

· 资源与质量评价 ·

肉桂中 4 种成分近红外定量分析模型的建立

解育静, 张家楠, 朱冬宁, 郑克宁, 陈超*, 王淑美*

(广东药科大学 中药学院, 广东省中药质量工程技术研究中心, 国家中医药管理局中药
数字化质量评价技术重点实验室, 广州 510006)

[摘要] **目的:** 采用近红外光谱法(NIR, near infrared spectroscopy)结合高效液相色谱法(HPLC, high performance liquid chromatography)建立肉桂饮片的快速评价方法。**方法:** 收集不同产地的肉桂 86 批, 采用 HPLC 法测定不同批次肉桂饮片中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛的含量, 同时采集不同批次肉桂的 NIR 光谱。以 NIR 光谱为自变量, 以香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛的含量为因变量, 采用偏最小二乘法(PLS, partial least squares)建立肉桂中 4 种成分的定量分析模型, 并以校正集进行验证。**结果:** 肉桂饮片中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛近红外定量分析模型的相关系数(r)依次为 0.952 8, 0.977 7, 0.961 9, 0.992 2, 校正集预测误差均方根(RMSEC)依次为 0.012 2, 0.006 1, 0.004 3, 0.82 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 均方根误差(RMSECV)依次为 0.015 8, 0.011 2, 0.002 0, 1.481 1 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 测试集预测误差均方根(RMSEP)依次为 0.017 8, 0.010 3, 0.005 6, 1.63 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。**结论:** 该实验所建立的肉桂饮片中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛 4 种有效成分的近红外定量分析模型具有较好的准确性, 可用于这 4 种成分的快速同步测定, 为实现肉桂饮片质量的快速评价提供依据。

[关键词] 肉桂; 近红外; 香豆素; 肉桂醇; 肉桂酸; 肉桂醛

[中图分类号] R289;R285;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)02-0119-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192016

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190719.0933.001.html>

[网络出版时间] 2019-07-19 11:05

Establishment of Near Infrared Quantitative Analysis Model for Four Components in Cinnamomi Cortex

XIE Yu-jing, ZHANG Jia-nan¹, ZHU Dong-ning, ZHENG Ke-ning, CHEN Chao*, WANG Shu-mei*
(School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangdong Pharmaceutical University,
Guangdong Province Research Center for TCM Quality Engineering Technology, Key Laboratory of
TCM Digitalization Quality Evaluation Under State Administration of TCM, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid evaluation method for Cinnamomi Cortex decoction pieces by near infrared spectroscopy. **Method:** The contents of coumarin, cinnamalol, cinnamic acid and cinnamaldehyde in 86 batches of Cinnamomi Cortex of different origins were determined by HPLC. And the NIR spectra of different batches of Cinnamomi Cortex were also collected. With NIR spectrum as independent variable and coumarin, cinnamalol, cinnamic acid and cinnamaldehyde as dependent variables, a quantitative analysis model of four components in cinnamon was established by partial least squares method. **Result:** The correlation coefficients (r) of coumarin, cinnamic alcohol, cinnamic acid and cinnamaldehyde near infrared quantitative analysis models were 0.952 8, 0.977 7, 0.961 9, 0.992 2, root mean square error of cross (RMSEC) were 0.012 2, 0.006 1, 0.004 3, 0.82 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, root mean square error of cross-validation (RMSECV) were 0.015 8, 0.011 2, 0.002 0,

[收稿日期] 20190603(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473413, 81274060)

[第一作者] 解育静, 硕士, 从事中药质量分析与评价研究, Tel:15768991636, E-mail: 836637281@qq.com

[通信作者] *王淑美, 博士, 教授, 从事中药质量控制研究, Tel:020-39352173, E-mail: 2395903468@qq.com;

*陈超, 博士, 教授, 从事中药信息研究, Tel:020-39352181, E-mail: gdpuchencao@163.com

1.481 1 g·g⁻¹, and root mean square error of prediction (RMSEP) were 0.017 8, 0.010 3, 0.010 3, 0.005 5, 1.63 g·g⁻¹. **Conclusion:** The established NIR quantitative analysis model of four active ingredients in Cinnamomi Cortex slices has a good accuracy, and provides a basis for rapid evaluation of the quality of Cinnamomi Cortex slices.

[**Key words**] Cinnamomi Cortex; near infrared; coumarin; cinnamalol; cinnamic acid; cinnamaldehyde

肉桂其性辛、甘、热,归肾、脾、心、肝经,具有补火助阳,引火归元,散寒止痛,温通经脉的功能。现代沿用的很多传统复方、中成药中都含有肉桂,如金匮肾气丸、右归丸、桂附理中丸、滋肾通关丸,回阳救急汤等。目前许多文献研究指出肉桂具有降血糖、消炎、镇痛、抗肿瘤、抗溃疡、健胃、保护心肌等作用。肉桂对于冠心病胸痛、失眠、牙周炎和慢性胃炎都有很好的治疗效果^[1]。因此,肉桂的质量监控是确保其药效的关键因素。

挥发油是肉桂的主要有效成分,体积分数约 0.3 ~ 0.5 mL·g⁻¹,且主要以肉桂醛(cinnamylaldehyde)为主,约为 17.1% ~ 73.9%^[2],已被 2015 年版《中国药典》收录作为肉桂质量控制的主要指标性成分。挥发油中含肉桂酸,肉桂醇,香豆素,乙酸桂皮酯,乙酸苯丙酯,苯乙烯,苯甲醛,苯丙醛, β -苯丙烯醛, β -榄香烯, α -蒎烯, α -咕巴烯,石竹烯, γ -依兰油烯, α -依兰油烯等^[2]。目前使用 HPLC, GC-MS 方法对肉桂的质量控制研究较多^[2-3],但分析过程耗时耗力,不适用于工厂大批量药材的快速分析,缺乏通用性^[4-5]。

近红外是指一种介于可见光和中红外光之间,波长在 780 ~ 2 526 nm 的电磁波,是在吸收光谱中被发现非可见光区^[6]。近红外光谱技术利用化学键(C-H, O-H, N-H, S-H)的振动或转动以漫反射方式获得吸收光谱,结合化学计量学,建立光谱和待测成分间的线性或非线性模型,从而达到使用近红外光谱信息计算出待测成分的含量^[7]。相对传统分析技术而言,近红外光谱法(NIR)具有分析速度快、分析效率高、非破坏性、分析成本低、测试稳定性好等优势^[8],此外仪器操作简单,检测灵敏度高、时间短,可实现在线同步检测、多组分同时检测等特点,因此在中药研究领域得到广泛的应用^[9-14]。本实验采用近红外光谱技术,在使用 HPLC 测定肉桂中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛含量的基础上,结合偏最小二乘法(PLS)建立以上 4 种成分的快速定量分析模型,可用于肉桂中这 4 种成分的快速同步测定,为实现肉桂饮片质量的快速评价提供依据。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), TANGO 傅里叶变换近红外光谱仪[德国布鲁克(北京)科技有限公司], SQP 型 1/10 万电子天平(赛多利斯), ME104/02 型 1/1 万电子天平(梅特勒-托利多)。OPUS 软件(Bruker 公司)。

香豆素(批号 CHB151013,纯度 98.08%),肉桂醇(批号 CHB151125,纯度 98.28%),肉桂醛(批号 CHB150302,纯度 99.70%)购于成都曼思特生物科技公司;肉桂酸(批号 110786-200503,纯度 99.20%)购于中国食品药品检定研究院。乙腈(色谱级,纯度 99.9%),磷酸(色谱纯),甲醇(分析纯)。

肉桂饮片共 86 批,分别购于广东、广西、云南、江西、四川、福建等正规的中药材市场或种植地,经广东药科大学中药学院刘基柱老师鉴定,均为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的干燥树皮。见表 1。

表 1 肉桂饮片批号及产地

Table 1 Number and origin of Cinnamomi Cortex

编号	产地	编号	产地
fc1 ~ fc10	广西防城	sc1 ~ sc10	四川南充
gp1 ~ gp10	广西桂平	wz1 ~ wz9	广西梧州
hz1 ~ hz10	广西贺州	gy1 ~ gy9	广东高要
fj1 ~ fj10	福建南安	yn1 ~ yn9	云南河口
jx1 ~ jx9	江西抚州		

2 方法与结果

2.1 HPLC 分析

2.1.1 供试品溶液的制备 称取肉桂粉末(过三号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 350 W,频率 35 kHz)10 min,放置过夜,同法超声处理一次,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过即得。进样前用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤^[15]。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取香豆素、肉桂醇、肉桂酸和肉桂醛 4 种对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成香豆素的质量浓度 204.8 mg·L⁻¹,肉桂醇质量浓度 217.8 mg·L⁻¹,肉桂酸质量浓度

209 mg·L⁻¹, 肉桂醛质量浓度 199.6 mg·L⁻¹ 单对照品溶液。经稀释混合后制得质量浓度分别为香豆素 4.10 mg·L⁻¹, 肉桂醇 4.36 mg·L⁻¹, 肉桂酸 8.36 mg·L⁻¹, 肉桂醛 4.0 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

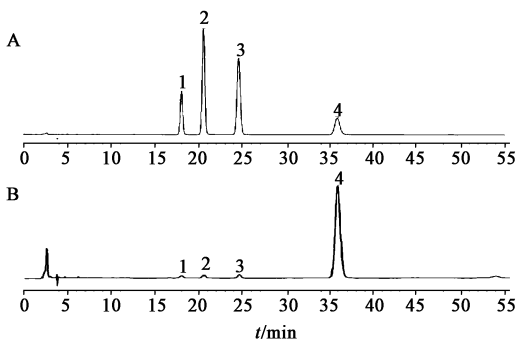
2.1.3 色谱条件 流动相乙腈-0.1% 磷酸水 (28:72); 检测波长 254 nm。流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。以肉桂醛峰计理论塔板数应不能低于 3 000。

2.2 近红外光谱采集 取样品粉末 (过 3 号筛) 适量, 装样于旋转样品杯内, 摊平, 压实, 以空气为空白参比扣除背景 (每测定一种肉桂粉末, 均要以空气为空白参比测试背景), 采集光谱图。采集方式漫反射; 扫描次数 32 次; 分辨率 8 cm⁻¹; 采集光谱区间 11 528 ~ 3 952 cm⁻¹; 每个样品采集 3 次, 取平均作为测试光谱。所采集的光谱数据通过 OPUS 软件求均值处理。

2.3 统计分析 采用化学计量学软件 OPUS 对光谱进行预处理, 采用 TQ Analyst 软件建立 PLS 校正模型。

2.4 检测与数据分析

2.4.1 HPLC 分析 按 2.1.3 项下色谱条件测定, HPLC 色谱图见图 1。



A. 混合对照品; B 肉桂样品; 1. 香豆素; 2. 肉桂醇; 3. 肉桂酸; 4. 肉桂醛

图 1 肉桂 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatography of Cinnamomi Cortex

将不同产地肉桂以 2.1.3 项下的色谱条件进行含量测定, 计算出不同产地肉桂中香豆素、肉桂醇、肉桂酸和肉桂醛的含量, 均符合 2015 年版《中国药典》项下含量要求。其平均值依次为 0.073 4%, 0.043 5%, 0.069 2%, 16.865 5%。

2.4.2 近红外光谱采集 在 2.2 项下近红外光谱测定条件下, 采集 86 批不同产地肉桂近红外光谱, 重复测定 3 次, 平均光谱见图 2。由图 2 可见, 不同

产地肉桂的近红外光谱基本一致, 但产地之间存在一定的差异。

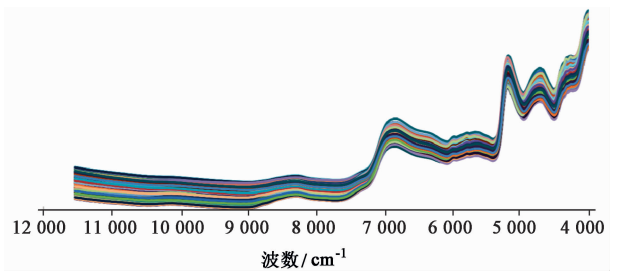


图 2 不同产地肉桂近红外光谱

Fig. 2 Near infrared spectroscopy of Cinnamomi Cortex from different origins

2.4.3 校正集与验证集划分 随机抽取 61 批不同产地肉桂建立香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛的近红外定量校正模型, 见表 2, 余下 25 批验证模型用。验证集样品中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛含量均在校正集含量范围内, 此校正集与验证集可用于建模。

2.4.4 波段选择 采用 OPUS 软件自带的优化设置, 筛选出最佳建模波段为 11 528 ~ 3 952 cm⁻¹。

2.4.5 NIR 光谱预处理 定量模型的多元校正方法有多元回归 (MLR), 主成分回归 (PCR), 偏最小二乘法 (PLS) 等。不同的多元校正方法各有优缺点, 本实验选取 PLS 作为校正方法, 以相关系数 (r), 校正均方差 (RMSEC), 预测均方差 (RMSEP) 为指标, 考察了标准正态变换 (SNV), 多元散射校正 (MSC), 平滑去噪法 (移动平均平滑法和 Savitzky-Golay 卷积平滑法), 一阶导数法 (1st derivative), 二阶导数法 (2st derivative) 等预处理方法。其中 R 越接近 1, RMSEC 和 RMSEP 越接近 0, 模型的性能越稳定。比较了 SNV 和 MSC 对 4 种指标性成分模型的影响, 见表 3。综合考虑取 SNV 对香豆素、肉桂醇光谱进行预处理, 取 MSC 对肉桂酸、肉桂醛光谱进行预处理。

2.4.6 主因子数确定 确定最佳主因子数的方法是以 RMSECV 对主因子数作图, 为避免模型拟合不充分或过度, RMSECV 值应随主因子数增加而递减, 当 RMSECV 值达到最低值后出现细微上升或平滑下降。香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛定量模型最佳主因子数分别为 7, 10, 10, 10, RMSECV 值依次为 0.015 8, 0.011 2, 0.002 0, 1.481 1 g·g⁻¹。

2.4.7 定量模型的建立与验证 运用 TQ 分析软件, 采用偏最小二乘法, 预处理为 SNV, MSC, 建模波段为 11 528 ~ 3 952 cm⁻¹, 香豆素、肉桂醇、肉桂酸、

表 2 校正集与验证集样品测定值

Table 2 Content range of calibration model and prediction model

成分	校正集 (n = 61)			验证集 (n = 25)		
	质量分数	平均值	RSD	质量分数	平均值	RSD
香豆素	0.017 9 ~ 0.174 6	0.073 4	56.5	0.018 1 ~ 0.152 5	0.075 7	55.5
肉桂醇	0.006 2 ~ 0.109 2	0.043 5	68.8	0.009 5 ~ 0.089 2	0.047 1	55.1
肉桂酸	0.037 1 ~ 0.976 0	0.069 2	23.3	0.043 3 ~ 0.092 1	0.072 1	16.8
肉桂醛	6.046 9 ~ 32.493 3	16.865 5	40.9	6.242 8 ~ 28.425 8	18.428 2	36.6

表 3 不同预处理方法对模型的影响

Table 3 Effects of different pretreatment methods on model

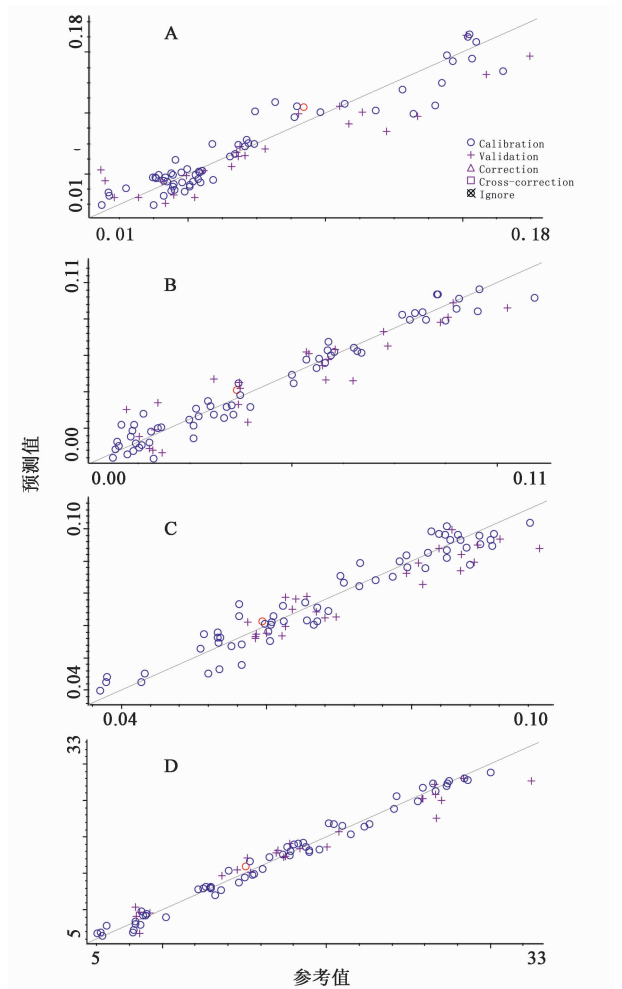
预处理方法	指标成分	R	RMSEC	RMSEP
SNV	香豆素	0.952 8	0.012 2	0.017 8
	肉桂醇	0.977 7	0.006 1	0.010 3
	肉桂酸	0.959 7	0.004 4	0.006 5
	肉桂醛	0.991 9	0.836 0	1.610 0
MSC	香豆素	0.949 1	0.012 6	0.017 8
	肉桂醇	0.976 5	0.006 3	0.011 3
	肉桂酸	0.961 9	0.004 3	0.005 5
	肉桂醛	0.992 2	0.820 0	1.630 0

肉桂醛定量模型最佳主因子数分别为 7, 10, 10, 10, 随机抽取 61 批不同产地肉桂建立香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛的近红外定量校正模型。模型质量评价参数 r 依次为 0.952 8, 0.977 7, 0.961 9, 0.992 2, RMSEC 依次为 0.012 2, 0.006 1, 0.004 3, 0.82 $g \cdot g^{-1}$, RMSEP 依次为 0.017 8, 0.010 3, 0.005 5, 1.63 $g \cdot g^{-1}$, RMSECV 依次为 0.015 8, 0.011 2, 0.002 0, 1.481 1 $g \cdot g^{-1}$ 。 R 接近于 1, RMSEC, RMSEP 接近于 0, 说明模型预测值与参考值之间存在良好的相关性。

应用定量模型,对未参与建模的 25 批肉桂样品进行预测,模型预测值与参考值的相对拟合误差接近于 0,表明该模型稳定可靠,具有良好的预处理能力,见图 3。对香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛模型预测值与参考值进行配对 t 检验, P 依次为 0.117, 0.610, 0.121, 0.541, 均 > 0.05 ,光谱预测值与参考值之间无显著差异,表明近红外光谱法与 HPLC 法之间系统误差小,可忽略不计。

3 讨论

采用偏最小二乘法建立不同产地肉桂香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛的定量校正模型,并对未参与建模的 25 批样品进行预测,得相对拟合误差接近 0,表明模型稳健,可靠性良好。配对 t 检验显示预测值与参考值之间无显著差异,表明近红外光谱法



A. 香豆素; B. 肉桂醇; C. 肉桂酸; D. 肉桂醛

图 3 4 种指标性成分预测值与参考值的相关性

Fig. 3 Correlation between predicted value and reference value of four indicators

与高效液相色谱法之间没有明显系统误差。其中香豆素的相对偏差较其他 3 个成分略大,猜测可能与香豆素的化学结构和含量有关。

HPLC 作为目前肉桂质量监控的药典检测方法,其样品处理复杂,耗时较长。本研究以肉桂为研究对象,建立不同产地肉桂的近红外定量校正模型,模型稳定可靠,可用于对未知样品的预测。与 HPLC 相比,能快速简便准确地预测不同产地肉桂

中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛的含量,节省大量的时间、经费,缩减工作量。近红外光技术在一定程度上可以代替 HPLC 分析工作,为后续建立肉桂质量品质的数字化标准提供参考,但还需更多研究者进一步研究证明。

[参考文献]

[1] 邱萍. 王今觉巧用肉桂临床验案探析[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(21): 2382-2383.

[2] 张桂芝, 张石楠, 孟庆华, 等. GC-MS 分析肉桂与桂皮挥发油的化学成分[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(8): 1256-1259.

[3] 赵凯, 薛培凤, 屠鹏飞. 肉桂的化学成分及其生物活性研究进展[J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35(1): 63-74.

[4] 邹盛勤, 姜琼, 周伟华. RP-HPLC 同时测定不同产地肉桂中 5 种成分的含量[J]. 光谱实验室, 2013, 30(4): 1599-1602.

[5] 刘威, 李红娟, 张帅, 等. HPLC 测定不同商品规格桂枝中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 134-138.

[6] 郭兰萍, 黄璐琦, Christian W, 等. 近红外光谱技术及其在中药道地性研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14): 1751-1757.

[7] 周文婷. 巴戟天近红外光谱的研究[D]. 广州: 广东药学院, 2015.

[8] 张银, 周孟然. 近红外光谱分析技术的数据处理方法[J]. 红外技术, 2007, 174(6): 345-348.

[9] 狄天云, 高晓娟, 张霞, 等. 基于指标成分与近红外光谱对宁夏野生和栽培甘草的比较鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3): 536-541.

[10] 赖长江生, 周融融, 余意, 等. 基于近红外分析和化学计量学方法对不同产地灵芝快速鉴别及多糖含量测定的研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3243-3248.

[11] YANG Y, LIU X, LI W, et al. Rapid measurement of epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, and moisture in Herba Epimedii using near infrared spectroscopy [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2017, 171: 351-360.

[12] 耿姝, 陈勇, 金叶, 等. 基于近红外技术的金银花药材多指标成分快速检测[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(2): 144-150.

[13] 陈美君, 陈鸿平, 丁龙, 等. 陈皮中 3 种黄酮成分近红外定量分析模型的建立[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1614-1619.

[14] 顾超, 岳显可, 杜伟锋, 等. 延胡索中 3 种成分近红外同步定量检测模型的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(3): 60-65.

[15] 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: 136.

[责任编辑 顾雪竹]