【评价方法学】

近红外光谱技术快速测定三七水分和醇溶性浸出物

周雨枫[1]，杨哲萱[2]，董林毅[1]，周立红[2*]，叶正良[1, 3*]

1. 天津医科大学药学院，天津 300070
2. 天士力医药集团股份有限公司，天津 300410
3. 天士力控股集团有限公司，天津 300410

摘　要：目的 利用近红外光谱技术（near infrared spectroscopy，NIRS）建立三七药材水分和醇溶性浸出物定量分析的快速测定方法。**方法** 参照《中国药典》2015年版三七水分和醇溶性浸出物含量测定方法对53批药材分别测定水分和醇溶性浸出物含量，采用偏最小二乘法（PLS）分别建立水分和醇溶性浸出物的近红外定量分析模型，并利用内部交叉验证和外部验证的方法对模型进行优化。**结果** 药材样品中水分和醇溶性浸出物预测最佳波段分别为4 450.32～7 350.01 cm^{-1}和6 163.92～3 984.71 cm^{-1}。定量模型校正集相关系数分别为0.997 2和0.962 4，校正均方差分别为0.039 6和0.776 0；验证集的相关系数为0.962 4和0.988 4，验证均方差分别为0.173和0.595。**结论** 该方法准确、快速、无污染，可用于三七药材中水分和醇溶性浸出物含量的快速测定。

关键词： 近红外光谱技术；三七；水分；醇溶性浸出物；偏最小二乘法

中图分类号： R917　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1674-6376（2018）11-1994-06

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.11.011

Rapid determination of moisture and ethanol extract content in *Panax notoginseng* by NIRS

ZHOU Yufeng[1], YANG Zhexuan[2], DONG Linyi[1], ZHOU Lihong[2], YE Zhengliang[1,3]

1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
2. Tasly Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China
3. Tasly Holding Group Company Limited,Tianjin 300410, China

Abstract: Objective This study aimed at establishing the quantitative model of moisture and ethanol extract content in *Panax notoginseng* by NIRS. **Methods** Oven drying method of Chinese Pharmacopoeia 2015 was used to determine the moisture and ethanol extract content of 53 samples. The correlation models of the NIR spectra and the reference values of moisture and ethanol extract content were obtained with partial least square (PLS) method and optimized through inner cross validation and external validation. **Results** The optimal spectrum range of moisture and ethanol extract were 4 450.32—7 350.01 cm^{-1} and 6 163.92—3 984.71 cm^{-1}. The correlation coefficients of calibration for moisture and ethanol extract were 0.997 2 and 0.962 4,and the root mean square errors of calibration were 0.039 6 and 0.776 0. The correlation coefficients of predication were 0.962 4 and 0.988 4, and the root mean square errors of prediction were 0.173 and 0.595. **Conclusion** The presented method is accuracy, timesaving and non-destructive, which could be applied for the rapid detection of the moisture and ethanol extract content in *Panax notoginseng*.

Key words: NIRS; *Panax notoginseng*; moisture; ethanol extract; partial least square

中草药在现代智能生产过程中存在着质量检查繁琐、耗时长、工作量庞大、预处理复杂、消耗大量有机试剂、不能满足大批量的现场快速分析的要求等缺点。《中国药典》2015年版中测定三七药材的

收稿日期： 2018-05-02

基金项目： 科学技术部国家重大新药创制项目（2013ZX09402202）

第一作者： 周雨枫（1991—），女，在读硕士研究生，研究方向为中药质量控制。Tel：15202200230 E-mail：15202200230@163.com

***通信作者：** 周立红，高级工程师，研究方向为中药国际申报及产业技术管理。Tel：13752166075 E-mail：zhoulh@tasly.com

水分和醇溶性浸出物分别是用烘干法和热浸法[1]，烘干法耗费时间长，热浸法的过程繁琐复杂、分析误差大。而近红外光光谱技术（near infrared spectroscopy，NIRS）是一种快速无损的分析技术，不需要消耗溶剂，比较环保，没有复杂的前处理过程，对固体、液体和气体样品能够直接测定，因此是一种可实现现场和在线分析的一种快速检测手段，更有利于企业大规模生产[2]。

为了解决中草药采购、验收、入库、投料等生产前期工序存在的各种问题，为此需要研究包括水分、醇溶性浸出物含量等检测指标的快检方法，同时与药典标准相结合建立一种更适合于企业大规模生产时对药材质量检查的快检方法[2-4]。

三七 *Panax notoginseng*（Burk.）F. H. Chen 为五加科人参属植物[1]，属于珍贵的中药材。目前，利用NIRS测定三七药材中的皂苷含量文献较多[5-7]，而尚未有报导测定三七药材水分和醇溶性浸出物含量研究。为此，本研究采用NIRS对三七药材中的水分和醇溶性浸出物含量进行定量分析，建立水分和醇溶性浸出物含量的NIRS快检方法，为三七药材的质量控制提供一定依据。

1 仪器与药材

1.1 仪器与试剂

XS205电子分析天平（上海梅特勒-托利多仪器有限公司）；Antaris II傅里叶变换近红外光谱仪（ThermoFisher Scientific公司），TQ Analyst 8.0软件处理光谱，InGaAs检测器，Result-Operation软件光谱采集；DK-S14电热恒温水浴锅（上海森信实验仪器有限公司）；MEMMERT UNE200干燥箱（上海美墨尔特贸易有限公司）；高速中药粉碎机（山东省青州市精诚医药装备制造有限公司）；甲醇（色谱纯，天津市致远化学试剂有限公司）；水为Milli-Q超纯水。

1.2 药材

53批三七药材由天士力医药集团股份有限公司提供，经浙江理工大学梁宗锁教授鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng*（Burk.）F.H.Chen的干燥根和根茎。药材粉碎过24目药典标准筛，混匀，装袋密封备用。

2 方法与结果

2.1 水分测定方法

精密称取本品粉末（过2号筛）2 g，平铺于干燥至恒重的扁形称量瓶中，厚度不超过5 mm，疏松供试品不超过10 mm。开启瓶盖在100～105 °C干燥5 h，将瓶盖盖好，移置干燥器中，放冷30 min，精密称定。再在上述温度干燥1 h，放冷，至连续两次称重的差异不超过5 mg为止[1]。测得水分含量范围为8.67%～10.81%。

2.2 醇溶性浸出物测定方法

取供试品约2 g，精密称定，置100～250 mL的锥形瓶中，精密加甲醇50 mL，密塞。称定质量，静置1 h。连接回流冷凝管，加热至沸腾，并保持微沸1 h。放冷后，取下锥形瓶，密塞，再称量，用甲醇补足减失的质量，摇匀。用干燥滤器滤过，精密量取滤液25 mL，置已干燥至恒重的蒸发皿中，在水浴上蒸干后，于105 °C干燥3 h，置干燥器中冷却30 min，迅速精密称量[1]。测得醇溶性浸出物含量范围为16.00%～28.44%。

2.3 光谱采集

采集方式：积分球固体采样。样品扫描次数64次，分辨率8.0 cm^{-1}，扫描范围12 000～3 800 cm^{-1}，每个样品采集2张光谱，计算平均光谱以建立模型。53批三七药材的近红外原始光谱见图1。

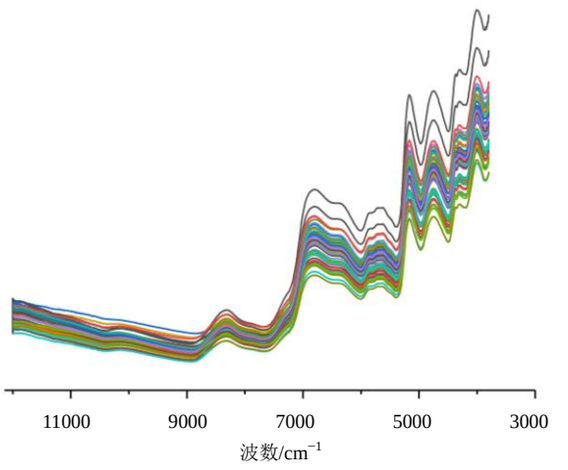


图1 53批三七药材的近红外原始光谱叠加图

Fig. 1 Superposed near-infrared spectra of 53 batches of *Panax notoginseng*

2.4 建立模型

2.4.1 校正集和验证集样品的选择 应用TQ Analyst 8.0软件，从53批样品中选择具有代表性的44和45批分别组成水分和醇溶性浸出物的近红外模型校正集，含量范围分别为8.67%～10.81%和16.00%～28.44%，剩下样品作为验证集，含量范围分别为8.85%～10.70%和16.58%～26.83%，验证集的含量范围均在校正集之内，具有可验证性。详细见表1。

2.4.2 选择光谱预处理方法 近红外采集光谱比

表1 校正集与验证集样品水分和醇溶性浸出物的含量

Table 1 Moisture and ethanol extract content of samples in calibration and validation set

测定指标	样品集	样品量	最大值/%	最小值/%	平均值/%
水分	校正集	44	10.81	8.67	9.76
	验证集	9	10.70	8.85	9.62
醇溶性浸出物	校正集	45	16.00	28.44	20.35
	验证集	8	16.58	26.83	21.44

较容易被固体粉末的颗粒大小和均一性等影响，使得所测定的光谱发生基线的平移和漂移。因此，需要对三七药材的近红外原始光谱预处理，提高模型的性能。常用的预处理方法有一阶导数法（First derivative）、多元散射校正法（Multiple scatter correction，MSC）、标准归一化法（Standard normal variate，SNV）等[8]。

经过不同的预处理之后，选择校正集均方差（RMSEC）、验证集均方差（RMSEP）、校正集样品的内部交叉验证均方差（RMSECV）及相关系数（R^2）作为最佳光谱预处理的评价指标。

在近红外光谱技术应用时，所建光谱RMSEC越小，表明校正模型建立越合理；RMSEP越小，表明模型的预测性能越好。RMSECV越小，代表模型的预测精度越高；R^2越接近1，表示模型的预测准确性越高[9]。由表3不同预处理方法的相关参数可以得出，SNV＋1阶导数和SNV分别作为水分和醇溶性浸出物含量的近红外光谱处理方法效果最好，详细见表2。

2.4.3 选择建模波段 建模波段的范围过广，将包括大量的多余信息，降低了模型的预测准确性。波段范围过短，又没有代表性，也影响了模型的适用性和预测性。因此，选择最佳波段对于提高模型的预测性有重要的影响。水分子在近红外光谱区内有3个特征波长（6 900、5 200、5 180 cm^{-1}），光谱特征

表2 不同预处理方法对光谱的影响

Table 2 Effects of different spectra preprocessing methods

测定指标	光谱预处理方法	内部交叉验证R^2	RMSECV	RMSEC	RESEP
水分	原始	0.262 7	0.550 0	0.430 0	0.556
	SNV	0.688 4	0.390 0	0.286 0	0.540
	MSC	0.268 0	0.879 3	0.147 0	0.277
	1阶导数	0.794 1	0.321 0	0.189 0	0.236
	2阶导数	0.773 7	0.339 0	0.004 3	0.444
	SNV+1阶导数	0.901 1	0.229 0	0.039 6	0.173
	MSC +1阶导数	0.900 0	0.230 0	0.037 6	0.176
醇溶性浸出物	原始	0.755 5	1.910 0	1.550 0	2.160
	SNV	0.935 2	1.010 0	0.776 0	0.595
	MSC	0.930 9	1.050 0	0.752 0	0.699
	1阶导数	0.924 1	1.100 0	0.327 0	0.745
	2阶导数	0.609 5	2.260 0	0.082 6	1.750
	SNV+1阶导数	0.914 0	1.180 0	0.459 0	0.731
	MSC +1阶导数	0.906 7	1.210 0	0.832 0	0.754

表3 不同光谱范围的影响

Table 3 Effects of different wavelength coverage

测定指标	光谱范围/cm^{-1}	内部交叉验证R^2	RMSECV	RMSEC	RESEP
水分	4 008.92~10 893.23	0.897 7	0.232	0.101 0	0.262
	4 450.32~7 350.01	0.900 0	0.230	0.037 6	0.176
	5 132.74~7 213.04	0.859 5	0.270	0.037 1	0.196
醇溶性浸出物	4 138.56~6 958.72	0.926 3	1.080	0.785 0	0.698
	3 984.71~6 163.92	0.953 2	1.010	0.776 0	0.596
	4 256.12~10 098.31	0.932 0	1.040	0.691 0	0.826

非常明显。因此选择最合适波段时将尽量包含这3个特征波长[10]。

以R^2、RMSECV、RMSEC、RESEP为最佳波段的评价指标。手动优化后的结果如表3。实验表明，4 450.32～7 350.01 cm^{-1}和3 984.71～6 163.92 cm^{-1}分别为水分和醇溶性浸出物含量的最佳建模波段。

2.4.4 选择模型主成分数 在NIR光谱中，主成分的数量对所建模型的预测性和准确性也有极大的影响。主成分数量过多，模型太复杂，出现过拟合现象。数量太少，则提取的信息不全面，模型的预测性降低[10]。最终以RMSECV作为评价指标，选取最佳的建模因子数，确定水分和醇溶性浸出物含量的NIR最佳因子数分别为10和8，见图2～3。

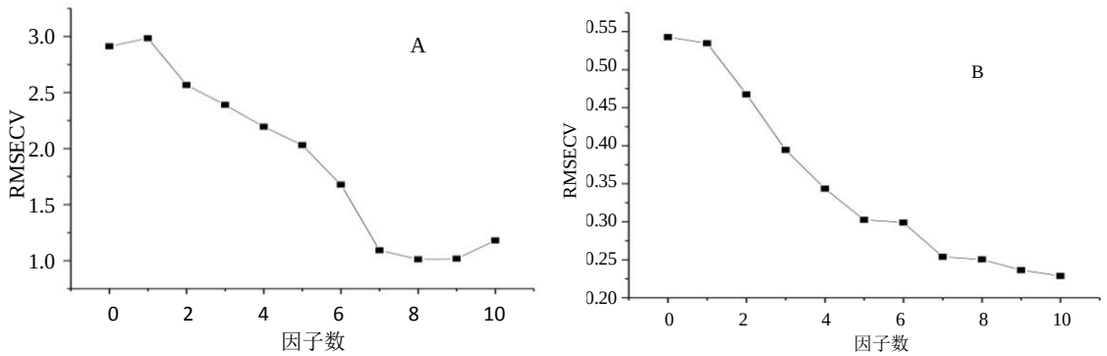
2.4.5 定量模型的建立 运用TQ Analyst 8.0软件，通过PLS法建模对三七药材的水分和醇溶性浸出物含量建立定量模型。外部验证中实测值与参考值的相关图见图3，偏差图见图4。由图可知，水分和醇溶性浸出物含量的近红外模型总体预测性能较好。

2.4.6 模型的验证 根据三七药材样品及相关评价性参数建立的模型，对验证集进行验证，并与根据2015版《中国药典》所使用的烘干法和热浸法测出的水分和醇溶性浸出物含量值作为实测值，与近红外光谱扫描样品后给出的参考值进行比较。

从图3～4和表4～6可知，水分含量和醇溶性浸出物的NIR模型中，外部验证集样品的实测值与参考值相对误差最大值分别为3.39%和4.32%，平均相对误差分别为1.58%和2.25%，由此可见，所建模型的预测性良好，预测性能准确。

3 讨论

本实验根据药典标准利用传统烘干法、热浸法

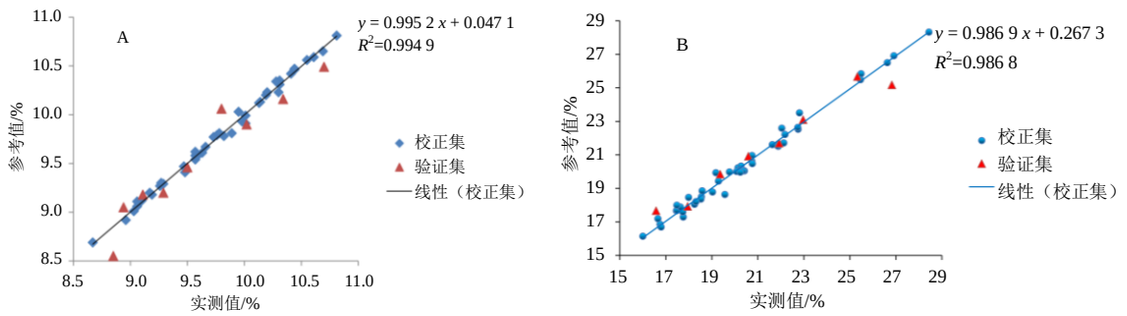


A-水分 B-醇溶性浸出物

A-moisture B- ethanol extract

图2 校正集内部交叉验证均方差随主因子数的变化图

Fig. 2 Change of the RMSECV along with factors

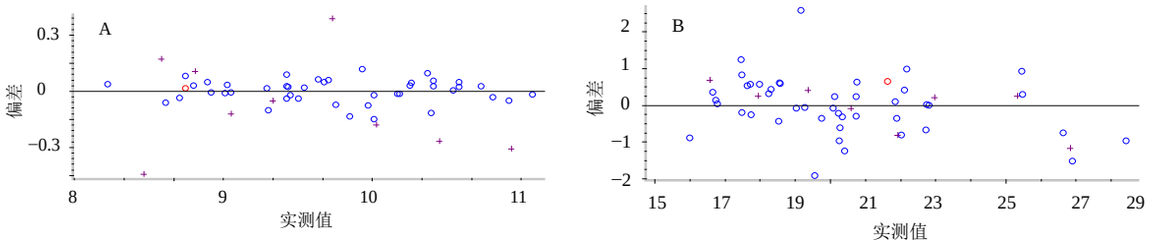


A-水分；B-醇溶性浸出物

A-moisture；B- ethanol extract

图3 实测值与参考值的相关性

Fig. 3 Correlation between measured values and reference values



A-水分；B-醇溶性浸出物

A-moisture; B- ethanol extract

图4　实测值与参考值的偏差

Fig. 4　Deviation between measured and reference values

表4　模型验证结果

Table 4　Results of the modelling verification

测定指标	校正		内部交叉验证		外部验证	
	R^2	RMSEC	R^2	RMSECV	R^2	RMSEP
水分	0.997 2	0.039 6	0.901 1	0.229 0	0.962 4	0.173 0
醇溶性浸出物	0.962 4	0.776 0	0.935 2	1.010 0	0.988 4	0.595 0

表5　验证集水分参数比较

Table 5　Comparison of moisture parameter of validation set

编号	实测值/%	参考值%	绝对误差/%	相对误差/%	平均相对误差/%
1	8.85	8.55	0.30	3.39	1.58
2	8.94	9.06	0.12	1.34	
3	9.11	9.18	0.07	0.77	
4	9.29	9.21	0.08	0.86	
5	9.50	9.47	0.03	0.32	
6	9.80	10.06	0.26	2.65	
7	10.02	9.90	0.12	1.20	
8	10.34	10.16	0.18	1.74	
9	10.70	10.49	0.21	1.96	

表6　验证集醇溶性浸出物参数比较

Table 6　Comparison of ethanol extract parameter of validation set

编号	实测值/%	参考值/%	绝对误差/%	相对误差/%	平均相对误差/%
1	16.58	17.27	0.69	4.16	2.25
2	17.95	18.19	0.24	1.34	
3	19.36	19.76	0.40	2.07	
4	20.59	20.50	0.09	0.44	
5	21.93	21.11	0.82	3.74	
6	22.97	23.18	0.21	0.91	
7	25.33	25.59	0.26	1.03	
8	26.83	25.67	1.16	4.32	

与近红外光谱法相结合的方式，建立了利用NIR快速测定三七药材中的水分和醇溶性浸出物含量模型，模型通过SNV、MSC等预处理方法的尝试筛选出适合的预处理方法，并采用PLS方法建立三七药材水分的NIR定量校正模型。

结果表明，所建立的三七药材水分和醇溶性浸出物含量NIR定量模型中，实测值平行样品间最大偏差分别为1.66%和1.74%，验证集样品的相对误差最大值分别为3.39%和4.32%，平均相对误差分别为1.58%和2.25%。说明所建近红外定量模型都比较准确。而水分值在8.5%～9.0%之间的预测性能较差，醇溶性浸出物在23%～25%的预测性能相对于其他区域较差，可能是由于这些范围的样本数量比较少所导致。

因此，近红外光谱技术能够实现企业在生产过程中的快速检测三七药材水分含量，提高投料效率和降低人工成本。本文所建立的方法可以应用于一般在中药材水分、醇溶性浸出物含量的测定分析，后期可以通过不断增加样本量，在保证模型的精确性的情况下，不断提高模型的预测性和适用性，推广近红外光谱技术在中药材大规模生产过程中的作为一种快检方法的应用。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] 李 真, 周立红, 叶正良, 等. 近红外光谱分析技术在药物质量分析中的应用进展 [J]. 药物评价研究, 2016(4): 686-692.

[3] 马 越, 刘永强, 门宇凤, 等. 近红外光谱法快速测定芍药根中芍药苷和芍药内酯苷 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 700-707.

[4] Navarro E M, Rodenas S F, Li H, et al. Rapid determination of baicalin and total baicalein content in Scutellariae Radix by ATR-IR and NIR spectroscopy [J]. Talanta, 2013, 114(10): 304-310.

[5] 闫珂巍, 陈美君, 梅国荣, 等. 近红外光谱法测定三七中3种皂苷的总含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(4): 691-696.

[6] 杨南林, 瞿海斌, 程翼宇. 近红外光谱法快速测定三七总皂苷的方法研究 [J]. 浙江大学学报, 2002, 36(4): 464-466.

[7] 杨南林, 程翼宇, 吴永江. 中药材三七中皂苷类成分的近红外光谱快速无损分析新方法 [J]. 化学学报, 2013, 61(3): 393-398.

[8] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术 [M]. 第二版. 北京: 中国石化出版社, 2007.

[9] Zhang X B, Feng Y C, Hu C Q.Feasibility and extension of universal quantitative models for moisture content determination in beta-lac-tam powder injections by near-infrared spectroscopy [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 630(2): 131-140.

[10] 李 化, 柯华香, 贺敬霞, 等. 近红外漫反射光谱结合偏最小二乘法快速测定厚朴中酚类成分和水分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22): 72-76.