

厚朴酚近红外光谱的 2D-COS 解析及其在藿香正气口服液模型中应用

裴艳玲, 吴志生*, 史新元, 潘晓宁, 彭严芳, 乔延江*

北京中医药大学, 北京市中药基础与新药研究重点实验室, 北京 100102

摘要 以氘代氯仿为溶剂, 以中药化学标准品厚朴酚为载体, 采用二维相关光谱(Two-dimensional correlation spectroscopy, 2D-COS)技术, 采集近红外光谱(near infrared spectroscopy, NIR), 由氘代氯仿纯溶剂与厚朴酚原始光谱的二维相关同步谱可知, 厚朴酚在 1 365~1 455, 1 600~1 720, 2 000~2 181 和 2 275~2 465 nm 处有特征吸收, 其中 1 440 nm 为酚基 O—H 伸缩振动基频的一级倍频谱带, 1 679 nm 为芳基 C—H 及与芳基相连的甲基 C—H 伸缩振动一级倍频谱带, 2 117, 2 304, 2 339 和 2 370 nm 为芳基 C—H 伸缩振动、弯曲振动和变形振动的组合频, 2 445 nm 为芳基相连的甲基 C—H 弯曲振动基频二级倍频谱带, 这些波段为厚朴酚的特征归属。以藿香正气口服液复杂体系为载体, 以厚朴酚光谱解析的特征波段与间隔偏最小二乘(interval partial least squares, iPLS)和组合间隔偏最小二乘(synergy interval partial least squares, SiPLS)筛选的特征波段分别建立偏最小二乘(partial least squares, PLS)定量模型, 模型的決定系数 R_{cal}^2 和 R_{pre}^2 均大于 0.99, 校正均方根误差(root mean of square error of calibration, RMSEC), 交叉验证均方根误差(root mean of square error of cross validation, RMSECV)和预测均方根误差(root mean of square error of prediction, RMSEP)均较小。结果表明, 2D-COS 技术解析厚朴酚所得波段建立的定量模型与 iPLS 和 SiPLS 波段筛选的模型均相对稳定, 这使定量模型的波段选择更具有解释性。该研究为中药化学成分 NIR 光谱解析特征波段的归属提供方法参考, 同时为 NIR 建模波段筛选提供借鉴和指导。

关键词 厚朴酚; 近红外光谱; 二维相关光谱; 藿香正气口服液; 光谱解析

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2015)08-2119-05

引言

中药过程质量控制是中药现代化、国际化的关键问题之一^[1, 2], 近红外光谱(NIR)以其快速、无损、实时、可靠等优点成为突出的过程分析技术^[3-5]。目前, NIR 在建立定量模型的过程中, 同一种物质由于使用不同的化学计量学手段进行波段筛选, 所得到的建模波段并不相同, 这使得波段筛选缺乏科学性解析^[6-8]。同时, 由于 NIR 谱带严重重叠, 谱峰吸收较宽、吸收信号弱等特点, 导致 NIR 光谱解析较为困难, 目前国内外对 NIR 光谱解析研究较少, 中药 NIR 光谱解析研究仍处于空白阶段, 光谱解析是中药 NIR 分析可靠性应用的基础。采用二维相关光谱(2D-COS)技术, 可以发现复杂光谱的特征, 提高光谱分辨率, 对 NIR 进行光谱解析。近红外二维相关光谱(2D-NIR)的研究已有一定进展, 但是并未在中药光谱解析方面做深入研究^[9, 10]。

2D-COS 技术最早在核磁共振领域提出, Noda 教授提出广义 2D-COS 拓展了其应用范围, 主要关注因外界扰动引起的细微的光谱变化。2D-COS 是将光谱信号进行相关性分析, 将光谱信号在二维尺度上展开, 研究其动态光谱, 常用的扰动方式有浓度、温度、压力等^[11-13]。2D-COS 分为同步谱和异步谱, 其中同步自相关峰代表化合物随扰动变化的特征谱带, 即该化合物的特征吸收谱带; 同步交叉峰反映的变化趋势可以找出关联较大的官能团, 从而归属官能团的特征波段^[14, 15]。

藿香正气口服液是由苍术、厚朴、陈皮等 10 味中药组成的复方口服制剂^[16], 具有解表化湿、理气和中之功效, 用于外感风寒、内伤湿滞、夏伤暑湿、脘腹胀痛、呕吐泄泻等症^[17, 18], 因其口感较好, 为水溶性制剂, 尤适用于对酒精过敏和不适宜服用酒精的人群^[19], 在中药大品种二次改造中, 藿香正气口服液也位列其中。2010 版《中华人民共和国药典》(一部)中藿香正气口服液厚朴药材以厚朴酚与和厚朴酚含量

收稿日期: 2014-05-30, 修订日期: 2014-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(81303218)和教育部博士点基金项目(20130013120006)资助

作者简介: 裴艳玲, 女, 1988 年生, 北京中医药大学在读硕士研究生 e-mail: peiyanlingkidd@163.com

* 通讯联系人 e-mail: yjqiao@263.net; wzs@bucm.edu.cn

作为其质量控制指标,控制药品有效成分含量。本文以浓度为扰动条件,以藿香正气口服液中厚朴酚为研究载体,采用 2D-COS 技术对厚朴酚的 NIR 光谱进行解析,并在藿香正气口服液的复杂体系中,以光谱解析的特征波段和化学计量学筛选的波段建立 PLS 定量模型,使 NIR 建模的波段更具有解释性。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

仪器: XDS 型近红外光谱仪(瑞士,万通仪器有限公司),配有 VISION 光谱采集和分析软件,采用透射模式,以仪器内部空气为背景,分辨率为 0.5 nm,扫描范围 400-2500 nm,扫描次数 32 次,每个样品平行测定 3 次,取平均光谱,使用 Unscrambler 9.7 软件进行数据处理。Waters 2695 自动高效液相色谱仪, Waters 2996 检测器(美国, Waters 公司)。Agilent ZORBAX SB C18 色谱柱(5 μm , 4.6 \times 250 mm, 美国, Agilent 公司)。二维相关分析软件采用自编的 matlab 程序。近红外样品管(美国, VWR 公司),移液枪(美国, Eppendorf 公司),容量瓶(中国,北京博美玻璃有限公司)。

材料:厚朴酚标准品(中国食品药品检定研究院,中国),纯度 99%,批号 1107129-200402;氘代氯仿(美国剑桥公司,美国),纯度 99.8%,质谱级,批号 13H-456;甲醇(美国 Fisher 公司,美国),色谱级;藿香正气口服液(太极集团重庆涪陵制药厂有限公司,中国),批号:13050147 010。

1.2 方法

将所购买的同一批次的藿香正气口服液混匀,分别精密量取 0.04, 0.08, 0.12, ..., 1.92, 1.96, 2.00 mL 用水定容至 2 mL,配置成体积分数为 2%-100% 的藿香正气口服液,采用 HPLC 方法测量藿香正气口服液中厚朴酚的含量,以甲醇-水(78:22)为流动相,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流速 1 mL \cdot min $^{-1}$,进样体积 10 μL ,检测波长 294 nm^[20-22]。以保留时间定性,峰面积定量,测得厚朴酚标准曲线为 $y=1 \times 10^9 x - 46 159$, $R^2=0.999 0$;测得藿香正气口服液中厚朴酚含量 0.167 9 mg \cdot mL $^{-1}$ 。

采用 2D-COS 技术,以氘代氯仿为溶剂,以厚朴酚为载体,配制 0.2~1.98 mg \cdot mL $^{-1}$ 一系列浓度的样本,浓度间隔 0.02 mg \cdot mL $^{-1}$,共 90 个样本。

2 结果与讨论

2.1 厚朴酚二维相关分析

采集 90 个不同浓度厚朴酚样本,氘代氯仿溶剂与溶于氘代氯仿的厚朴酚原始光谱如图 1 所示,由于氘代氯仿溶剂的强吸收,原始光谱图上不能直观分辨厚朴酚的特征信息。

采用 2D-COS 技术,氘代氯仿纯溶剂与厚朴酚原始光谱的二维相关同步谱如图 2 所示,截取氘代氯仿纯溶剂与厚朴酚原始光谱对角线得二维相关同步谱切片谱(图 3),剔除溶剂的特征吸收峰后,厚朴酚在 1365~1 455 nm, 1 600~1 720, 2 000~2 181 和 2 275~2 465 nm 处有特征吸收。结

合厚朴酚结构,其中 1 440 nm 为酚基 O—H 伸缩振动基频的一级倍频谱带,1 679 nm 为芳基 C—H 及与芳基相连的甲基 C—H 伸缩振动一级倍频谱带,2 117, 2 304, 2 339 和 2 370 nm 为芳基 C—H 伸缩振动、弯曲振动和变形振动的组合频,2 445 nm 为芳基相连的甲基 C—H 弯曲振动基频二级倍频谱带,这些波段为厚朴酚的特征归属^[23]。

2.2 藿香正气口服液中厚朴酚定量模型建立

2.2.1 光谱预处理方法的选择

不同体积分数的藿香正气口服液 NIR 原始光谱如图 4 所示。在建模之前,首先对原始光谱进行预处理,可以消除噪音和基线漂移带来的影响。使用不同的预处理方法后模型的确定系数 R^2 越接近 1,说明模型越准确,校正均方根误差(RMSEC),交叉验证均方根误差(RMSECV)和预测均方根误差(RMSEP)值越小,说明模型的预测精度越高。采用基线

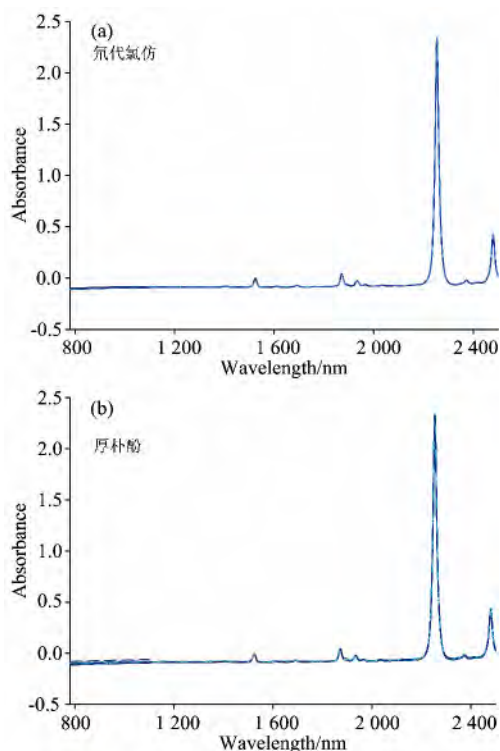
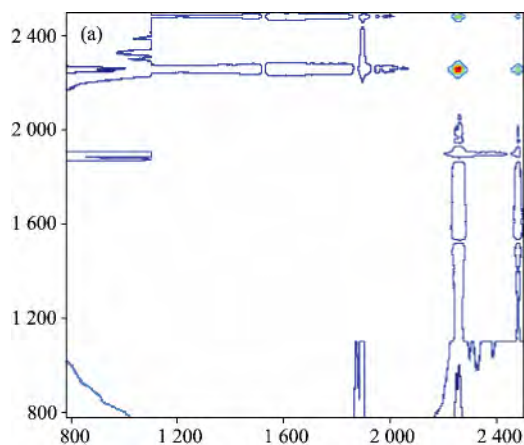


Fig 1 Raw spectra of deuterated chloroform and Magnolol



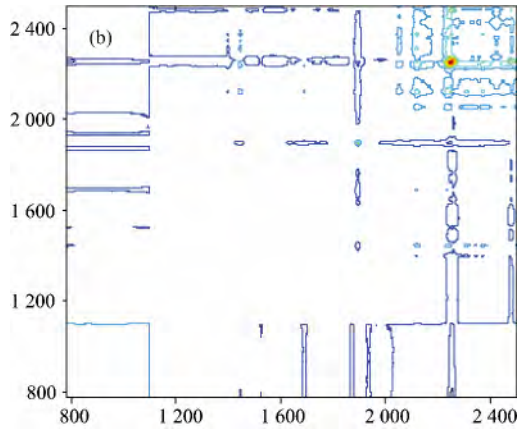


Fig 2 Synchronous spectra of deuterated chloroform (a) and Magnolol (b)

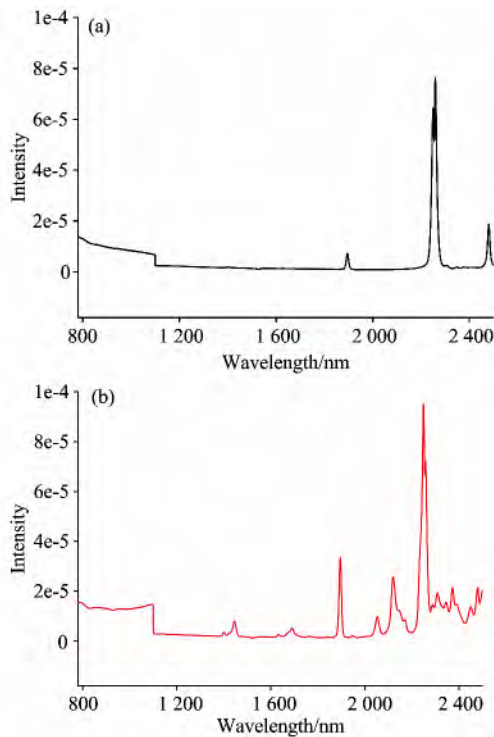


Fig 3 Slice spectra of deuterated chloroform (a) and Magnolol (b)

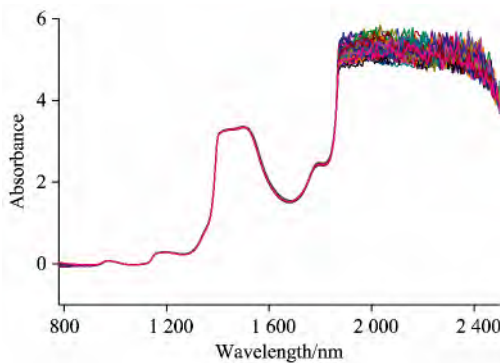


Fig 4 Raw spectra of Huoxiangzhengqi Oral Liduid

校正(baseline)、标准化(normalize)、SG 平滑(SG)、二阶导数(2d)、SG 平滑+一阶导数(SG+1st)、SG 平滑+二阶导数(SG+2nd)、标准正则变换(SNV)等方法对原始光谱进行预处理,结果如表 1 所示,SNV 预处理结果的 R_{cal}^2 和 R_{pre}^2 均大于 0.99, RMSEC, RMSECV 和 RMSEP 均较小,选择 SNV 作为最佳预处理方法。

Table 1 Selection of different pretreatment methods

厚朴酚	Latent factor	R_{cal}^2	RMSEC	RMSECV	R_{pre}^2	RMSEP
Raw	6	0.983 8	0.011 21	0.068 00	0.527 4	0.075 76
Baseline	4	0.976 9	0.014 28	0.055 17	0.698 8	0.056 96
Normalize	2	0.939 5	0.023 86	0.027 80	0.933 5	0.025 28
2d	12	0.528 6	0.069 04	0.107 40	0.144 6	0.088 10
SG	6	0.994 7	0.006 43	0.065 88	0.559 7	0.073 13
SG+1st	7	0.802 7	0.042 24	0.093 49	0.063 5	0.098 67
SG+2nd	6	0.753 2	0.042 06	0.095 44	-0.212 7	0.127 3
SNV	3	0.956 0	0.020 21	0.028 84	0.949 0	0.021 91

2.2.2 建模波段的选择

在建立模型的过程中,选用化学计量学手段对波段进行变量筛选,所选波段既要包含待测组分的最大信息量,又要尽可能的降低噪音干扰,以改善所建模型的预测能力。本文选用间隔偏最小二乘(iPLS)和组合间隔偏最小二乘(SiPLS)对 SNV 预处理的光谱数据进行波段筛选,iPLS 筛选结果如图 5 所示,最佳波段为 11(1 640~1 725 nm),SiPLS 筛选结果如图 6 所示,最佳波段组合为 3, 5, 6(952~1 037 nm, 1 124~1 296 nm)。

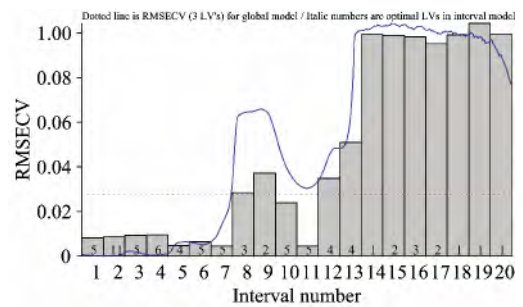


Fig 5 RMSECV for 20 interval models (bars) and full-spectrum model (black dotted line)

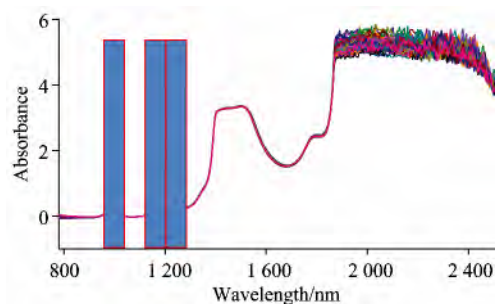


Fig 6 Selection variables of SiPLS

藿香正气口服液在 1 950 nm 后组合频区域(见图 4),由

于水峰的存在, 干扰较大, 不利于建模, 所以扣除 1 950~2 500 nm 区域^[24], 选择 iPLS 与 SiPLS 筛选的波段和 2D-COS 解析特征波段分别建立偏最小二乘(PLS)模型, 建模结果如表 2 所示。2D-COS 光谱解析得到的单个波段及波段组合所建立的定量模型与化学计量学波段筛选的模型均相对稳

定, 但是对目标物质进行光谱解析得到的波段更具有目标性, 同时克服了化学计量学同一物质筛选得到不同波段的缺点, 使光谱解析更具有解释性, 为 NIR 建模波段筛选提供借鉴和指导。

Table 2 PLS model of different selected bands

筛选波段(厚朴酚)	Latent factor	R_{cal}^2	RMSEC	RMSECV	R_{pre}^2	RMSEP
iPLS(11)	3	0.992 4	0.008 3	0.009 2	0.996 1	0.006 2
SiPLS(3, 5, 6)	4	0.994 4	0.007 2	0.010 1	0.994 0	0.007 5
780~1 950 nm	5	0.925 2	0.026 3	0.029 7	0.962 9	0.018 7
1 365~1 445 nm	2	0.962 2	0.018 7	0.021 1	0.984 8	0.012 0
1 600~1 720 nm	3	0.991 0	0.009 1	0.010 0	0.995 7	0.006 3
1 365~1 445 nm, 1 600~1 720 nm	4	0.994 2	0.073 2	0.008 9	0.992 5	0.003 9

3 结 论

采用 2D-COS 技术, 以氘代氯仿为溶剂, 解析了中药化学标准品厚朴酚的 NIR 光谱, 根据二维同步谱自相关峰的位置, 归属了厚朴酚在 1 365~1 455, 1 600~1 720, 2 000~2 181 和 2 275~2 465 nm 处有特征吸收, 其中 1 440 nm 为酚基 O—H 伸缩振动基频的一级倍频谱带, 1 679 nm 为芳基 C—H 及与芳基相连的甲基 C—H 伸缩振动一级倍频谱带, 2 117, 2 304, 2 339 和 2 370 nm 为芳基 C—H 伸缩振动、弯曲振动和变形振动的组合频, 2 445 nm 为与芳基相连的甲基

C—H 弯曲振动基频二级倍频谱带。采集不同浓度的藿香正气口服液 NIR, 以厚朴酚为研究对象, 由于受到水峰的影响, 在以 2D-COS 解析的厚朴特征波段和化学计量学 iPLS 和 SiPLS 筛选的特征波段建立 PLS 定量模型时, 剔除 1 950~2 500 nm 区域的波段, 二者均得到良好的结果。这说明 2D-COS 技术光谱解析得到的特征波段对目标物质更具有针对性, 同时克服了化学计量学中针对同一目标物质, 不同的波段筛选方法得到不同的建模波段这一缺点, 使波段选择更具有解释性, 为中药化学成分 NIR 光谱解析特征波段的归属提供方法参考, 为 NIR 建模波段筛选提供借鉴和指导。

References

- [1] ZHAO Chao, LI Hui-jun, CHEN Jun, et al(赵超, 李会军, 陈君, 等). Journal of China Pharmaceutical University(中国药科大学学报), 2012, 43(3): 283.
- [2] LIU Rong-xia, YE Min, GUO De-an(刘荣霞, 叶敏, 果德安). Chinese Journal of Natural Medicines(中国天然药物), 2006, 4(5): 332.
- [3] XING Zhi-na, ZHANG Da-lei(邢志娜, 张达磊). Li Shi Zhen Medicine And Materia Medica Research(时珍国医国药), 2005, 16(5): 416.
- [4] Mitsui K, Tsuchikawa S. Kurz-Originalia Brief Originals, 2003, 61: 159.
- [5] Yukihiro O, Slobodan S, Jian H J. Near Infrared Spectrosc., 2001, 9: 63.
- [6] YANG Qiong, ZHOU Shang, ZHU Qian-hua, et al(杨琼, 周尚, 朱乾华, 等). Journal of Southwest China Normal University(西南师范大学学报), 2011, 36(6): 38.
- [7] BAI Yan, GUO Yan-li, LEI Jing-wei(白雁, 郭艳利, 雷敬卫). Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy(中国现代应用药学), 2012, 29(11): 1022.
- [8] YU Chi, JIANG Hong, LIU Ai-ping(余驰, 姜红, 刘爱萍). Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志), 2009, (4): 656.
- [9] LÜ Cheng-xu, CHEN Long-jian, YANG Zen-ling, et al(吕程序, 陈龙键, 杨增玲, 等). Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery(农业机械学报), 2012, 43(12): 141.
- [10] LIU Hao, HUANG Yan-ping, GAO Hong-bin, et al(刘浩, 黄艳萍, 高鸿彬, 等). Computers and Applied Chemistry(计算机与应用化学), 2008, 25(6): 724.
- [11] PENG Yun, SHEN Yi, WU Pei-yi, et al(彭云, 沈怡, 武培怡, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2005, 33(10): 1499.
- [12] LEI Meng, FENG Xin-lu, HE Tao, et al(雷猛, 冯新泸, 何涛, 等). Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(光谱实验室), 2008, 25(5): 996.

- [13] LIU H, XU J P, QU L B, et al. *Science China Chemistry*, 2010, 53(5): 1155.
- [14] Anthea L. F, Kerry L. W, Renata R, et al. *Food Chemistry*, 2013, 139: 115.
- [15] Noda I, Dowrey A E, Marcott C, et al. *Applied Spectroscopy*, 2000, 54(7): 236.
- [16] Chinese Pharmacopoeia Commission(中国药典委员会). *Chinese Pharmacopoeia Vol I (中国药典, 一部)*. Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2010.
- [17] HE Dan, YANG Lin, QIN Shao-rong, et al(何丹, 杨林, 秦少容, 等). *Traditional Chinese Medicine Patent Prescription(中成药)*, 2013, 35(12): 2658.
- [18] YU Jia-wen, DENG Kai-ying, PENG Tao, et al(余佳文, 邓开英, 彭涛, 等). *China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志)* 2013, 38(014): 2314.
- [19] ZHANG Hai-jiang, GUO Hua-zhong, YANG Xiao-ping, et al(张海江, 郭怀忠, 杨晓萍, 等). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志)*, 2009 (2): 316.
- [20] LI Yan-min, GAO Xu-nian(李燕敏, 高旭年). *Acta Chinese Medicine and Pharmacology(中医学报)*, 2001, 29(2): 61.
- [21] CHEN Yu, ZHANG Jing-shuo, CHEN Ze-qin, et al(陈雨, 张经硕, 陈泽琴, 等). *Chinese Remedies & Clinics(中国药物与临床)*, 2006, 6(2): 105.
- [22] ZHOU Yu-qi, ZHANG Jian-min(周羽琪, 章建民). *Traditional Chinese Medicine Patent Prescription(中成药)*, 2002, 24(2): 93.
- [23] Jerry W, Jr. Lois Weyer (2012). *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy (Second Edition)*, F L, CRC Press.
- [24] WU Zhi-sheng, SHI Xin-yuan, DU Min, et al(吴志生, 史新元, 杜敏, 等). *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy(中华中医药杂志)*, 2012, 27(4): 1021.

NIR Assignment of Magnolol by 2D-COS Technology and Model Application Huoxiangzhengqi Oral Liduid

PEI Yan-ling, WU Zhi-sheng*, SHI Xin-yuan, PAN Xiao-ning, PENG Yan-fang, QIAO Yan-jiang*

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing Key Laboratory for Basic and Development Research on Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract Near infrared (NIR) spectroscopy assignment of Magnolol was performed using deuterated chloroform solvent and two-dimensional correlation spectroscopy (2D-COS) technology. According to the synchronous spectra of deuterated chloroform solvent and Magnolol, 1 365~1 455, 1 600~1 720, 2 000~2 181 and 2 275~2 465 nm were the characteristic absorption of Magnolol. Connected with the structure of Magnolol, 1 440 nm was the stretching vibration of phenolic group O—H, 1 679 nm was the stretching vibration of aryl and methyl which connected with aryl, 2 117, 2 304, 2 339 and 2 370 nm were the combination of the stretching vibration, bending vibration and deformation vibration for aryl C—H, 2 445 nm were the bending vibration of methyl which linked with aryl group, these bands attribut to the characteristics of Magnolol. Huoxiangzhengqi Oral Liduid was adopted to study the Magnolol, the characteristic band by spectral assignment and the band by interval Partial Least Squares (iPLS) and Synergy interval Partial Least Squares (SiPLS) were used to establish Partial Least Squares (PLS) quantitative model, the coefficient of determination R_{cal}^2 and R_{pre}^2 were greater than 0.99, the Root Mean of Square Error of Calibration (RMSEC), Root Mean of Square Error of Cross Validation (RMSECV) and Root Mean of Square Error of Prediction (RMSEP) were very small. It indicated that the characteristic band by spectral assignment has the same results with the Chemometrics in PLS model. It provided a reference for NIR spectral assignment of chemical compositions in Chinese Materia Medica, and the band filters of NIR were interpreted.

Keywords Near infrared spectroscopy; Two-dimensional correlation spectroscopy; Magnolol, Huoxiangzhengqi Oral Liduid; Spectral assignment

(Received May 30, 2014; accepted Aug. 16, 2014)

* Corresponding authors