEP)分别为 0.987 5,0.006 2,0.007 2,交叉验证均方差(RMSECV)为 0.020 4,经验证模型平均回收率 101.33%。**结论:**该方法检测速度快、预测结果准确,可用于快速测定醋香附中 α -香附酮的含量。

[关键词] 近红外光谱技术;醋香附; α -香附酮;定量模型;偏最小二乘法;预测均方差;一阶导数

[中图分类号] R22;R283;R943.1;R284;O433 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0027-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180704

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180110.1629.009.html>

[网络出版时间] 2018-01-11 15:59

Rapid Determination of α -Cyperone in Cyperi Rhizoma Stir-fried with Vinegar by Near-infrared Spectroscopy

CAO Qing-xi, JIA Can-chao, HUANG Liu-fang, LIU Xi-le, WANG Dong*

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** Distillation method was employed to determine content of Cyperi Rhizoma stir-fried with vinegar, which had features of wasting time, complex operation, without specific effective component content index in the quality standard. In order to solve these problems, this study was to explore the method for determination of specific active ingredients in Cyperi Rhizoma stir-fried with vinegar by advanced detection technology, combined with near-infrared spectroscopy, to establish a rapid and accurate quantitative analysis model. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of α -cyperone with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid for gradient elution and detection wavelength at 252 nm. The near infrared spectra of Cyperi Rhizoma stir-fried with vinegar were collected by near-infrared spectrometer. Taking HPLC measured value as a reference, partial least squares (PLS) was used to establish the quantitative model of α -cyperone. **Result:** The quantitative model of α -cyperone was established, the correlation coefficient of calibration (R^2), root-mean-square error of calibration (RMSEC) and root-mean-square error of prediction (RMSEP) of the calibration model were 0.987 5, 0.006 2 and 0.007 2; the root-mean-square error of cross-validation (RMSECV) of the calibration model was 0.020 4, the average recovery was 101.33%. **Conclusion:** The method has fast detection speed and accurate prediction results, it can be applied to quickly determine the content of α -cyperone in Cyperi Rhizoma

[收稿日期] 20170822(024)

[第一作者] 曹庆玺, 硕士, 从事中药质量控制与评价研究, Tel:020-39352181, E-mail: caoqingxi_0223@163.com

[通信作者] * 王东, 硕士, 副教授, 从事中药质量分析研究, Tel:020-39352181, E-mail: jsgwdx@126.com

stir-fried with vinegar.

[**Key words**] near-infrared spectroscopy; *Cyperi Rhizoma* stir-fried with vinegar; α -cyperone; quantitative model; partial least squares; root-mean-square error of prediction; first-order derivative

近红外光谱技术是一种近年来新发展的分析技术^[1-2],主要通过分析化合物中 X-H(X=C, O, N 等)伸缩振动的倍频、合频吸收,结合化学计量学^[3]实现对未知样品的定性鉴别与定量分析,该技术只需对样品进行简单处理,通过模型即可预测结果,具有快速、准确的特点,目前已经被广泛应用在食品、药品、石油等领域的质量检测中^[4-9]。本课题组已将该技术应用于广陈皮、广藿香、广金钱草、高良姜、巴戟天、何首乌、夏枯草^[10-16]等中药的定性定量鉴别中。

在 2015 年版《中国药典》^[17]中,醋香附的质量标准以 α -香附酮作为对照品进行薄层定性鉴别,含量测定中只规定了采用挥发油测定法,未规定具体有效成分及其含量,无法系统准确地评价醋香附的质量。常规的质量评价方法过程繁琐、耗时长。本实验拟通过 HPLC 测定醋香附中 α -香附酮的含量,结合近红外光谱技术,运用 TQ Analyst 8.0 软件挖掘光谱信息与指标成分含量之间的相关性,建立了 α -香附酮定量分析模型,利用该模型可快速预测醋香附中 α -香附酮的含量,为完善该炮制品的质量标准提供了一定的研究基础。

1 材料

6700 型近红外光谱仪(配有积分球附件, Nicolet Omnic 光谱采集软件与 TQ Analyst 8.0 软件,美国 Thermo 公司),2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),LK-400 型高速中药粉碎机(浙江创力电子股份有限公司),BIY211b 型和 AY120 型电子天平(日本岛津公司)。醋香附饮片购买于广东大参林连锁药店有限公司、同仁堂等药店,共 101 批,经广东药科大学中药学院姬生国教授鉴定为莎草科植物香附 *Cyperus rotundus* 干燥根的炮制品,样品粉碎过四号筛,保存至干燥器内; α -香附酮对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号 T0630091,纯度 $\geq 98\%$),水为超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 α -香附酮含量的测定^[18]

2.1.1 样品溶液的制备 取醋香附粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)

30 min,冷却,称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,备用。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 α -香附酮对照品 14.0 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成每 1 mL 含 α -香附酮 0.14 mg 的对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,30%~73% A;10~40 min,73%~76% A;40~50 min,76%~30% A),检测波长 252 nm,进样量 10 μ L,柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 1 mL \cdot min⁻¹。以保留时间定性,峰面积定量,外标法计算指标成分的含量。

2.1.4 标准曲线的建立 精密吸取 α -香附酮对照品溶液 1.0,1.0,3.0,5.0,2.0,3.0,1.0 mL,分别置于 1,2,10,20,10,20,20 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀。取各质量浓度的对照品溶液适量,按 2.1.3 项下色谱条件测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 4.30 \times 10^7 X - 116\ 540$ ($r = 0.999\ 9$),线性范围 0.007~0.140 g \cdot L⁻¹。

2.1.5 精密度考察 取 α -香附酮对照品溶液适量,按 2.1.3 项下色谱条件重复进样 6 次,结果 α -香附酮峰面积的 RSD 0.5%,说明仪器精密度良好。

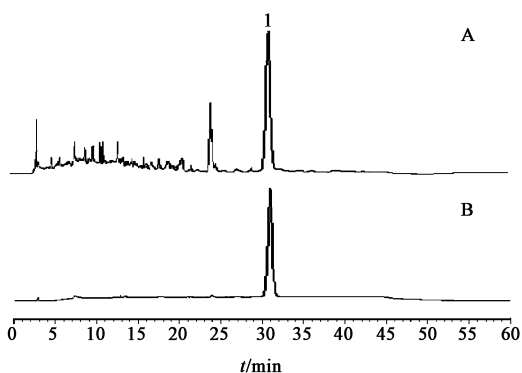
2.1.6 稳定性考察 精密称取同 1 份醋香附供试品溶液,分别在制备后 0,2,4,8,12,24 h 按 2.1.3 项下色谱条件测定,结果 α -香附酮峰面积的 RSD 0.8%,说明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性考察 精密称取同一批醋香附样品 6 份,按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,计算 α -香附酮平均质量分数 1.629 1 mg \cdot g⁻¹,RSD 1.8%,说明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率考察 精密称取 6 份已知指标成分含量的醋香附样品(样品中 α -香附酮质量分数 1.629 1 mg \cdot g⁻¹),每份 0.5 g,分别加入 α -香附酮对照品 0.80 mg,按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,计算 α -香附酮平均加样回收率 96.45%,RSD 1.2%。

2.1.9 样品测定 精密称取醋香附样品 1.0 g,按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定见图 1 和表 1。结果发现 101 批醋香附

样品中 α -香附酮的质量分数处于 0.033% ~ 0.181%。根据 α -香附酮的含量分布,选取 79 批有代表性的样品组成校正集,剩余 22 批样品为预测集,统计结果见表 2。



A. 供试品; B. 对照品; 1. α -香附酮

图 1 醋香附的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Cyperi Rhizoma stir-fried with vinegar

2.2 醋香附近红外光谱信息的采集 取醋香附粉末约 4.0 g, 装入石英杯, 混匀, 按以下条件进行扫描, 采集光谱图。测样方式为积分球漫反射, 分辨率设定 8 cm^{-1} , 扫描数 64 次, 扫描范围处于 $12\ 000 \sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$, 温度 $25 \sim 30\text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度 25% ~ 35%。每个样品重复扫描 3 次, 计算平均光谱, 101 批醋香附的近红外平均光谱叠加图见图 2。

2.3 醋香附近红外光谱信息与指标成分含量建模

以一部分样品为校正集, 另一部分样品为验证集。运用化学计量学方法将校正集的近红外光谱信息与相关数据关联, 通过优化校正集内部交叉验证相关系数 (R^2), 校正均方差 (root mean square error of calibration, RMSEC), 预测均方差 (root mean square error of prediction, RMSEP), 寻求光谱信息与含量数据的最优关系, 即可建立相关成分的近红外光谱分析模型, 将验证集样品代入所建立的模型进行验证, 即可进一步评价和优化模型。在评价光谱信息与指标成分含量数据最优关系的指标中, R^2 越接近 1, RMSEC 和 RMSEP 越小, 表明光谱信息与指标成分含量数据的关系越好, 所建立的模型结构越合理, 预测能力越强。

2.3.1 光谱预处理方法的选择 将醋香附光谱信息与指标成分含量数据导入 TQ Analyst 8.0 软件, 结合化学计量学对扫描得到的原始吸收光谱进行光谱预处理。常用的光谱预处理方法有导数处理 (一阶导数、二阶导数), 平滑 (S-G 平滑), 多元散射校正法 [多元信号修正 (MSC), 标准正则变换 (SNV)]

表 1 各批醋香附样品中 α -香附酮的质量分数

Table 1 Content of α -cyperone in each batch of Cyperi Rhizoma stir-fried with vinegar

批号	α -香附酮 质量分数	批号	α -香附酮 质量分数	批号	α -香附酮 质量分数
1	0.053	35	0.140	69	0.083
2	0.049	36	0.050	70	0.080
3	0.056	37	0.126	71	0.074
4	0.033	38	0.126	72	0.070
5	0.044	39	0.060	73	0.046
6	0.043	40	0.175	74	0.044
7	0.054	41	0.181	75	0.047
8	0.082	42	0.056	76	0.044
9	0.071	43	0.050	77	0.045
10	0.142	44	0.045	78	0.056
11	0.042	45	0.048	79	0.054
12	0.073	46	0.044	80	0.072
13	0.081	47	0.046	81	0.087
14	0.036	48	0.045	82	0.082
15	0.074	49	0.043	83	0.122
16	0.145	50	0.043	84	0.038
17	0.127	51	0.043	85	0.069
18	0.107	52	0.069	86	0.080
19	0.094	53	0.071	87	0.090
20	0.043	54	0.076	88	0.149
21	0.120	55	0.083	89	0.124
22	0.059	56	0.072	90	0.058
23	0.057	57	0.047	91	0.047
24	0.077	58	0.048	92	0.054
25	0.074	59	0.054	93	0.052
26	0.085	60	0.051	94	0.045
27	0.178	61	0.132	95	0.043
28	0.177	62	0.135	96	0.043
29	0.069	63	0.130	97	0.044
30	0.069	64	0.130	98	0.076
31	0.130	65	0.124	99	0.050
32	0.043	66	0.137	100	0.076
33	0.047	67	0.129	101	0.042
34	0.088	68	0.081		

等。使用不同方法处理后模型的 R^2 和 RMSEP/RMSEC 的比较结果见表 3。经比较得一阶导数时, $R^2 = 0.9875$, 最接近 1, 且 RMSEC 和 RMSEP 最小, 故采用一阶导数对图谱进行处理。

表 2 101 批醋香附样品中 α -香附酮含量的统计分析

Table 2 Statistical analysis of content of α -cyperone in 101 batches of *Cyperi Rhizoma stir-fried with vinegar*

样本集	样品数/批	质量分数/%		
		最小值	最大值	平均值
校正集	79	0.033	0.181	0.079
预测集	22	0.038	0.149	0.070

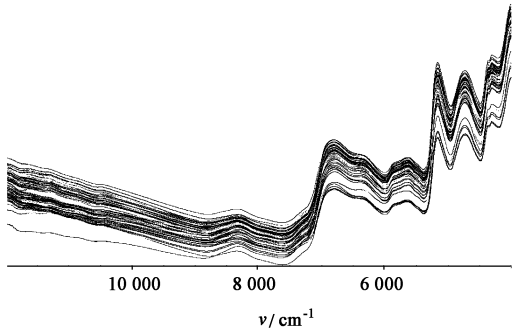


图 2 101 批醋香附样品的近红外平均光谱

Fig. 2 Near-infrared average spectra of 101 batches of *Cyperi Rhizoma stir-fried with vinegar*

表 3 不同光谱预处理方法的选择

Table 3 Selection of different spectral pretreatment methods

光谱预处理方法	R^2	RMSEP/RMSEC
原始图谱	0.967 0	0.17
SNV	0.974 9	2.00
MSC	0.975 4	1.92
一阶导数	0.987 5	1.16
二阶导数	0.271 1	8.27
SNV + 一阶导数	0.980 7	0.96
SNV + 二阶导数	0.190 1	0.83
MSC + 一阶导数	0.980 6	0.93
MSC + 二阶导数	0.188 8	0.83

2.3.2 波段的选择 根据 α -香附酮特征红外吸收基团的特点,结合 TQ Analyst 8.0 软件推荐建模波段,经对比选择和优化,确定最佳波段范围 5 230 ~ 5 130,6 301 ~ 5 500,8 700 ~ 8 200 cm^{-1} ,见表 4。

2.3.3 最佳主因子数的选择 主因子数是样品近红外光谱信息与指标成分含量数据之间关系的重要权衡参数,选取的主因子数过大,会包含过多的噪音,近红外光谱信息与指标成分含量数据之间的关系显示过拟合现象,预测误差增加;选取的主因子数过小,由于有效信息的缺失,近红外光谱信息与指标成分含量数据之间关系显示欠拟合,预测能力下降。在选择最佳主因子数时,以交叉验证均方差

表 4 不同波段对样品近红外光谱信息与指标成分含量数据关系的影响

Table 4 Effect of different spectral ranges on relationship between near-infrared spectral information and content of index ingredient data

建模区间 $/\text{cm}^{-1}$	R^2	RMSEC	RMSEP	RMSEP /RMSEC
4 000 ~ 12 000	0.792 8	0.023 8	0.028 0	1.18
5 230 ~ 5 130	0.287 7	0.037 4	0.032 0	0.86
6 301 ~ 5 500	0.996 9	0.003 1	0.015 6	5.03
8 700 ~ 8 200	0.606 4	0.031 0	0.025 7	0.83
5 230 ~ 5 130,6 301 ~ 5 500	0.986 0	0.006 5	0.011 8	1.82
5 230 ~ 5 130,8 700 ~ 8 200	0.723 6	0.026 9	0.023 1	0.86
6 301 ~ 5 500,8 700 ~ 8 200	0.974 8	0.008 7	0.008 1	0.93
5 230 ~ 5 130,6 301 ~ 5 500, 8 700 ~ 8 200	0.987 5	0.006 2	0.007 2	1.16

(RMSECV) 最小作为选取标准,选取不同主因子数对 RMSECV 的影响见图 3。结果显示当主因子数为 9 时, RMSECV 最小(0.020 4),近红外光谱信息与指标成分含量数据之间的关系最优。

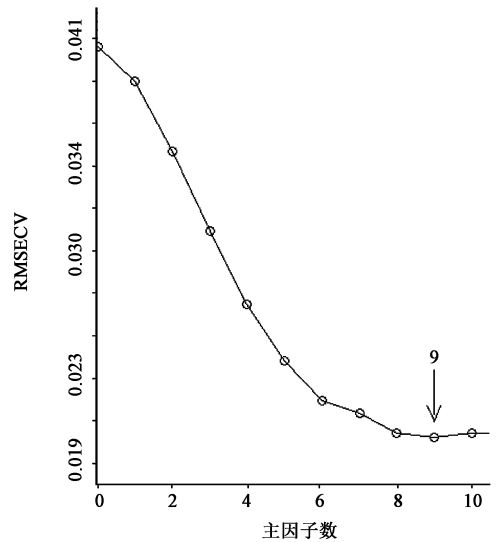


图 3 RMSECV 随主因子数的变化情况

Fig. 3 Variations of RMSECV value with principal factor number

2.4 模型的建立 运用 TQ Analyst 8.0 软件中的偏最小二乘法(PLS),选择 79 批作为校正集样品,22 批作为验证集样品,所建立模型近红外预测值与 α -香附酮参考值的相关性分析见图 4。结果发现近红外预测值与 α -香附酮含量有较好的相关性。

2.5 模型的外部验证 通过模型的外部验证对模型的预测效果进行评价,外部验证将 22 批验证集样品的近红外图谱输入模型,见表 5。结果发现 22 批

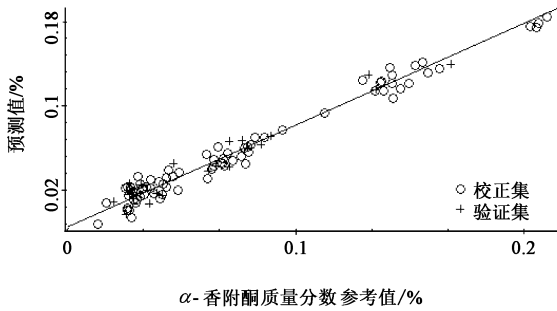


图 4 近红外预测值与 α -香附酮参考值的相关性
Fig. 4 Correlation between NIR predictive values and reference values of α -cyperone

验证集样品的近红外模型预测值与 HPLC 参考值比较接近,以预测值与参考值的比值作为预测回收率,22 批验证集样品的平均回收率 101.33%,说明模型具有较好的预测能力。

表 5 22 批醋香附验证集样品的近红外模型预测值
Table 5 Predictive values of near-infrared model of 22 batches of validation set samples

批号	参考值	预测值	绝对偏差
8	0.082	0.082	0
34	0.087	0.084	-0.003
56	0.072	0.068	-0.004
83	0.122	0.135	0.013
84	0.038	0.042	0.004
85	0.069	0.064	-0.005
86	0.080	0.087	0.007
87	0.090	0.090	0
88	0.149	0.143	-0.006
89	0.124	0.125	0.001
90	0.058	0.070	0.012
91	0.047	0.054	0.007
92	0.054	0.047	-0.007
93	0.052	0.048	-0.004
94	0.045	0.044	-0.001
95	0.043	0.055	0.012
96	0.043	0.047	0.004
97	0.044	0.049	0.005
98	0.076	0.086	0.010
99	0.050	0.040	-0.010
100	0.076	0.067	-0.009
101	0.042	0.032	-0.010

3 讨论

本研究通过 HPLC 建立了 α -香附酮的快速检测方法,经方法学验证,该方法稳定可靠;根据此方法检测得到 101 批醋香附中 α -香附酮的含量数据,通过近红外光谱仪得到上述 101 批醋香附的近红外光谱图,导入 TQ Analyst 8.0 软件中,对光谱进行一阶导数预处理,采用 5 230 ~ 5 130, 6 301 ~ 5 500, 8 700 ~ 8 200 cm^{-1} 波段,选择 9 为最佳主因子数,建立醋香附近红外光谱信息与 α -香附酮含量数据之间的最优关系,得到模型 $R^2 = 0.987 5$, $\text{RMSEC} = 0.006 2$, $\text{RMSEP} = 0.007 2$, $\text{RMSECV} = 0.020 4$,经外部验证,模型平均回收率达 101.33%,具有较好的预测能力。

本研究建立了醋香附中 α -香附酮的 HPLC 检测方法,并结合近红外光谱技术,建立了快速测定醋香附中 α -香附酮的近红外定量分析模型。相比传统检测方法,应用该模型可快速、准确地评价醋香附的质量,大大节省检测分析时间。本研究建立的近红外模型可随着样品量的补充不断完善,目前阶段样品量为 101 批,模型具有一定的代表性,为了达到综合评价醋香附质量的目的,后续模型仍需增加更多的样品数据进行完善。随着近红外模型被越来越多的应用于食品、药品质量控制中,相信随着数据时代的来临及分析技术的高速发展,近红外光谱技术将会在中药质量控制领域发挥更加巨大的作用。

[参考文献]

[1] 聂黎行,戴忠,马双成,等. 近红外光谱技术结合竞争自适应重加权采样算法用于中药定量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(11):45-49.

[2] 徐广通,袁洪福,陆婉珍. 现代近红外光谱技术及应用进展[J]. 光谱学与光谱分析,2000,20(2):134-142.

[3] 魏学敏,吴倩,刘强,等. 化学计量学-光谱法在药物分析中的应用进展[J]. 药物分析杂志,2013,33(8):1447-1452.

[4] 李云,毕宇安,王振中,等. 近红外光谱技术在热毒宁注射液栀子提取液浓缩过程中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(12):1-6.

[5] 陈红英,李琼娅,陈佳乐,等. 近红外光谱技术用于正天丸混合过程终点的判断[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(12):13-16.

[6] 杨智灵,李涛,任保增. 近红外光谱技术在食品安全检测中的最新研究进展[J]. 食品与机械,2013,29(5):237-240.

- [7] 涂瑶生,柳俊,张建军. 近红外光谱技术在中药生产过程质量控制领域的应用[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17):2433-2436.
- [8] 张力培,鲁雄. 近红外光谱分析技术在食品检测中的应用[J]. 轻工科技, 2016, 32(2):103-105.
- [9] 李敏,毛丹卓,杨永健. 近红外光谱技术在药物分析领域的应用[J]. 医药导报, 2016, 35(4):374-379.
- [10] 郭念欣,李颖春,谢伟桥,等. 广陈皮与陈皮 HPLC 指纹图谱的建立与鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):90-93.
- [11] 蔡佳良,黄洁燕,李蕾蕾,等. 运用近红外光谱法建立广藿香含叶量定量分析模型[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(3):260-263.
- [12] 姬生国,郭念欣,李颖春,等. 广金钱草及其制剂的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2010, 21(27):2543-2545.
- [13] 林萍,周文婷,王海霞,等. 高良姜中高良姜素含量 NIRS 分析模型的构建[J]. 计算机与应用化学, 2014, 31(5):632-636.
- [14] 周文婷,王海霞,林萍,等. 近红外光谱法对巴戟天药材中水分含量的快速测定[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(21):5253-5255.
- [15] 贾灿潮,卢慧娟,刘喜乐,等. NIRS 法快速测定制何首乌中醇溶性浸出物的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3):554-558.
- [16] 卢慧娟,贾灿潮,黄柳芳,等. 夏枯草中迷迭香酸近红外光谱定量分析模型的建立[J]. 计算机与应用化学, 2015, 32(7):855-859.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:258.
- [18] 卢君蓉,李文兵,王世宇,等. 香附醋制前后香附烯酮、圆柚酮和 α -香附酮的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20):24-27.

[责任编辑 刘德文]