

文章编号: 1674-8085(2015)05-0094-06

巴戟天药材中耐斯糖含量近红外光谱测定方法的建立

周文婷, 林 萍, 王海霞, *姬生国

(广东药学院中药学院, 广东, 广州 510006)

摘 要: **目的** 建立巴戟天药材中耐斯糖含量的近红外光谱测定方法。**方法** 用高效液相色谱法测定 114 批巴戟天药材中耐斯糖含量, 采集近红外光谱后, 运用多元散射校正法, 结合最小偏二乘法建立巴戟天耐斯糖含量的定量模型。**结果** 建立的耐斯糖近红外光谱定量模型, 内部交叉验证决定系数为 0.979 1, 校正标准偏差为 0.909 0, 预测标准偏差为 0.909 0, 交叉验证的标准偏差为 1.093 0。**结论** 该含量测定近红外光谱模型稳定、准确适用于巴戟天药材中耐斯糖的含量测定。

关键词: 巴戟天; 耐斯糖; 近红外光谱; 定量模型

中图分类号: O657.33

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2015.05.018

QUANTITATIVE DETERMINATION MODEL OF NYSTOSE IN *MORINDA OFFICINALIS* BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPY

ZHOU Wen-ting, LIN Ping, WANG Hai-xia, *JI Sheng-guo

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

Abstract **Objective:** To establish the quantitative determination model of nystose in *Morinda officinalis* by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). **Methods:** The nystose contents of 144 samples were measured by HPLC, and their spectrum were collected. Combined with MSC and PLS, the quantitative determination model were established. **Results:** The determination coefficient, root-mean-square error of cross-validation, root-mean-square error of calibration and root-mean square error of prediction were 0.9791, 0.9090, 0.9090 and 1.0930 respectively in the created calibration model. **Conclusion:** The quantitative determination model is steady, and can determine the content rapidly and accurately.

Key words: *Morinda officinalis*; nystose; NIRS; quantitative determination model

巴戟天为常用的中药材, 具有补肾助阳、强筋壮骨、祛风除湿等功效^[1]。耐斯糖为 2010 版《中国药典》所规定的巴戟天指标性成分, 其含量测定采用 HPLC 法。近红外光谱分析技术(NIRS)是在近几年发展迅速的一种中药质量分析技术, 具有快速、方便、对样品无损的分析技术, 光谱信息量丰

富, 图谱稳定性高等特点^[2], 被广泛应用于中药材、中成药的定量、定性鉴别中。本课题组经过数年的研究, 以道地的岭南中药材为研究对象, 以陈皮的本草研究为基础^[3], 成功将该技术应用于广陈皮、陈皮^[4]以及其他药材, 如广藿香^[5-10]、高良姜^[11-12]、枇杷叶^[13-14]、广金钱草^[15]、巴戟天^[16]等中药材及部

收稿日期: 2015-05-19; 修改日期: 2015-07-19

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B030801044)

作者简介: 周文婷(1988-), 女, 广东广州人, 硕士生, 主要从事中药资源开发与道地性研究(E-mail:wendychou840@163.com);

林 萍(1990-), 女, 广东湛江人, 硕士生, 主要从事中药资源开发与道地性研究(E-mail: 305127358@qq.com);

王海霞(1989-), 女, 海南儋州人, 硕士生, 主要从事中药资源开发与道地性研究(E-mail:361123010@qq.com);

*姬生国(1967-), 男, 河南新乡人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药资源、中药质量标准及中药新药研究(E-mail:shengguo_ji@163.com).

分中药制剂的质量评价中。本研究通过应用该技术对巴戟天中耐斯糖含量进行测定, 以期药材加工、生产等企业及同行分享巴戟天药材及制剂的质量控制方法。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验药材

本试验所需药材分别从广西省梧州市古龙镇、太平镇、岭景镇; 广东省云浮市大方镇、千官镇; 肇庆市高良镇等地的种植和栽培基地进行采集。采收期为 2013 年 6~7 月。经广东药学院中药学院姬生国教授鉴定为茜草科巴戟天属植物巴戟天 *Morinda officinalis* How. 的根。药材先置于烘箱中烘至七成干, 取出, 锤扁后烘至全干, 粉碎过 50 目筛, 备用。

1.1.2 仪器与试剂

傅立叶变换近红外光谱仪, 配有样品旋转器和石英样品杯、漫反射积分球、OPUS 光谱采集软件 (Tensor37 型, 德国 Bruker 公司) 和 TQ8.0 分析软件。1120 型全自动高效液相色谱仪 (日本岛津公

司), 蒸发光散射检测器 (Alltech ELSD3300), ODS- C_{18} 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m, 美国 Agilent 公司), BIY211b 电子天平 (日本岛津公司), AY120 型十万分之一分析天平 (日本岛津公司)。所用流动相为色谱纯, 其余为分析纯。定量分析用耐斯糖对照品 (批号: 11891-201202), 购于中国食品药品检定研究院。

1.2 方法

1.2.1 耐斯糖的含量测定

参照 2010 年版《中国药典》巴戟天项下之规定, 采用 HPLC 对样品中耐斯糖的含量进行测定^[17], 结果样品中耐斯糖的含量范围为 3.344 0%~6.451 3%, 符合《中国药典》所规定 2% 以上, 均匀分布。

1.2.2 采集近红外光谱

样品粉末 4 g, 装入样品杯, 振摇并使样品混合均匀。利用分辨率为 8 cm^{-1} 的积分球漫反射系统进行检测, 扫描 34 次; 扫描范围 12000~4000 cm^{-1} ; 温度 (23 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$; 相对湿度 35%~40%, 每批样品重复装样并采集光谱 5 次, 取平均光谱。114 批样品近红外光谱重叠图如图 1。

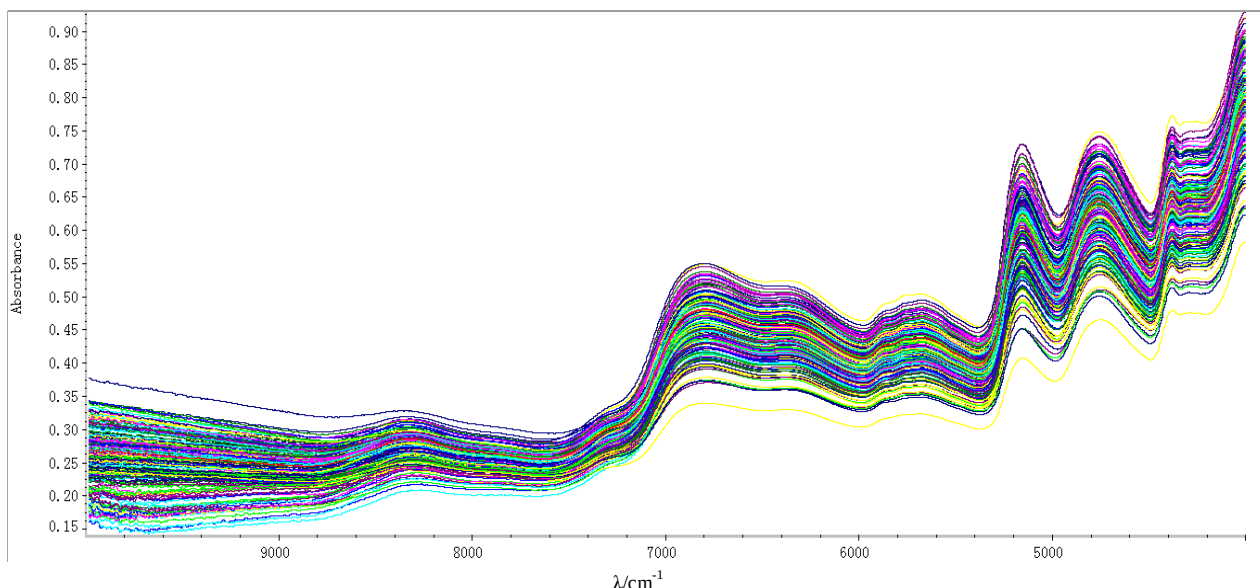


图1 114批巴戟天的近红外光谱重叠图

Fig.1 Near-infrared spectra of 114 *Morinda officinalis* How. Samples

2 结果与讨论

2.1 定量分析模型的建立

根据样品中耐斯糖含量的分布, 为保证样品集更具有代表性, 要将样品分为验证集与校正集, 其划分的比例为 4:1, 并且校正集含量范围要包含验证集样品含量^[18]。采用 TQ8.0 数据分析软件预处理

光谱,利用偏最小二乘法(partial least square, PLS)作为建模方法,对校正模型进行建立,内部验证采用交叉验证方法进行,用验证集样品检验校正模型的性能。校正集和验证集样品中耐斯糖含量情况如表 1 所示。

表1 校正集和验证集中耐斯糖的含量分布(%)

Table 1 Content distribution of calibration and validation set for Nystose

组成	样品数	最小值	最大值	平均值
校正集	89	3.344 0	5.173 0	4.421 0
验证集	25	3.767 0	5.025 0	4.467 0

2.2 光谱预处理

作为一个全息光谱,很多干扰因素,如机器噪声、样品颗粒和光散射等的信息存在于近红外光谱中,对近红外吸收强度和样品中指标性成分数据的关系造成影响,使近红外模型准确性与稳定性产生偏差。因此,对原始光谱进行预处理是必须的。常用的预处理方法有多元散射校正法(multiplicative scatter correction, MSC),标准归一化法(SNV),一阶导数法(First derivative),二阶导数法(Second derivative)^[19]。

本实验采用 PLS 建立模型时,以内部交叉验证决定系数(R^2),校正均方差(rootmean square error of calibration, RMSEC)和预测均方差(root mean squared error of prediction, RMSEP)作为指标,用以对模型进行评价, R^2 越接近 1, RMSEP 和 RMSEC 越小、表明校正模型建立越准确, RMSEP 越小,且 $RMSEP/RMSEC \leq 1.2$ 时,表明模型能准确预测^[20]。结果如表 2 所示。

表2 不同预处理方法对模型性能的影响

Table 2 The influence of different pretreatment methods on the model

光谱预处理方法	R^2	RMSEC	RMSEP
Constant (无)	0.970 6	1.080 0	1.190 0
SNV (标准归一化法)	0.977 2	0.949 0	1.020 0
MSC (多元散射校正法)	0.979 1	0.909 0	0.909 0
MSC+First Derivative (一阶导数法)	0.979 4	0.904 0	1.150 0
MSC+Second Derivative(二阶导数法)	0.859 2	2.290 0	2.320 0

MSC 可以消除基线偏移和平移现象,当采用该方法对光谱数据进行处理时,可得到的多元散射校

正相关光谱具有高信噪比^[21]。如表 2 所示,由于采用 MSC+First Derivative 方法时, R^2 最接近于 1,因此开始时选择该方法,但是从 RMSEP/RMSEC 来看,两者比值大于 1.2,故该方法并不能作为建模的预处理方法。而从 MSC 可看出,三个指标均符合要求,因此采用该方法对光谱进行预处理。

2.3 建模波段的选择

由图 1 可见,由于所有样品的近红外光谱近似,无法根据其判断耐斯糖含量与吸光度的关系,且如果建模波段过宽,则由于包含大量冗余信息而影响模型的准确性^[22]。因此对建模区间的选择,对确定光谱与含量之间的关系是十分重要的。本实验将所获得的待测成分浓度与波长的吸光度进行线性回归,将系数与对应波长作图得到可相关光谱^[23],以 R^2 、RMSEC、RMSEP 等为综合考察指标,选择合适的建模波段,通过对比,波段 $7502.80 \sim 4386.65 \text{ cm}^{-1}$ 与耐斯糖含量具有较高相关性,因此选择该波段作为建模波段可以避免采用全谱建模所导致的不准确性,因此选择该波段为建模波段。结果见表 3。

表3 不同建模区间对模型性能的影响

Table 3 The influence of spectra wavelength on the model

建模区间/ cm^{-1}	R^2	RMSEC	RMSEP
9993.32~4.005.99	0.978 9	0.912 0	1.100 0
7502.80~4386.65	0.979 1	0.909 0	0.909 0
9993.32~7502.80	0.850 7	2.350 0	2.610 0
4005.99~4386.65	0.949 5	1.400 0	2.280 0

2.4 主因子数的选择

数据降维,是主成分分析法的中心法则,通过变换,使几个能够完全表达原变量数据特征的新变量作为原变量的线性组合。这几个新变量称为主成分或主因子^[24]。采用 PLS 法建立定量校正模型时,要充分利用光谱的有效信息,同时要避免发生过拟合现象,因此需要选择合适的主因子数。本实验以校正集内部交叉验证均方差(Root-mean-square root of cross validation, RMSECV)为衡量模型质量的因素, RMSECV 数值越小,表示模型的预测精度高, RMSECV 最小时,代表所选择的主因子数为最佳主因子数^[25]。本实验 RMSECV 最小值为 1.093 0,所对应的主因子数为 8。结果见图 2。

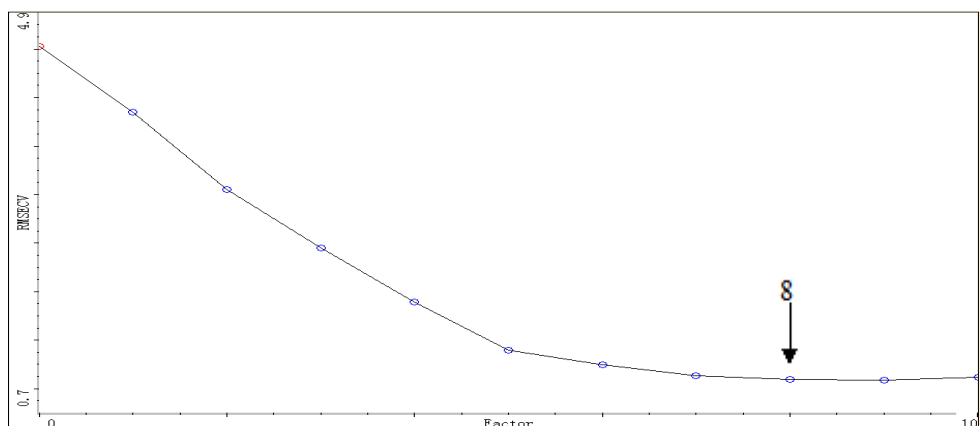


图2 RMSEC值随主成分的变化图

Fig.2 RMSECV value change with different principal component

2.5 校正模型的建立

运用 PLS 法建立巴戟天耐斯糖含量的校正模型, 图 3 为建立模型的校正集样品通过模型的交互验证后得到的预测值与实际测量值之间的相关图,

从图中看出, 在回归线的两侧, 校正集样品能均匀地分布。RMSEC=0.909 0, $R^2=0.9791$ 。图 4 为校正集与验证集样本的预测值与实测值之间的绝对偏差图, 两个数值之间的绝对偏差在 ± 2 。

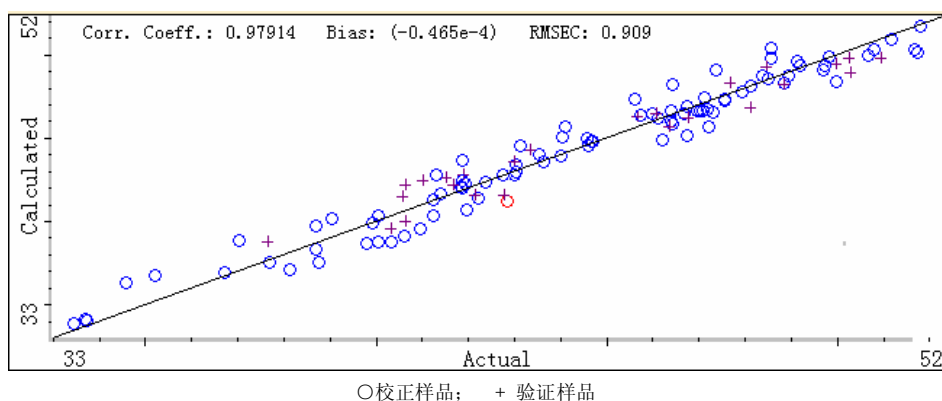


图3 校正集样品交互验证得到的NIR预测值与参考值之间的相关图

Fig.3 Relationship between reference and predictive value in calibration samples

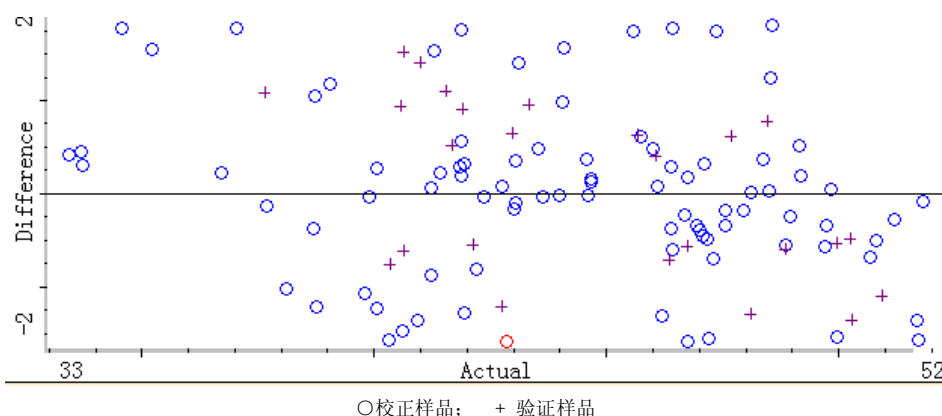


图 4 校正集样本与预测集样本的 NIR 预测值与参考值之间的绝对偏差图

Fig.4 Deviation between NIR value and HPLC value of calibration and validation samples

2.6 校正模型的评价

为了进一步评价校正模型, 我们可以采用 RPD, 即相对分析误差, 其计算方法为

$SD/RMSECV$, 若 $RPD \geq 3$, 说明模型效果良好, 所建立的定标模型可用于检测; 如果 $2.5 < RPD < 3$, 说明可以利用所建立的模型进行定量分析, 但

预测精度需要提高;如果 $RPD < 2.5$, 不能用近红外光谱技术对该成分进行定量分析^[26]。

本实验所建立的定量模型 RPD 为 3.430 9, 说明所建的校正模型能应用于实际生产中。

2.7 校正模型的外部检验

我们需要利用验证集样品对模型进行外部检验来对校正模型的可靠性与稳定性进行分析, 本研究利用所建立的校正模型对验证集样品进行预测, 以预测值与参考值的比值为预测回收率, 研究结果见表 4。

表4 验证集样品的平均回收率
Table 4 Average recovery validation samples

编号	实测值/%	预测值/%	绝对偏差	平均回收率/%
1	5.024 8	4.976 1	-0.048 7	100.05
2	4.190 9	4.280 5	0.089 7	
3	4.057 6	4.151 2	0.093 7	
4	4.567 3	4.630 7	0.063 4	
5	3.766 9	3.694 3	-0.072 6	
6	4.065 7	4.217 0	0.151 3	
7	4.153 7	4.263 3	0.109 6	
8	4.812 5	4.682 7	-0.129 8	
9	4.100 9	4.242 1	0.141 1	
10	4.276 8	4.155 5	-0.121 2	
11	4.065 4	4.004 2	-0.061 2	
12	4.335 3	4.429 9	0.094 7	
13	4.606 5	4.647 3	0.040 9	
14	4.213 8	4.159 0	-0.054 7	
15	4.636 6	4.565 1	-0.071 6	
16	4.298 5	4.362 7	0.064 1	
17	5.093 8	4.982 8	-0.111 0	
18	4.769 3	4.830 4	0.061 1	
19	4.846 3	4.923 8	0.077 4	
20	5.027 6	4.891 1	-0.136 5	
21	4.997 6	4.944 0	-0.053 6	
22	4.168 7	4.220 7	0.052 0	
23	4.884 7	4.825 2	-0.059 5	
24	4.033 8	3.957 1	-0.076 7	
25	5.024 8	4.976 1	-0.048 7	

2.8 模型的重复性考察

取 5 份同一样品, 分别采集其近红外光谱图, 利用所建立好的定量分析模型对其含量进行预测,

所得到的结果 RSD 为 0.30%, 表明经过模型得到的数值重复性良好, 结果见表 5。

表5 NIR分析模型重复性实验 (%)
Table 5 Repeatability experiment of NIRS analysis model

试验号	1	2	3	4	5	RSD(%)
耐斯糖 含量 NIR 测试值	41.077 9	41.099 8	41.791 3	41.221 7	41.102 5	0.30

3 结论

本实验利用近红外光谱技术与化学计量法相结合, 将巴戟天药材样品中的有效信息与对应样品中耐斯糖含量进行线性拟合, 建立了耐斯糖定量分析模型, 经过验证, 巴戟天药材中耐斯糖的含量(%)按照 HPLC 测定的结果与近红外光谱模型测定的结果的绝对偏差在-0.136 5 与 0.151 3 之间, 25 个检测样品的近红外光谱测定结果的平均回收率为 100.05%, 说明该模型准确、快速, 适用于大批量药材的中耐斯糖含量的快速测定, 我们获得了巴戟天药材的近红外光谱质量控制方法。

参考文献:

[1] 肖凤霞,林励. 巴戟天补肾壮阳作用的初步研究[J]. 食品与药品,2006,8(5):45-46.

[2] 严衍禄,红外光谱分析基础与应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005: 35.

[3] 魏莹,杨安金,骆利平,等. 陈皮本草考证[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2013,34(4):74-77.

[4] 郭念欣,蔡佳良,姬生国. 近红外光谱技术在陈皮道地性分析中的应用[J]. 中国药房,2013,24(15) : 1394-1396.

[5] 蔡佳良,郭念欣,姬生国. 不同干燥方法对广藿香中百秋李醇含量影响的近红外光谱分析[J]. 云南中医中药杂志,2013,34(1):53-54.

[6] 蔡佳良,李蕾蕾,姬生国. 近红外光谱法快速测定广藿香中水分含量[J]. 医药导报,2012,31(11):1468-1470.

[7] 蔡佳良,黄洁燕,邓婉婷,等. 近红外光谱法快速测定广藿香中醇溶性浸出物含量[J]. 中国药学杂志,2012,47(24) : 2026-2028.

[8] 蔡佳良,黄洁燕,李蕾蕾,等. 运用近红外光谱法建立广藿香含量定量分析模型[J]. 中国现代应用药学,2013, 30(3): 260-263.

[9] 蔡佳良,郭念欣,黄洁燕,等. 近红外光谱法建立测定广藿

- 香中百秋李醇的定量模型[J].中国中药杂志,2012,37(14):2113-2116.
- [10] 郭念欣,蔡佳良,李蕾蕾,等.运用近红外技术建立藿香正气胶囊中厚朴酚的定量模型[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(8):146-149.
- [11] 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.
- [12] 林萍,王海霞,周文婷,等.利用近红外光谱分析技术快速测定高良姜中水分含量[J].中国调味品,2014,39(8):99-103.
- [13] 李蕾蕾,王海霞,林萍,等.近红外光谱技术在枇杷叶水分含量测定中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(19):104-107.
- [14] 李蕾蕾,王海霞,黄洁燕,等.近红外光谱法快速测定枇杷叶中熊果酸的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(23):103-106.
- [15] 王海霞,周文婷,林萍,等.NIRS 在广金钱草水分含量测定中的应用[J].江苏农业科学,2014,42(7):324-326.
- [16] 周文婷,王海霞,林萍,等.巴戟天水溶性浸出物近红外光谱测定方法的建立[J].计算机与应用化学,2014,31(6):709-712.
- [17] 中华人民共和国药典委员会.中华人民共和国药典(二部)[M].北京:化学工业出版社,2010:75.
- [18] 白雁,王星,龚海燕,等.NIRS 结合 PLS 快速分析银黄颗粒中有效成分含量[J].计算机与应用化学,2010,27(12):1703-1706.
- [19] 逢焕欢,冯艳春,胡昌勤,等.不同生产厂家注射用头孢哌酮钠含量测定的近红外定量模型的建立[J].光谱学与光谱分析,2006,26(12):2214-2218.
- [20] 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.
- [21] 芦永军,曲艳玲,宋敏.近红外相关光谱的多元散射校正处理研究[J].光谱学与光谱分析,2007,27(5):877-880.
- [22] 方娟娟,卫雪梅,强建华,等.偏最小二乘法同时测定食醋的有效成分和防腐剂的含量[J].计算机与应用化学,2010,27(3):351-353.
- [23] 柳艳云,胡昌勤.近红外分析中光谱波长选择方法进展与应用[J].药物分析杂志,2010,30(5):968-975.
- [24] 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,2006:15.
- [25] 滑荣,韩建国,齐晓,等.近红外漫反射光谱法预测紫花苜蓿草颗粒营养价值[J].光谱学与光谱分析,2008,28(12):2826-2829.
- [26] Whitfield R G, Gerger M E, Sharp R L. Near-infrared spectrum qualification via mahalanobis distance determination[J].Applied spectroscopy, 1987, 41(7): 1204-1213.