

近红外光谱法快速测定女贞子中特女贞苷的含量

张迪文, 白雁*, 谢彩侠, 胡小莉, 郝敏, 谢惠英

河南中医学院药学院, 郑州 450046

摘要:应用近红外漫反射光谱法快速测定女贞子中特女贞苷的含量。运用近红外光谱技术(NIRS)结合偏最小二乘法(PLS)建立不同产地女贞子中特女贞苷含量的定量校正模型。特女贞苷的定量校正模型内部交叉验证决定系数(R^2)为0.98075,校正均方根偏差(RMSEC)为0.216,预测均方根偏差(RMSEP)为0.223,交互验证均方根偏差(RMSECV)为0.52276。该方法具有简便快速,准确无损,可用于女贞子中特女贞苷含量的快速测定。

关键词:近红外光谱;偏最小二乘法;女贞子;特女贞苷;含量测定

中图分类号:R284.2;O657.3

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.08.012

Rapid Determination of Specnuezhenide in Fructus Ligustri Lucidum by Near Infrared Spectroscopy

ZHANG Di-wen, BAI Yan*, XIE Cai-xia, HU Xiao-li, HAO Min, XIE Hui-ying

Henan University of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy, Zhengzhou 450046, Chian

Abstract: The objective of this study was to determine the content of specnuezhenide in different habitat Fructus Ligustri Lucidum by near infrared spectroscopy. The near infrared spectroscopy was combined with partial least squares (PLS) analysis to establish the quantitative model of specnuezhenide in different habitat Fructus Ligustri Lucidum. The correlation coefficients (R^2) of the quantitative calibration model for specnuezhenide was 0.98075, the root mean square error of calibration (RMSEC) was 0.216, the root mean square error of predication (RMSEP) was 0.223, the root mean square error of cross validation (RMSECV) was 0.52276. The developed method was convenient and accurate. It was feasible to determine the content of specnuezhenide in Fructus Ligustri Lucidum rapidly.

Key words: near-infrared spectroscopy; partial least squares; Fructus Ligustri Lucidum; specnuezhenide; content determination

女贞子(Fructus Ligustri Lucidum)是木犀科植物女贞(*Ligustrum lucidum* Ait.)的干燥成熟果实,是一味传统的扶正固本药物,具有滋补肝肾、明目乌发之功效^[1]。临床主要用于眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明等症^[2]。女贞子含有多种化学成分,最先发现的是含有较高含量的齐墩果酸、乙酰齐墩果酸、熊果酸等^[3]。2010年版《中国药典》记载的女贞子药材的标准是以高效液相色谱法测定特女贞苷含量。供试品的制备要经过精密称定,加热回流,补足失重等多个步骤,处理过程较为繁琐复杂。

近红外光谱技术结合了光谱衡量技术、化学计量学技术和基础测量技术,能够快速、高效、无损的

对样品进行定性和定量分析^[4-6]。近红外光谱技术通过对样品一次测定,就可以在几秒至几分钟内同时测定一个样品的几种至十几种性质数据^[7]。本文对女贞子药材中指标性成分特女贞苷的含量做了相关研究,并利用近红外光谱技术上述优点,结合偏最小二乘法建立女贞子药材中特女贞苷含量的定量分析模型,为女贞子药材的质量检测与分析评价提供了快捷简便的新方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Nicolet 6700型傅里叶变换近红外光谱仪(配有InGaAs检测器,50 mL标准石英样品杯,漫反射积分球,样品旋转器以及OMNIC光谱采集软件,TQ Analyst 8.0分析软件,美国Thermo公司),SZ-93型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂),FW-200

型高速药材粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司), 101A-2B 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司), METTLER TOLEDO AL204 型 1/万分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), HS-6150 型超声波清洗仪(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试药

女贞子药材为采购于四川、湖南、浙江、河南 4 个产地共 91 份样品, 由河南中医学院董诚明教授鉴定为木犀科女贞属植物女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait.) 的干燥成熟果实。

乙醇、蒸馏水均为分析纯, 甲醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 近红外光谱的采集

取上述 91 份样品适量, 粉碎, 过 40 目筛, 取约 5 g 粉末装入石英杯, 混合均匀, 采用积分球漫反射, 以空气为参比, 扣除背景采集光谱图。采集参数如下: 分辨率 8 cm^{-1} , 光谱采集范围 $12000\sim 4000\text{ cm}^{-1}$, 扫描次数 64 次, 每次扫描背景间隔 20 min。温度 $25\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $17\%\sim 20\%$ 。每份样品重复扫

描 3 次, 求平均光谱, 91 份样品的近红外光谱叠加图见图 1。

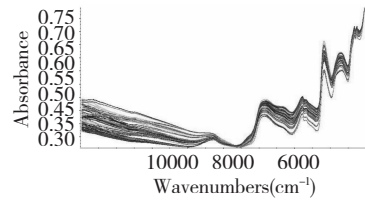


图 1 91 份女贞子的近红外原始光谱叠加图

Fig. 1 The overlaid near-infrared reflectance spectra of 91 samples

2.2 特女贞苷参考值的 HPLC 测定

参照 2010 年版《中国药典》一部中女贞子项下特女贞苷的 HPLC 含量测定方法进行测定。本实验采用的色谱条件: Dikma Diamonsil C_{18} 色谱柱 ($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$), 流动相: 甲醇-水 ($40:60$), 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$, 流速: 1 mL/min , 检测波长: 224 nm 。以保留时间定性, 峰面积定量, 外标法计算。每份样品平行测定两次, 计算平均值, 并以其作为参考值, 女贞子药材中特女贞苷的含量结果见表 1。

表 1 91 份女贞子药材中特女贞苷含量

Table 1 The content of specnuezhenide in 91 samples

样品编号 Lot No.	特女贞苷 Specnuezhenide (%)	样品编号 Lot No.	特女贞苷 Specnuezhenide (%)	样品编号 Lot No.	特女贞苷 Specnuezhenide (%)
1	6.71	32	4.49	63	6.92
2	7.67	33	4.71	64	6.82
3	6.50	34	4.41	65	4.08
4	7.36	35	4.59	66	4.13
5	8.06	36	3.98	67	3.96
6	6.92	37	4.49	68	4.86
7	7.02	38	4.50	69	4.68
8	6.41	39	4.55	70	4.71
9	6.41	40	4.68	71	6.09
10	6.42	41	5.15	72	5.95
11	6.49	42	5.65	73	6.16
12	6.71	43	4.89	74	6.05
13	6.92	44	2.91	75	5.66
14	6.00	45	3.52	76	5.81
15	6.17	46	3.07	77	5.59
16	6.19	47	4.73	78	6.12
17	6.40	48	4.87	79	6.39

18	5.93	49	4.77	80	5.87
19	5.72	50	4.77	81	6.06
20	5.66	51	5.23	82	6.15
21	5.89	52	4.66	83	5.90
22	5.69	53	3.17	84	5.85
23	5.44	54	3.33	85	5.94
24	5.75	55	3.40	86	6.30
25	5.70	56	7.38	87	6.02
26	5.01	57	6.89	88	5.95
27	4.94	58	6.83	89	5.12
28	4.72	59	5.74	90	5.47
29	5.26	60	5.90	91	5.49
30	4.77	61	5.66		
31	4.84	62	6.44		

2.3 建立特女贞苷近红外定量分析模型

2.3.1 校正集和验证集样品的选择

根据女贞子药材中特女贞苷含量分布情况,从 91 份样品中选取 71 份具有代表性的样品组成校正集,用于建立近红外模型;其余 20 份样品组成验证

集,对模型进行验证。校正集与验证集的选择原则为验证集的特女贞苷含量分布范围应在校正集的特女贞苷含量分布范围之内。表 2 为校正集和验证集样品的特女贞苷含量的分布范围。

表 2 校正集与验证集样品的特女贞苷含量分布范围

Table 2 The content distribution of calibration set and validation set for specnuezhenide content

样品 Sample set	样本数 Number	特女贞苷 Specnuezhenide (%)		
		最大值 Max	最小值 Min	平均值 Mean
校正集 Calibration	71	8.06	2.91	5.52
验证集 Validation	20	6.92	3.33	5.58

2.3.2 光谱预处理方法的选择

在建立近红外定量分析模型前,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。常用的预处理方法有多元散射校正法(MSC),标准归一化法(SNV),一阶导数法(First derivative),二阶导数法(Second derivative),Savitzky-Golay 滤波法,Norris derivative 滤波法^[8]等。表 3 为使用不同的预处理方法后,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 模型越好,真实值和预测值相关性越好;RMSEC 和 RMSEP 越小且越接近越好,所建模型的适用性越强,预测结果越准确^[9];同时,要保证 RMSEC 应小于 RMSEP,否则会出现过拟合现象^[10]。本实验结果以 SNV + SD + ND 预处理效果最好,可以消除样品光谱噪音以及漂移所造成的影响,强化样品近红外光谱的谱带特征,并克服样品谱带重叠的现象,因此选用此法为光谱预处理的最佳方法。

表 3 不同预处理方法对定量模型性能的影响

Table 3 The effects of different pretreatment methods on quantitative model performance

光谱预处理方法 Pretreatment methods	R^2	RMSEC	RMSEP
Constant	0.96863	0.275	0.303

MSC + First Derivative	0.97645	0.239	0.216
MSC + Second Derivative	0.95530	0.327	0.376
SNV + Second Derivative	0.95502	0.328	0.381
SNV + First Derivative	0.97286	0.256	0.207
MSC + ND + First Derivative	0.95466	0.330	0.256
MSC + ND + Second Derivative	0.97093	0.265	0.270
MSC + SG + First Derivative	0.97463	0.248	0.216
MSC + SG + Second Derivative	0.97935	0.224	0.224
SNV + SG + First Derivative	0.97017	0.268	0.207
SNV + SG + Second Derivative	0.98075	0.216	0.223
SNV + ND + First Derivative	0.95410	0.332	0.248
SNV + ND + Second Derivative	0.97016	0.269	0.267

SNV + SD + ND 最佳光谱预处理方法处理后得到的近红外光谱见图 2。

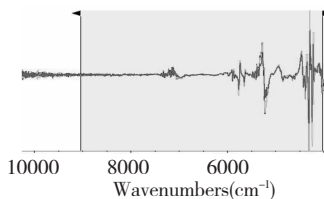


图 2 预处理后的近红外光谱

Fig. 2 The near-infrared reflectance spectra after pretreatment

2.3.3 建模波段的选择

在建立模型时需要不断地选择波段范围以调整模型的准确性,以 R^2 和 RMSECV 为指标,其中, R^2 越接近 1, RMSECV 越小,模型越好。采用最佳预处理方法,即 SNV + SD + ND,对不同的波段进行手动优化比较,选择最佳波段范围。结果见表 4,在波段区间 4007.35 ~ 9987.74 cm^{-1} , R^2 最接近 1, RMSECV 最小,故此波段选为最佳建模波段。

表 4 不同光谱范围对 R^2 和 RMSECV 的影响

Table 4 The effects of different spectral range on R^2 and RMSECV

光谱范围 Spectral range (cm^{-1})	相关系数 R^2	内部交叉验证均方差 RMSECV
4008.11 ~ 11694.22	0.83162	0.91386
5623.41 ~ 10997.76	0.87580	0.84960
5623.41 ~ 9231.73	0.97489	0.74548
5883.19 ~ 9219.51	0.97736	0.77199
6348.27 ~ 9219.51	0.91813	0.99998
4007.35 ~ 9987.74	0.98075	0.52276

2.3.4 主成分数的选择

在建模过程中,采用不同的主成分数,模型的预测能力不同,主成分数太多,模型包含过多的测量噪音,校正过程会出现过拟合现象;主成分数太少,建模信息不全,预测能力差^[11]。采用内部交叉验证考察主成分数对内部交叉验证均方差 (RESECV) 的影响, RESECV 随主成分数变化的曲线见图 3。从图中可以看出,当偏最小二乘法因子数为 7 时, RESECV 最小,为最佳建模主成分数。

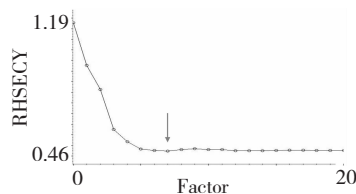


图 3 主成分数对 RMSECV 的影响

Fig. 3 The RMSECV value with different factors for specnuzhenide

2.4 定量模型的建立

运用 TQ Analyst8.0 分析软件,91 份样品进行建模,对光谱采用 SNV + SD + ND 预处理方法,在 4007.35 ~ 9987.74 cm^{-1} 波段范围,7 个主成分数进行建模。用校正集样品进行内部验证, R^2 为 0.98075, RMSEC 为 0.216, RMSEP 为 0.223, RMSECV 为 0.52276。特女贞苷的 NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关图见图 4,偏差图见图 5,可以看出预测值与参考值的相关性较高,且结果很接近,模型的性能较好,该模型可以用于女贞子药材中特女贞苷的定量分析。

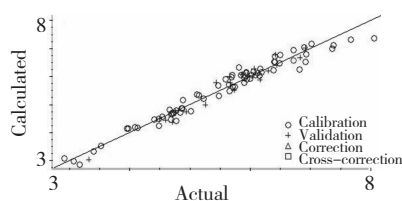


图4 特女贞苷 NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关图

Fig. 4 Correlation between NIR predicted and reference values for specnuezhenide

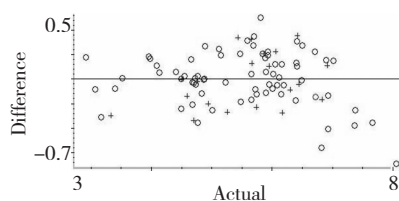


图5 特女贞苷 NIR 预测值与 HPLC 参考值的偏差图

Fig. 5 Deviation between NIR predicted and reference values for specnuezhenide

2.5 定量模型的验证

为评价模型的实际预测效果,将 20 份验证集样品的近红外光谱输入所建定量模型中,预测其特女贞苷的含量,结果见表 5。验证集的最大绝对误差

为 0.35%,最小绝对误差为 0.00%,相对误差均不超过 5.83%,平均相对误差为 2.83%。由此可见 NIR 预测值与 HPLC 参考值非常接近,该定量分析模型准确可靠,预测能力较好,可以准确预测相应范围内女贞子药材中特女贞苷的含量。

表5 20 份验证集样品的近红外定量模型预测值

Table 5 NIR predicted values of 20 validation set

编号 Lot No.	参考值 Reference value (%)	预测值 Prediction value (%)	绝对误差 Absolute error	相对误差 Relative error (%)	平均相对误差 Average relative error (%)
1	6.92	7.03	0.11	1.59	
2	6.42	6.77	0.35	5.45	
3	6.17	5.89	-0.28	4.53	
4	5.66	5.79	0.13	2.29	
5	5.44	5.57	0.13	2.38	
6	5.66	5.99	0.33	5.83	
7	5.87	6.08	0.21	3.57	
8	6.06	6.29	0.23	3.79	
9	6.30	6.21	-0.09	1.42	
10	5.95	6.05	0.10	1.68	
11	5.74	5.51	-0.23	4.00	2.83
12	6.83	6.66	-0.17	2.48	
13	3.33	3.23	-0.10	3.00	
14	6.44	6.40	-0.04	0.62	
15	4.94	4.74	-0.20	4.04	
16	5.26	4.98	-0.28	5.32	
17	4.77	4.75	-0.02	0.41	
18	4.71	4.66	-0.05	1.06	
19	4.59	4.45	-0.14	3.05	
20	4.50	4.50	0.00	0.00	

3 讨论

本实验采用 2010 年版《中国药典》一部中女贞子项下特女贞苷的 HPLC 含量测定方法进行测定,并对每份样品平行重复测定 2 次,取 2 次测定结果的平均值作为建立近红外定量分析模型的 NIR 参考值,可以保证所建模型的准确性。

近红外定量分析模型的适用范围取决于校正集样品指标性成分的含量范围。本实验收集到的女贞子药材来自浙江、湖南、河南、四川等多个产地,涵盖范围较广且分布较为均匀,具有一定的代表性。因此,所建模型适用性较强,可用于女贞子药材中指标性成分特女贞苷的含量预测。

本实验运用近红外光谱技术结合偏最小二乘法

建立了一种快速测定女贞子药材中特女贞苷含量的新方法,该方法简单准确,快速无污染。相比2010年版《中国药典》中规定采用高效液相色谱法对女贞子中特女贞苷进行含量测定,虽然HPLC的测定结果较准确,但是其前处理繁琐复杂,且化学试剂污染空气环境,测定过程较长。反观近红外光谱技术,分析速度快,获得信息多,简便快捷,非破坏性分析等优点使其成为一种“绿色”分析技术,测定过程不用化学试剂、不污染环境,真正实现“绿色”检验,节约检测成本,将会在中药制药行业发挥越来越大的作用。

参考文献

- 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, 43.
- Huang W(黄雯), Su ZR(苏子仁), Bi WC(毕文川), et al. HPLC determination of nuezhenide in Fructus Ligustri Lucidi. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009, 29: 824-826.
- Zhang FP(张凤普). HPLC determination of nuezhenide in Fructus Ligustri Lucidi. *Chin J Clin Ration Drug Use*(临床合理用药), 2010, 3(3): 72-73.
- Fu QJ(付秋娟), Du YM(杜咏梅), Zhang HB(张怀宝), et al. Determination of solanesol content of flue-cured tobacco leaves by near-infrared diffuse reflectance technology. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27: 84-88.
- Fu XH(付小环), Hu JH(胡军华), Li JC(李家春), et al. Qualitative and quantitative detection of *Poria cocos* by near infrared reflectance spectroscopy. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2015, 40: 280-286.
- Zhang Q(张强), Bai Y(白雁), Lei JW(雷敬卫), et al. Rapid determination of water-extract in Jingtongxiao pills by near-infrared spectroscopy. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(4): 52-55.
- Zhou WT(周文婷), Lin P(林萍), Wang HX(王海霞), et al. NIR spectroscopy technology and its application in evaluating the quality of traditional Chinese medicine. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), 2014, 53: 3231-3233.
- Bai Y(白雁). Modern Near Infrared Spectroscopy in Medicine and Food Quality Evaluation System. Beijing: Higher Education Press, 2009. 80-82.
- Lei JW(雷敬卫), Fan MY(樊明月), Guo YL(郭艳丽), et al. Rapid determination of costunolide and dehydrocostus lactone in Radix Aucklandiae by near-infrared spectroscopy. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26: 1062-1066.
- Bai Y(白雁), Li XQ(李小庆), Lei JW(雷敬卫). Rapid determination of paeoniflor 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.
- Lu WZ(陆婉珍). Modern Near Infrared Spectroscopy. Beijing: China Petrochemical Press, 2007. 44.
- (上接第1452页)
- Tuba E, Victor W, Peter W. Dimeric procyanidins screening for B1 to B8 and semisynthetic preparation of B3, B4, B6, and B8 from a polymeric procyanidin fraction of white willow bark (*Salix alba*). *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 7820-7830.
- Silva BM, Andrade PB, Valentao P, et al. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (Pulp, Peel and seed) and jam: antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 4405-4712.
- Hamazu Y, Takaroni I, Kume C, et al. Antioxidant and anti-ulcerative properties of phenolics from Chinese quince, quince, and apple fruits. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 765-772.
- Sami F, Caboni P, Coroneo V, et al. Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 963-969.
- Antonio F, Brigida D, et al. Isolation and structure elucidation of antioxidant polyphenols from quince (*Cydonia vulgaris*) peels. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 2660-2667.
- Gulsimayi A(古丽斯玛依·艾拜都拉), Gulnur M(古丽努尔·买买提), Akbar I(艾克帕尔·斯马依), et al. Antibacterial effect of flavone extract from Xinjiang *Cydonia oblonga* Mill. *Food Sci*(食品科学), 2009, 3: 134-136.
- Wang MT(汪茂田), Xie PS(谢培山), Wang ZD(王忠东), et al. Isolation and Structure Elucidation of Natural Organic Compounds (天然有机化合物提取分离与结构鉴定). Beijing: Chemical Industry Press, 2004. 100.
- Reyimgul A(热依木古丽·阿布都拉), Lai HZ(来海中), Liu ZS(刘照胜), et al. A study on the preparation techniques of extracting polyphenols from the pericarpium granati (*Punica granatum* L.). *J Xinjiang Med Univ*(新疆医科大学学报), 2013, 36: 723-728.
- Hu XX(胡欣欣), Yang YF(杨雁芳), et al. Preliminary exploration of inhibitory activities of *Salvia* species on PTP1B. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2009, 44: 440-442.
- Lin YR(林燕如), Cao QY(曹迁永). Study on the purification of flavonoid from the leaves of *Cibotium baromeu* (L.) J. Sm. by macroporous resin. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), 2011, 50: 583-586.