

文章编号:1001-6880(2015)1-0084-05

# 近红外漫反射技术测定烤烟烟叶中的茄尼醇

付秋娟<sup>1</sup>,杜咏梅<sup>1\*</sup>,张怀宝<sup>1</sup>,侯小东<sup>1</sup>,李燕华<sup>2</sup>,李丹丹<sup>1</sup><sup>1</sup>中国农业科学院烟草研究所,青岛 266101; <sup>2</sup>山东京鲁烟叶复烤有限公司,潍坊 262200

**摘要:**为研究烟草茄尼醇的近红外光谱快速检测技术,采用偏最小二乘法(PLS),选择合适的预处理方法,建立了烤烟烟叶中茄尼醇的近红外光谱漫反射定量校正模型,模型交叉验证均方差 RMSECV 为 0.108,外部验证的预测均方差 RMSEP 为 0.0822,平均相对偏差为 5.3%,说明模型可以对茄尼醇进行快速准确地预测。并通过有标转移法成功地将模型转移到其它仪器上,实现了烟草茄尼醇在不同实验室的快速检测。

**关键词:**近红外漫反射;烤烟;茄尼醇;模型

中图分类号:O657.33;TS41 + 1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.018

## Determination of Solanesol Content of Flue-Cured Tobacco Leaves by Near-Infrared Diffuse Reflectance Technology

FU Qiu-juan<sup>1</sup>, DU Yong-mei<sup>1\*</sup>, ZHANG Huai-bao<sup>1</sup>, HOU Xiao-dong<sup>1</sup>, LI Yan-hua<sup>2</sup>, LI Dan-dan<sup>1</sup><sup>1</sup>Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China; <sup>2</sup>Shandong Jinglu tobacco redrying Co. Ltd, Weifang 262200, China

**Abstract:** In order to determinate the content of solanesol in flue-cured tobacco leaves by near-infrared diffuse reflectance technology, the near-infrared quantitative calibration model was established using the method of partial least squares (PLS) based on optimizing the spectral data pretreatment method. The cross-validation RMSECV of calibration model was 0.108, the external-validation RMSEP of calibration model was 0.0822, the average relative deviation was 5.3%, which indicated solanesol content can be predicted quickly and accurately according to the established model. The near-infrared quantitative calibration model was also transferred to other machines by marking transfer method. This achieved rapid detection of solanesol content in different laboratories.

**Key words:** near-infrared diffuse reflectance; flue-cured tobacco; solanesol; calibration model

茄尼醇(Solanesol)是重要的生物活性物质中间体,是泛醌类药物中间体不可替代的成分,即辅酶Q10 和维生素 K 的侧链,在治疗心血管系统疾病<sup>[1]</sup>、癌症<sup>[2]</sup>和肝病<sup>[3]</sup>等方面有独特的疗效。烟草是茄尼醇含量最高的植物,也是目前提取茄尼醇的主要原料。茄尼醇分子量大,沸点高,液相色谱法是目前烟草茄尼醇检测最主要的方法。由于茄尼醇在烟草体内以游离态和化合态(主要以乙酸酯、棕榈酸酯、亚油酸酯)两种形式存在,烟草总茄尼醇的提取需经过复杂的皂化、萃取过程<sup>[4-10]</sup>,方法繁琐,步骤复杂,测定周期长,检测效率低,不利于批量操作,且消耗大量有机溶剂,因此建立一种高效的总茄尼醇(下述中的茄尼醇均指总茄尼醇)检测方法,对于烟草茄尼醇资源的快速筛选具有重要意义。

近红外光谱具有分析速度快、样品前处理简单、低消耗、多组分同时测定和适合在线检测等诸多优点,成为近年来发展最快、引人注目的一门独立的分析技术。本研究首次利用近红外漫反射光谱技术建立了烤烟烟叶中总茄尼醇的定量分析模型,对烟叶中的茄尼醇进行快速准确的测定。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、仪器

2010~2011 年,在我国主要烤烟生产省份(云南、贵州、四川、重庆、湖南、湖北、福建、广西、山东、河南、黑龙江、辽宁、吉林、陕西),分别选取 1~6 个代表产地,每产地选取一套等级(B2F、C3F、C3L、X2F)代表样品,共选取样品 243 份。用其中 80% (193 个)的样品作为建模样品集(校正集),20% (50 个)作为验证样品集(验证集)和转移样品(表 1)。

Aataris II FT-NIR 光谱仪(Thermo Fisher 公司),

收稿日期:2014-08-15 接受日期:2014-12-02

基金项目:中国农业科学院基本科研业务费预算增量项目(2013ZL026)

\* 通讯作者 Tel:86-532-88701035;E-mail:duyongmei@caas.com

配有积分球漫反射采样系统, Result 操作软件, TQ Analyst 8.0 分析软件; 超高效液相色谱仪(Waters, H-Class), KQ-500GVDV 型恒温超声器(上海昆山),

Sartorius 电子天平(精度 0.0001 g), 立鹤牌 302 型烘箱(山东潍坊), SY-III型实验用切丝机(河南富邦实业有限公司)。

表 1 校正集和验证集茄尼醇含量分布

Table 1 Content distribution of solanesol in calibration and validation set

样品集 Sample collection	样品数 Number of samples	最大值 Max(%)	最小值 Min(%)	平均值 Mean(%)
校正集 Calibration set	193	3.48	0.13	1.37
验证集 Validation set	50	2.99	0.15	1.27

## 1.2 研究方法

### 1.2.1 样品制备

由外观鉴定专家根据 GB2623-92《烤烟》对选择样品进行等级平衡、鉴定及品质评价后,选取代表等级烟叶 3~5 kg,去筋,切丝( $0.9 \pm 0.1$  mm),混匀,取 100 g 烟丝放入烘箱内,60 ℃烘干后制成粉末(60 目),进行近红外光谱采集。

### 1.2.2 茄尼醇化学值的测定

称取烟草粉末样品 0.1 g(精确至 0.0001 g), 放入 20 mL 带有聚四氟乙烯密封盖的离心玻璃管中, 用移液管加入 1.0 mL 的氢氧化钠乙醇(0.1 mol/L)溶液及 5.000 mL 正己烷溶液, 盖上密封盖, 振荡, 混匀, 放入恒温超声提取器中, 在超声频率 45 KHz, 温度 40 ℃ 条件下, 提取 30 min, 取出, 冷却至室温, 旋开密封盖, 加入 8 mL 去离子水, 盖紧瓶盖, 充分振荡后, 放入离心机, 3000 rpm, 离心 10 min 取出, 用移液枪移取 0.500 mL 离心管中上层正己烷茄尼醇提取液, 流动相稀释至 5.000 mL, 用 0.22 μm 有机滤膜过滤至液相色谱安培瓶中, 应用超高效液相色谱(UPLC)进行检测。

色谱条件:色谱柱:BEH C<sub>18</sub>(1.7 μm, 2.1 × 100 mm),流动相:甲醇:乙腈 = 50:50,流速:0.5 mL/min,柱温:35 ℃,检测波长:210 nm。茄尼醇液相色谱图见图 1。

该方法为本实验室开发(ZL201310282917.0), 试验的加标回收率范围为 93.4%~102.3%, RSD

范围为 1.61%~2.43%, 方法精密度 RSD 为 2.49%, 回收率和精密度较高, 符合定量分析要求。

### 1.2.3 近红外光谱采集

取烟叶样品粉末 20 g 置石英测量杯中, 加上压样器, 放在旋转台内进行光谱采集。采集条件:以仪器内置背景为参比, 波数范围:10000~3800 cm<sup>-1</sup>, 扫描次数:64 次, 分辨率:8 cm<sup>-1</sup>。实验室温度控制在 20~24 ℃。

### 1.2.4 定量校正模型的建立

应用 TQ Analyst 8.0 分析软件中的偏最小二乘(PLS)回归算法, 把采集的近红外漫反射光谱数据与化学方法测定的茄尼醇的化学值, 采用留一(leave-one-out)交叉验证法建立校正模型, 并进一步优化验证, 以校正模型的相关系数(R)、校正均方差(RMSEC)、交叉验证均方差(RMSECV)、预测均方差(RMSEP)等指标来考察模型的建模效果, 所有参数的计算方法见文献<sup>[11,12]</sup>。通常相关系数越接近 100%, 均方差越小, 表示模型的预测值越接近化学值, 拟合效果越好。模型建立以后, 用外部验证来检验模型的预测能力。

### 1.2.5 模型传递

分别采用无标转移和有标转移两种方法进行模型传递, 无标转移是将模型直接传递到其他仪器上; 有标转移是先将转移样品的一部分添加在待转移仪器模型上, 重新计算模型, 得到一个新模型, 然后用其他转移样品考察新模型的预测效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同预处理方法对校正模型的影响

近红外光谱在采集过程中, 为了消除样品的颗粒大小、装样条件、仪器条件等影响而产生的光谱基线漂移和偏移及信噪比降低等问题, 通常采用平滑和求导的方法进行数学预处理<sup>[13]</sup>。表 2 为分别采

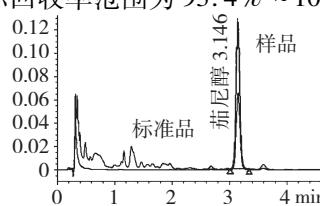


图 1 茄尼醇液相色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of solanesol

用原始光谱、一阶导数和二阶导数光谱建立模型时的相关系数(R)、交叉验证均方差(RMSECV)、预测均方差(RMSEP)。结果表明,茄尼醇模型采用一阶导数,Savitzky Golay 平滑建模时,得到了较低的交叉验证均方差(RMSECV)。二阶导数虽然取得了较高

的相关系数,但交叉验证过程中均方差(RMSECV)和预测均方差(RMSEP)均较高,结合主因子数考察发现模型有“过拟合”现象。因此光谱预处理选择一阶导数,Savitzky Golay 平滑建立了茄尼醇的定量校正模型。

表 2 不同预处理方法对校正模型 RMSECV 的影响

Table 2 Effect of different pretreatment methods on the correction model of RMSECV

光谱预处理方法 Spectral pretreatment methods	校正模型 相关系数 R	校正均方差 RMSEC	预测均方差 RMSEP	交叉验证均方差 RMSECV
原始光谱 Original spectra	0.98849	0.0927	0.115	0.123(19)
一阶导数 First derivative	0.99359	0.0692	0.0952	0.132(11)
二阶导数 Second derivative	0.99953	0.0188	0.206	0.271(9)

## 2.2 谱区范围选择对校正模型的影响

表 3 为使用不同谱区的光谱信息建立校正模型时的相关系数 R 和均方差 RMSECV 值,其中谱区  $10000 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$  为全谱区,括号内数字为 PLS 主因子阶数。从表 3 数据可以看出,谱区范围的选择对

定量分析精度影响较大。茄尼醇模型采取一阶导数预处理并用不同谱区范围建立的模型中,以  $7836.02 \sim 3893.62 \text{ cm}^{-1}$  建立校正模型的均方差 RMSECV (0.121) 最小,因此选择  $7836.02 \sim 3893.62 \text{ cm}^{-1}$  谱区作为茄尼醇模型的最佳建模谱区。

表 3 不同谱区范围对 RMSECV 的影响

Table 3 Effect of different spectral range on RMSECV

光谱预处理方法 Spectral range	校正模型 相关系数 R	校正均方差 RMSEC	预测均方差 RMSEP	交叉验证均方差 RMSECV
4000-8000	0.99040	0.0847	0.0852	0.122(12)
7508.32-3948.17	0.98980	0.0873	0.0798	0.124(12)
7550.07-6637.66,6333.53-3995.87	0.98950	0.0885	0.0841	0.122(12)
7836.02-3893.62	0.99143	0.0800	0.0819	0.121(13)

## 2.3 模型的优化与外部验证

基于前述得到的建模参数,即建立了茄尼醇的定量分析校正模型。然后对模型进一步优化,通过判断和剔除异常样品(Outlier)和强影响点<sup>[14]</sup>,确定

最优主因子,获得了茄尼醇的最佳校正模型,模型交叉验证均方差 RMSECV 为 0.108。优化后模型的各项参数见表 4,NIR 预测值与化学值的散点图见图 2。

表 4 茄尼醇校正模型的数理指标

Table 4 Statistics results for calibration models

光谱预处理方法 Spectral range	校正模型 相关系数 R	校正均方差 RMSEC	预测均方差 RMSEP	交叉验证均方差 RMSECV
7836.02-3893.62	0.99302	0.0716	0.0822	0.108(13)

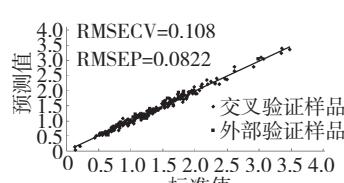


图 2 茄尼醇的化学值与模型预测值的散点图

Fig. 2 Scatter plot of NIR predicted and chemical value

为了检验模型的预测能力,通常选用一批未参与建模的样品对模型进行外部验证,本文用前述的 50 个验证集样品对模型进行预测,通过预测值和化学值的内部交叉验证均方差(RMSECV)和预测均方差(RMSEP)检验模型的预测能力。从茄尼醇预测模型的预测值和化学值散点图和相关图(图 2、图

3)看出,NIR 预测值能够很好的逼近标准值,达到较低的预测均方差和相对偏差,其 RMSEP 为 0.0822,化学值和 NIR 预测值的平均相对偏差为 5.3%。利用 DPS v7.05 统计分析软件,通过配对 *t* 检验进一步验证发现,P 值(双尾)为 0.831,大于 0.05,说明化学方法和近红外速测两种方法不存在显著差异,即没有系统误差,模型具有很好的预测能力。

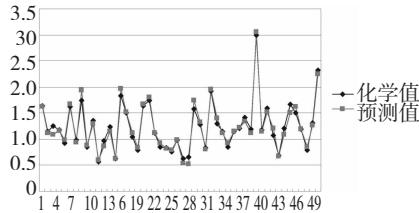


图 3 模型预测值和化学值的相关图

Fig. 3 Correlogram between model predicted values and chemical values

## 2.4 模型传递

50 个转移样品分别用无标转移(即直接转移)和有标转移法将模型转移到另一台近红外仪器(从仪器)上,“从仪器”与“主仪器”型号相同,均为 Aatas II FT-NIR 光谱仪(Thermo Fisher 公司)。无标转移和有标转移模型效果图见图 4,从图 4 看出无标转移法中“从仪器”光谱产生了较大的系统偏差,转移样品产生较大偏离,造成模型的预测均方差较大,无标转移效果不是很理想,因此考虑采用有标转移法。将 50 个转移样品中的 10 个添加到“从仪器”的模型里,重新计算模型,得到了“从仪器”的模型,转移模型的相关系数及预测均方差见表 5,由表 5 和图 4 可知,虽然两种转移方法“主仪器”和“从仪器”模型的各项参数接近,但有标转移模型的预测均方差 RMSEP(0.114)更低,转移效果更佳,模型成功地转移到“从仪器”上。

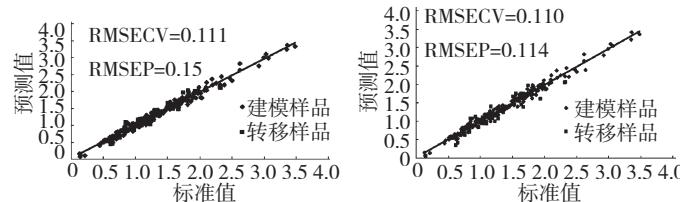


图 4 模型转移效果图  
Fig. 4 Model transfer renderings

表 5 转移模型无标转移和有标转移的各项参数

Table 5 Parameters of calibration transfer without standard sample and calibration transfer with standard sample

方法 Transfer method	校正模型 相关系数 R	校正均方差 RMSEC	预测均方差 RMSEP	交叉验证均方差 RMSECV
无标转移 Calibration transfer without standard sample	0.99165	0.0785	0.15	0.111(13)
有标转移 Calibration transfer with standard sample	0.99195	0.0768	0.114	0.11(13)

## 3 结论

选取具有代表性的建模样品,采用一阶导数预处理光谱,选择 7836.02 ~ 3893.62 cm<sup>-1</sup> 谱区建立了较高准确性的茄尼醇近红外预测模型,模型内部交叉验证均方差(RMSECV)为 0.108,外部验证的预测均方差(RMSEP)为 0.0822,平均相对偏差为 5.3%,结果表明近红外预测值与化学值结果较为一致。并通过有标转移法成功地将模型转移到其它仪器上,实现了不同实验室对批量样品的快速检测,同时也为筛选高含量茄尼醇品种提供了快速有效的方法。

## 参考文献

- Niibori K, Yokoyama H, Crestanello JA, et al. Acute administration of liposomal coenzyme Q10 increases myocardial tissue levels and improves tolerance to ischemia reperfusion injury. *J Surg Res*, 1998, 79:141-145.
- Portakal O, Ozkaya O, Erden Inal M, et al. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem*, 2000, 33:279-284.
- Portakal O, Inal-Erden M. Effects of pentoxifylline and coenzyme Q10 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Biochem*, 1999, 32:461-466.
- Severson RF, Ellington JJ, Schlotzhauer PF, et al. Gas chrom-

- atographic method for the determination of free and total solanesol in tobacco. *J Chromatogr A*, 1977, 139:269-282.
- 5 Tao YH(陶云海), Ren ZY(任周阳), Liu GQ(刘国清), et al. Extract and quantitative determination of solanesol from discarded tobacco in Yunnan province. *J Yunnan Univ, Nat Sci* (云南大学学报, 自科版), 2002, 24:151-152.
- 6 Tong KQ(童康琼), Lan MR(兰明蓉), Zhao YF(赵云飞), et al. Determination of total solanesol in tobacco leaf with HPLC. *Tobacco Sci Tech* (烟草科技), 2008, 248(3): 49-52.
- 7 Sun YH(孙银合), Huang RL(黄仁亮), Xing XX(邢肖肖), et al. Enhanced extraction of solanesol from tobacco leaves by a new ammonia leaching pretreatment method. *Fine Chem* (精细化工), 2013, 30:32-35.
- 8 Pan W(潘葳), Liu WJ(刘文静), Weng BQ(翁伯琦), et al. Determining solanesolin in tobacco leaves and its extracts using HPLC standardized method. *Chin Tob Sci* (中国烟草科学), 2013, 34(4):60-66.
- 9 Zhang J(张婕), Wang YS(汪云松), Cai K(蔡凯), et al. Determination of solanesol content in tobacco leaves by using ultra-high pressure liquid chromatography. *Chin Tob Sci* (中
- 国烟草科学), 2013, 33(6):80-84.
- 10 Yang J(杨靖), Li RL(李瑞丽), Sun ZT(孙志涛), et al. Study on the technology of supercritical CO<sub>2</sub> extraction solanesol from tobacco leaves. *Food Ind* (食品工业), 2012, 33(8):35-38.
- 11 Yan YL(严衍禄). *Near Infrared Spectrum Analysis and Application* (近红外光谱分析基础与应用). Beijing: China Light Industry Press, 2005. 169-174.
- 12 Blanco M, Coello J, Iturriaga H, et al. NIR calibration in non-linear systems: different PLS approaches and artificial neural networks. *Chemom Intell Lab Syst*, 2000, 50:75-82.
- 13 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, 25:358-362.
- 14 Wang JJ(王家俊), Liang YZ(梁逸曾), Wang F(汪帆). Simultaneous determination of tar, nicotine and carbon monoxide in smoking by partial least squares and fourier transform near infrared transmission spectrometry. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2005, 33:793-797.

(上接第 76 页)

- 2 Li YJ(李勇军), Luo HF(骆洪峰), Wang YL(王永林), et al. Studies on the chemical constituents of flavonoids from *Polygonum capitatum*. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 35:3004.
- 3 Li YM(李咏梅), Gong Y(龚元). The latest research progression for the chemical constituents and pharmacology of *Polygonum capitatum*. *J Guizhou Univ, Nat Sci* (贵州大学学报, 自科版), 2007, 24:205.
- 4 Liu ZJ(刘志军), Qi J(戚进), Zhu DN(朱丹妮), et al. Chemical constituents from *Polygonum capitatum* and their antioxidation activities *in vitro*. *J Chin Med Mat* (中药材), 2008, 31:995-998.
- 5 Yu M(于明), Li ZL(李占林), Li N(李宁), et al. Chemical constituents of the aerial parts of *Polygonum capitatum*. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2008, 25:633-635.
- 6 Yang Y(杨阳), Cai F(蔡飞), Yang Q(杨琦), et al. Study on chemical constituents of *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2009, 30:937-939.
- 7 Li X, Yu M, Meng D, et al. A new chromone glycoside from *Polygonum capitatum*. *Fitoterapia*, 2007, 78:506-509.
- 8 Liao SG, Zhang LJ, Sun F, et al. Antibacterial and anti-inflammatory effects of extracts and fractions from *Polygonum capitatum*. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134:1006-1009.
- 9 Zhao HX(赵焕新), Bai H(白虹), Li W(李巍), et al. Chemical constituents from *Polygonum capitatum*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23:262-266.
- 10 Yang BB(杨蓓蓓), Feng R(冯茹), Wang WC(王维聪), et al. Quantitative analysis of three active constituents in Miao regional herb, *Polygonum capitatum* by HPLC/DAD/MS. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 20:1793-1796.
- 11 Wu HM(吴红梅), He HY(贺祝英), Wang XS(王祥森). Determination of gallic acid and quercitrin in *Polygonum capitatum* by HPLC. *Lishizhen Med Mater Res* (时珍国医国药), 2011, 20:18-19.
- 12 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, 11.