

文章编号:1001-6880(2014)7-1062-05

# 近红外光谱法快速测定木香中木香烃内酯与去氢木香内酯的含量

雷敬卫,樊明月,郭艳利,白雁\*,张强,谢彩侠

河南中医学院,郑州 450046

**摘要:**本文主要研究近红外光谱法在快速测定木香药材中木香烃内酯与去氢木香内酯含量的应用。采用近红外漫反射光谱法采集木香的近红外光谱,以HPLC测量值为参考值,运用偏最小二乘法(PLS)建立木香烃内酯与去氢木香内酯含量的定量模型,并用未知样品验证该模型。结果表明所建定量模型的校正集内部交叉验证相关系数( $R^2$ )、校正均方差(RMSEC)和内部交叉验证均方差(RMSECV)分别为0.9783、0.161和0.374;经外部验证的预测相关系数( $r^2$ )和预测均方差(RMSEP)分别为0.9546和0.162。该方法操作简便,测定快速,结果准确,无污染,可用于木香药材中木香烃内酯与去氢木香内酯含量的快速测定。

**关键词:**近红外光谱法;木香;木香烃内酯;去氢木香内酯;快速测定

中图分类号:R917

文献标识码:A

## Rapid Determination of Costunolide and Dehydrocostus Lactone in Radix Aucklandiae by Near-Infrared Spectroscopy

LEI Jing-wei, FAN Ming-yue, GUO Yan-li, BAI Yan\*, ZHANG Qiang, XIE Cai-xia

Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

**Abstract:** This paper mainly studied the application of near infrared spectroscopy for rapid determination of costunolide and dehydrocostus lactone in Radix Aucklandiae. Through collecting near-infrared spectra of Radix Aucklandiae by Nicolet 6700 NIRS spectrometry, the quantitative model of costunolide and dehydrocostus lactone was created by partial least square (PLS) analysis using the quantification value obtained by HPLC as reference. The developed quantitative model was verified by the unknown samples. The results showed that the correlation coefficient ( $R^2$ ), the root-mean-square error of calibration (RMSEC) and the root-mean-square error of cross-validation (RMSECV) of the quantitative model of costunolide and dehydrocostus lactone was 0.9783, 0.161 and 0.374, respectively; the correlation coefficients of prediction ( $r^2$ ) and the root-mean-square error of prediction (RMSEP) was 0.9546 and 0.162, respectively. The developed method was simple, quick, accurate, and it can be applied for the rapid determination of costunolide and dehydrocostus lactone in Radix Aucklandiae.

**Key words:** near-infrared spectroscopy; Radix Aucklandiae; costunolide; dehydrocostus lactone; rapid determination

木香是菊科植物云木香和川木香的通称,两者均为中国的特有植物,且根茎都是重要的中药材。木香味辛、苦,性温,归脾、胃、胆、大肠、三焦经,辛行苦泄,可升可降,行气止痛,用于脾胃气滞或脾虚气滞所致的脘腹胀痛、食少便溏等;疏肝利胆,用于肝胆气滞引起的胁痛、黄疸等;健脾消食,醒脾开胃,治疗饮食积滞所致的大便秘结、腹泻、里急后重等,是中医上常用的中药之一。

收稿日期:2013-08-05 接受日期:2013-12-12

基金项目:河南省中药开发工程技术研究中心项目(142102313109);河南省教育厅科学技术研究重点项目(14B360007);河南中医学院研究生创新基金项目(2013YCX014)

\* 通讯作者 Tel:86-371-65962967; E-mail:934337931@qq.com

木香烃内酯与去氢木香内酯为木香质量控制中的两个重要指标,2010年版《中国药典》中规定木香烃内酯与去氢木香内酯的含量测定方法为高效液相色谱法,但该方法过程繁琐,分析速度慢,消耗试剂且需要超声处理,污染环境。

近红外光谱分析技术是一种快速无损的绿色分析技术,具有快速、无损可同时进行多项测定等优点<sup>[1]</sup>,目前已经陆续用于药效成分的含量测定<sup>[2]</sup>、中药纯化过程分析<sup>[3]</sup>、天然药物鉴别<sup>[4]</sup>和药材的快速模式识别<sup>[5]</sup>等。根据目前的研究进展,这种快速检测技术是最有希望在中药生产过程实现工业化应用。本研究以木香为研究对象,将近红外光谱分析技术应用于对木香烃内酯与去氢木香内酯的含量测

定,用近红外漫反射光谱技术结合偏最小二乘法建立了木香中木香烃内酯与去氢木香内酯的定量分析模型,为大批量木香样品中指标性成分的含量测定提供一种新的方法,同时也为木香的快速评价和在线检测提供了参考和依据。

## 1 仪器与材料

美国 Thermo Nicolet 公司 6700 型近红外光谱仪,该仪器配有 InGaAs 检测器,50 mL 标准石英杯,OMNIC 光谱采集软件,TQAnalyst8.0 软件;Waters 2695 自动高效液相色谱仪,Waters 2998 检测器,Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FW-200 型高速药材粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)。

甲醇(进口色谱纯,DikmaPure)、甲醇(分析纯,天津市登科化学试剂有限公司)、中美纯水。试验用样品由河南省某制药股份有限公司提供,共 86 份。木香烃内酯与去氢木香内酯对照品(供含量测定用)均由成都曼斯特生物科技有限公司提供(木香烃内酯批号:MUST-12022003,去氢木香内酯批号:MUST-11083101)。

## 2 实验方法

### 2.1 近红外光谱的采集

取上述 86 份样品适量,粉碎,过 80 目药典标准筛,取约 5 g 粉末装入石英杯,混合均匀,依以下条件进行扫描,采集光谱图。测样方式:积分球漫反射;分辨率 8 cm<sup>-1</sup>;扫描次数 64 次;扫描范围 12000 ~ 4000 cm<sup>-1</sup>;温度 25 ~ 30 °C;相对湿度 55% ~ 65%。每个样品重复扫描 3 次,计算平均光谱以建立模型。

### 2.2 木香烃内酯与去氢木香内酯含量的 HPLC 测定

按照《中国药典》一部中木香项下木香烃内酯与去氢木香内酯的 HPLC 含量测定方法进行测定<sup>[6]</sup>。色谱条件:Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm),流动相:甲醇:水(65:35),柱温 25 °C,进样量 10 μL,流速 1.0 mL/min,检测波长 225 nm。每份样品平行测定两次,计算平均值,并以其作为参考值。

### 2.3 木香烃内酯与去氢木香内酯定量分析模型的建立

采用 PLS 建立定量分析模型,应用 TQ Analyst 8

进行建模和优化,优化的内容包括光谱预处理方法、建模波段及主成分数的选择。以  $R^2$ 、RMSEC、RMSECV、 $r^2$ 、RMSEP 为综合指标,考察不同建模方法的合理性。 $R^2$  越接近 1, RMSECV 越小,且 RMSEP 与 RMSEC 越接近,所建模型适用性越强、预测效果越好。

从试验用 86 份木香样品中,根据木香烃内酯与去氢木香内酯总量的分布范围,选择其中 66 个有代表性的样品组成校正集,其余 20 个样品为验证集,其含量范围处于校正集样品含量范围之内<sup>[7]</sup>。表 1 为校正集和验证集样品的含量分布。

表 1 校正集与验证集样本含量分布

Table 1 Sample distribution of calibration set and validation set

样品 Sample	样品量 Number of sample	最大值 Maximum (%)	最小值 Minimum (%)	平均值 Mean (%)
校正集	66	6.92	3.32	4.78
验证集	20	5.90	3.94	4.90

## 3 结果与分析

### 3.1 木香样品的 NIRS 图谱采集

86 份木香样品的近红外光谱叠加图见图 1。

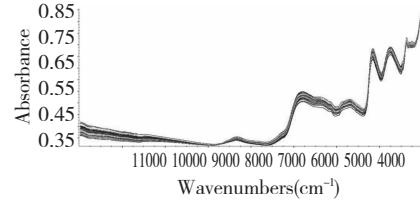


图 1 86 批木香的 NIRS 原始光谱叠加图

Fig. 1 NIRS spectra of 86 Radix Aucklandiae samples

### 3.2 木香样品的木香烃内酯与去氢木香内酯的含量测定

按照 2.2 项下的方法测定 86 份木香样品中木香烃内酯与去氢木香内酯的含量,木香烃内酯和去氢木香内酯的混合对照品及样品的 HPLC 色谱图见图 2。每份样品平行测定两次,计算平均值,结果见表 2。

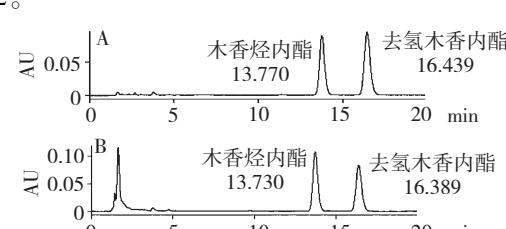


图 2 混合对照品(A)及样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of mix standard (A) and sample (B)

表 2 86 份样品中木香烃内酯与去氢木香内酯的总含量

Table 2 Total content of costunolide and dehydrocostus lactone in 86 samples

编号 No.	总含量 Total content (%)						
1	4.97	23	5.68	45	5.94	67	3.94
2	5.62	24	4.26	46	5.10	68	3.60
3	4.31	25	5.94	47	5.23	69	4.87
4	5.10	26	5.67	48	4.70	70	5.11
5	4.55	27	4.57	49	5.75	71	4.25
6	5.37	28	3.78	50	5.00	72	3.90
7	5.63	29	4.76	51	4.87	73	3.81
8	5.36	30	5.26	52	4.62	74	6.29
9	4.92	31	5.14	53	5.38	75	4.58
10	4.74	32	4.82	54	5.35	76	4.23
11	5.46	33	5.30	55	3.84	77	5.20
12	4.67	34	4.27	56	4.87	78	4.36
13	5.05	35	5.46	57	4.77	79	5.62
14	5.59	36	4.81	58	4.08	80	3.64
15	4.96	37	5.90	59	3.84	81	4.48
16	6.92	38	4.60	60	4.09	82	4.97
17	3.96	39	5.53	61	4.26	83	3.64
18	5.52	40	3.91	62	4.29	84	3.32
19	5.59	41	5.21	63	4.01	85	3.38
20	5.35	42	3.65	64	3.82	86	4.37
21	6.28	43	4.68	65	4.41		
22	4.64	44	5.17	66	4.59		

### 3.3 木香中木香烃内酯与去氢木香内酯的定量校正模型的建立

#### 3.3.1 光谱预处理方法的选择

在建立近红外定量模型前,首先要对样品的近红外原始吸收光谱进行预处理,为了消除光谱噪音、颗粒散射、光谱漂移等非线性因素对定量结果的影响。表3为选用不同预处理方法后,校正集内部交

叉验证相关系数( $R^2$ )、校正均方差(RMSEC)及验证集预测均方差(RMSEP)的比较。其中 $R^2$ 越接近1,RMSEC、RMSEP越小越好<sup>[8]</sup>。由表可以看出,SNV + Second Derivative(二阶导数)处理方法效果最好,可以消除样品光谱噪音及漂移所造成的影响,强化样品近红外光谱的谱带特征,克服样品谱带重叠的现象。

表 3 不同预处理方法对定量模型性能的影响

Table 3 Different Pretreatment Methods on Performance of quantitative models

光谱预处理方法 Preprocessing methods	相关系数 $R^2$	校正均方差 RMSEC	预测均方差 RMSEP
Constant(无)	0.9686	0.193	0.365
MSC(多元散射校正)	0.9764	0.168	0.411
SNV(标准归一化)	0.9758	0.161	0.529
SNV + First Derivative(一阶导数)	0.9587	0.221	0.274
SNV + Second Derivative(二阶导数)	0.9783	0.161	0.162
MSC + Second Derivative(二阶导数)	0.9757	0.17	0.166

### 3.3.2 建模波段的选择

本试验采用偏最小二乘法(PLS)建立木香中木香烃内酯与去氢木香内酯的定量分析模型。在建立模型时需要不断选择特征波段以调整模型的准确性<sup>[9]</sup>,以 $R^2$ 和RMSECV为指标,对不同波段进行优化比较。结果见表4,在5112.58~8134.53 cm<sup>-1</sup>波谱区间, $R^2$ 最接近1,RMSECV最小,故选择此波段为最佳建模波段。

表4 不同光谱范围对 $R^2$ 和RMSECV的影响

Table 4 The influence of different spectral ranges on  $R^2$  and RMSECV

光谱范围(cm <sup>-1</sup> ) Spectral range	相关系数 $R^2$	内部交叉验证均方差 RMSECV
4030.29~11955.21	0.7287	0.690
6047.77~10290.86	0.8329	0.660
5112.58~8134.53	0.9783	0.374

### 3.3.3 主成分数的选择

采用PLS法建立近红外定量模型时,主成分数的选择对模型的优劣有显著影响。主成分数太多,使模型包含过多的测量噪音,出现过拟合现象;主成分数过少,导致建模信息不全,预测能力差<sup>[10]</sup>。图3为主成分数对PLS定量分析模型RMSECV的影响。从图中可以看出,当PLS因子数为5时RMSECV较小,为最佳建模主成分数。

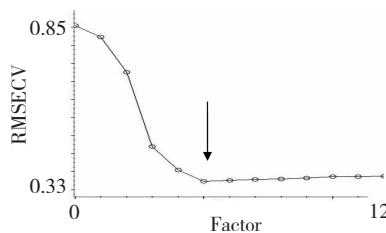


图3 RMSECV值随主成分的变化图

Fig. 3 RMSECV values changed with the changing of principal components

### 3.3.4 定量模型的建立

运用TQAnalyst8.0软件中的PLS法建立模型,86份样品用于建模(其中66份作为校正集样品,20份作为验证集样品),对光谱进行SNV+Second Derivative预处理,采用5112.58~8134.53 cm<sup>-1</sup>波段,5个主成分数进行建模,所建立模型的 $R^2$ =0.9783,RMSEC=0.161,RMSECV=0.374,木香烃内酯与去氢木香内酯的NIR预测值与HPLC参考值的相关图

见图4,偏差图见图5,从图中可以看出木香烃内酯与去氢木香内酯的NIR预测值与参考值接近,该模型可用于木香中木香烃内酯与去氢木香内酯的定量分析。

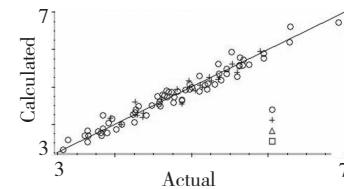


图4 木香烃内酯与去氢木香内酯的NIR预测值与参考值的相关图

Fig. 4 Correlation plot of NIR predicted values and reference values of costunolide and dehydrocostus lactone

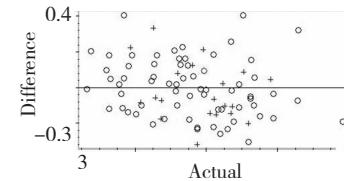


图5 木香烃内酯与去氢木香内酯的NIR预测值与参考值的偏差图

Fig. 5 Deviation plot of NIR predicted value and reference value of costunolide and dehydrocostus lactone

### 3.4 木香烃内酯与去氢木香内酯定量模型的验证

将验证集样品的近红外光谱输入所建模型中,并将NIR预测值与HPLC参考值进行相关分析。从表5可以看出,20份验证集样品的NIR预测值与HPLC参考值比较接近,预测相关系数( $r^2$ )为0.9546,预测均方差(RMSEP)为0.162。因此可认为该模型能准确预测其覆盖范围的木香烃内酯与去氢木香内酯的总含量。

表5 20份验证集样品的近红外模型预测值

Table 5 NIR predicted values of 20 validation set

编号 Number	HPLC 参考值 Reference values%	NIR 预测值 Predicted value%	预测相关系数 $r^2$	预测均方差 RMSEP
1	5.37	5.26		
2	5.05	4.90		
3	5.59	5.39		
4	4.96	5.17		
5	4.26	4.59		
6	5.26	5.15		
7	5.14	4.99		
8	4.81	4.94		

9	5.90	5.94		
10	4.60	4.68	0.9546	0.162
11	5.53	5.62		
12	5.23	5.25		
13	5.35	5.20		
14	4.08	4.00		
15	4.29	4.23		
16	3.94	4.16		
17	4.87	4.55		
18	5.11	5.04		
19	4.36	4.18		
20	4.37	4.30		

## 4 结论

本实验利用近红外光谱分析技术结合化学计量学建立了一种快速测定木香药材中木香烃内酯与去氢木香内酯含量的分析方法。结果表明,该方法简便、快速、无污染,能准确预测木香药材中木香烃内酯与去氢木香内酯的总含量。为制药企业实现快速、批量检测提供了参考和依据。2010 版《中国药典》对木香药材中木香烃内酯与去氢木香内酯的含量测定采用高效液相色谱法,虽然测定结果稳定、可靠,但是前期处理比较繁琐,既要超声处理,还要静置过夜,试验周期较长,不适合制药企业对原药材的快速、批量检测。而近红外光谱技术作为一种“绿色”分析技术<sup>[11]</sup>,分析速度快、对样品无损害、无化学污染等优点恰恰弥补了传统分析方法的不足,将会在中药制药行业发挥越来越大的作用。

## 参考文献

- Bai Y(白雁), Li XQ(李小庆), Lei JW(雷敬卫). Rapid determination of paeoniflorin in Paeoniae Radix Alba by near-infrared spectroscopy. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 3:358-362.
- Liu XS(刘雪松), Cheng YY(程翼宇). Fuzzy neural network classifier for fast evaluating the quality of Chinese traditional medicine products using near infrared spectroscopy. *Acta Chim Sin*(化学学报), 2005, 63:2216.
- Yang NL(杨南林), Cheng YY(程翼宇), Qu HB(瞿海斌). An approach to purifying process analysis of Chinese herbal extracts using NIRS. *Acta Chim Sin*(化学学报), 2003, 61:742-747.
- Tang YF(汤彦丰), Zhang ZY(张卓勇), Fan GQ(范国强). Identification of official rhubarb samples based on NIR spectra and neural networks. *Spectrosc Spectr Anal*(光谱学与光谱分析), 2004, 24:1348-1351.
- Qu HB(瞿海斌), Yang HL(杨海雷), Cheng YY(程翼宇). Fast and nondestructive discrimination of donkeyhide glue by near-infrared spectroscopy. *Spectrosc Spectr Anal*(光谱学与光谱分析), 2006, 26:60.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 57.
- Li JC(李家春), Xiao W(萧伟), Sun L(孙兰), et al. Rapid analysis of Paeoniae Radix Alba by near infrared spectroscopy. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 6:57-60.
- Zhang SN(章顺楠), Yang HL(杨海雷), Liu ZQ(刘占强), et al. On-line monitoring the contents of active components in the solution for Fufangdan shen dripping pills by near-infrared spectroscopy. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009, 29:192-196.
- Han WQ(韩吴琦), Huang YL(黄永丽), Guo XH(郭兴辉). Explored research of application of near infrared spectroscopy identification method in Chinese patent medicine. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 22:166-169.
- Lu WZ(陆婉珍). *Modern Near Infrared Spectroscopy Analytical Technology*. Beijing: China Petrochemical Press, 2007. 44.
- Bai Y(白雁), Guo YL(郭艳利), Lei JW(雷敬卫). Rapid determination of magnolol and honokiol in Xiangshayangwei pill by near-infrared spectroscopy. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2012, 11:1022-1025.