

NIRS 结合 TQ 软件对不同产地野菊花定性定量分析

胡小莉, 白雁*, 雷敬卫*, 张迪文, 郝敏
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] 目的:采用近红外光谱技术(NIRS)结合 TQ 软件对不同产地野菊花进行定性定量分析。方法:运用近红外漫反射光谱技术采集不同产地野菊花药材的 NIR 光谱,采用 TQ 软件中的判别分析法对不同产地野菊花进行产地判别;采用 HPLC 法测定野菊花中绿原酸含量,偏最小二乘法对不同产地野菊花药材中的绿原酸进行定量预测,分别建立了定性定量分析模型,并对模型进行了验证。结果:所建定性模型可快速准确鉴别出不同产地的野菊花药材,验证集样品错判例数为 0;绿原酸定量预测模型的校正集内部交叉验证相关系数(R^2),校正均方差(RMSEC)和预测均方差(RMSEP)分别为 0.995 38,0.008 12 和 0.012 8。结论:定性定量模型可准确地对不同产地野菊花进行定性定量分析,该方法简便可靠,可用于野菊花药材的快速质量分析。

[关键词] 近红外光谱技术; 野菊花; 不同产地; 定性; 绿原酸; 定量

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0037-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150037

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160603.1145.034.html>

[网络出版时间] 2016-06-03 11:45

Qualitative and Quantitative Analysis of Chrysanthemi Indici Flos from Different Origins by Using NIRS and TQ Software

HU Xiao-li, BAI Yan*, LEI Jing-wei*, ZHANG Di-wen, HAO Min

(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To conduct qualitative and quantitative analysis of Chrysanthemi Indici Flos from different origins by using near-infrared spectroscopy (NIRS) and TQ software. **Method:** Near-infrared spectra (NIR) of Chrysanthemi Indici Flos from different origins were collected by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy technique, and discriminant analysis of TQ software was used to distinguish the origin of Chrysanthemi Indici Flos. The content of chlorogenic acid was determined by using HPLC, and the partial least squares (PLS) method was used to quantitatively predict the chlorogenic acid in the Chrysanthemi Indici Flos from different origins. The qualitative and quantitative analysis models were established and verified respectively. **Result:** The established qualitative model can quickly and accurately identify the Chrysanthemi Indici Flos from different origins, and the number of wrong discrimination cases in verification set was 0; the correlation coefficients (R^2) of the quantitative analysis model was 0.995 38; the root mean square error of calibration (RMSEC) was 0.008 12; and the root mean square error of predication (RMSEP) was 0.012 8. **Conclusion:** The qualitative and quantitative models could be used to accurately analyze the Chrysanthemi Indici Flos from different origins. This method is

[收稿日期] 20150722(005)

[基金项目] 河南省工程技术中心项目(142102313109);河南省属高校科研业务费专项自主创新项目(2014KYYWF-ZZCX3-08)

[第一作者] 胡小莉,在读硕士,从事利用现代分析手段对中药品质进行分析研究,Tel:15236325473,E-mail:xinyangxiaoli1987@126.com

[通讯作者] *白雁,教授,从事现代仪器分析方法在中药质量分析中的应用研究,Tel:0371-05962967,E-mail:white-yan@hotmail.com;

*雷敬卫,博士,教授,从事中药质量控制研究,Tel:0371-65962967,E-mail:249432564@qq.com

simple, accurate and could be used for the rapid quality analysis of Chrysanthemi Indici Flos.

[Key words] near-infrared spectroscopy; Chrysanthemi Indici Flos; different origins; qualitative analysis; chlorogenic acid; quantitative analysis

野菊花为菊科多年生草本植物野菊的干燥头状花序。秋冬二季花初开放时采摘,晒干或蒸后晒干^[1]。现代药理研究表明野菊花具有广泛的药用价值,包括抗微生物、抗炎、免疫调节、保护心血管等,且具有高效、低毒的特点,有较好的临床应用价值和研发潜力。

近红外光谱分析技术(NIR)是一种快速无损的绿色分析技术,目前已陆续应用于中药材的定量分析^[2-3]和药材的快速识别^[4],以及中药生产过程中的在线监测^[5]等,最新研究将 NIRS 应用于中药材山楂的定性定量分析^[6],预测结果准确可靠,可应用于对不同产地山楂药材的定性鉴别和含量分析。绿原酸是野菊花发挥药效的有效成分之一,野菊花中绿原酸的测定采用 HPLC 法^[7]。野菊花药材分布广泛,相关研究发现不同产地野菊花药材化学成分存在差异^[7],但常规检测需要消耗有机试剂,且检测周期长,不利于药材的大批量同时检测。因此,本文以不同产地野菊花药材为研究对象,结合 NIRS 对不同产地野菊花进行产地判别分析,对不同产地野菊花药材中绿原酸含量进行定量分析,为野菊花药材的快速质量分析提供了新的方法。

1 仪器与试剂

6700 型近红外光谱仪(配有 InGaAs 检测器,50 mL 标准石英杯,OMNIC 光谱采集软件,TQ Analyst 8.0 分析软件,美国 Thermo Nicolet 公司),1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),FW-200 型高速药材粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),绿原酸对照品(批号 MUST-14031401,纯度 ≥ 98%)购自成都曼思特生物科技有限公司。

试验用样品分别采集自 6 个不同野菊花主要产地,样品信息见表 1,经河南中医药大学陈随清教授鉴定为野菊 *Chrysanthemum indicum* 的干燥头状花序。

表 1 105 份野菊花产地来源

Table 1 Origin of 105 Chrysanthemi Indici Flos sample

No.	产地	No.	产地
1 ~ 15	湖北襄樊	51 ~ 70	河南新郑
16 ~ 30	江西修水	71 ~ 90	河南信阳
31 ~ 50	河南三门峡	91 ~ 105	浙江桐乡

2 方法与结果

2.1 近红外光谱的采集 取上述 105 份野菊花样品适量,粉碎,过 40 目筛。测样方式:采用积分球漫反射,分辨率 8 cm⁻¹,扫描次数 64 次,扫描范围 4 000 ~ 12 000 cm⁻¹,温度 18 ~ 25 °C,相对湿度 35%。将收集到的样品药材粉末取约 8 g,放入石英样品杯中,混合均匀,以空气为参比,扣除背景采集光谱图,按上述试验条件进行扫描,每个样品重复扫描 3 次,求平均光谱,105 份野菊花样品的近红外光谱叠加见图 1。

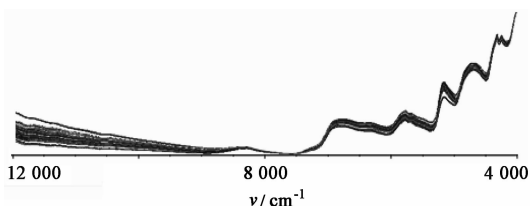


图 1 105 份野菊花样品的近红外原始光谱叠加

Fig. 1 NIRS spectra of 105 Chrysanthemi Indici Flos samples

2.2 野菊花药材中绿原酸含量测定 参考文献[6]方法结合预试验,采用 HPLC 法测定野菊花中绿原酸含量。色谱条件: Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2% 冰乙酸(28:72),柱温 30 °C,检测波长 327 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹。绿原酸的提取方式为料液比 25:1,溶剂 50% 甲醇,超声(250 W, 20 kHz)提取 30 min。105 份野菊花样品绿原酸含量见表 2。

2.3 不同产地野菊花定性定量模型的建立

2.3.1 校正集和验证集样品的选择 从 105 份野菊花样品中,分别根据产地分布和绿原酸含量分布选择校正集和验证集用于定性定量模型的建立,校正集样品信息应该包含验证集样品信息^[8]。定性分析模型的验证集产地分布见表 3,定量分析模型的校正集和验证集绿原酸含量分布见表 4。

2.3.2 光谱预处理方法的选择 由图 1 可以看出,105 份样品的 NIR 原始图谱基本一致,很难看出药材的光谱信息差别。一方面是由于近红外光谱谱带自身重叠严重,另一方面由于中药成分众多,组成复杂,因此很难从原始近红外光谱中找出特定的吸收谱带对其加以区分,必须通过化学计量法对其进行处理。

表 2 105 份野菊花样品绿原酸质量分数

Table 2 Content of chlorogenic acid in 105 Chrysanthemi Indici

Flos samples								%	
No.	绿原酸	No.	绿原酸	No.	绿原酸	No.	绿原酸		
1	0.18	28	0.34	55	0.45	82	0.39		
2	0.18	29	0.32	56	0.44	83	0.38		
3	0.17	30	0.35	57	0.44	84	0.37		
4	0.16	31	0.33	58	0.46	85	0.38		
5	0.18	32	0.33	59	0.43	86	0.38		
6	0.16	33	0.32	60	0.46	87	0.41		
7	0.18	34	0.33	61	0.44	88	0.40		
8	0.18	35	0.33	62	0.43	89	0.44		
9	0.17	36	0.33	63	0.42	90	0.44		
10	0.17	37	0.32	64	0.44	91	0.39		
11	0.17	38	0.32	65	0.46	92	0.36		
12	0.15	39	0.32	66	0.42	93	0.24		
13	0.17	40	0.32	67	0.42	94	0.32		
14	0.17	41	0.33	68	0.43	95	0.33		
15	0.17	42	0.32	69	0.42	96	0.30		
16	0.38	43	0.32	70	0.45	97	0.33		
17	0.32	44	0.33	71	0.37	98	0.30		
18	0.39	45	0.33	72	0.37	99	0.36		
19	0.32	46	0.31	73	0.40	100	0.32		
20	0.39	47	0.31	74	0.39	101	0.32		
21	0.32	48	0.31	75	0.40	102	0.36		
22	0.34	49	0.32	76	0.38	103	0.25		
23	0.32	50	0.31	77	0.37	104	0.32		
24	0.37	51	0.48	78	0.40	105	0.33		
25	0.32	52	0.44	79	0.37				
26	0.35	53	0.44	80	0.37				
27	0.30	54	0.46	81	0.41				

表 3 定性分析模型验证集产地分布

Table 3 Origin of validation set of qualitative analysis model

No.	产地	No.	产地
2,6,9	湖北襄樊	53,57,61,67	河南新郑
17,21,25	江西修水	73,79,84,89	河南信阳
34,39,43,49	河南三门峡	94,99,103	浙江桐乡

常用的光谱预处理方法有多元散射校正法 (MSC), 标准归一化法 (SNV), 一阶倒数法 (first derivative), 二阶倒数法 (second derivative) 以及 S-G 平滑法 (savitzky-golay filter) 和 N-D 平滑法 (norris derivative filter)。本研究采用 TQ 软件中的判别分析法 (discriminant analysis) 对不同产地野菊花进行定性

表 4 定量分析模型校正集与验证集绿原酸分布

Table 4 Sample distribution of calibration set and validation set of quantitative analysis model

样品	样品数量/个	最大值	最小值	平均值
校正集	84	0.48	0.15	0.34
验证集	21	0.45	0.16	0.33

分析, 定性分析模型以误判例数和 PI (performance index) 为评价指标, 误判例数越少, PI 越接近 100, 模型的预测能力越好, 不同光谱预处理方法对定性分析模型的影响见表 5。采用 TQ 软件中的偏最小二乘法 (partial least squares, PLS) 对不同绿原酸含量的野菊花进行定量分析, 以内部交叉验证决定系数 (R^2), 校正均方差 (RMSEC) 和预测均方差 (RMSEP) 为评价指标, R^2 越接近 1, 样品实测值与 NIR 预测值的相关性越好, RMSEC 和 RMSEP 越小, 定量模型的预测准确度越高, 不同光谱预处理方法对定量分析模型的影响结果见表 6。对于定性分析模型, MSC + 二阶导数 + N-D 平滑的预处理方法效果最好, 对于定量分析模型, 一阶导数 + S-G 平滑的预处理方法效果最好。

表 5 不同光谱预处理方法对定性分析模型的影响

Table 5 Influence of different pretreatment methods on performance of qualitative analysis model

光谱预处理方法	误判例数	PI
constant (原始光谱)	2	91.5
SNV + 一阶倒数 + S-G 平滑	2	92.6
SNV + 二阶倒数 + N-D 平滑	0	94.7
MSC + 一阶倒数 + S-G 平滑	1	92.5
MSC + 二阶倒数 + S-G 平滑	3	90.6
MSC + 一阶倒数 + N-D 平滑	0	94.4
MSC + 二阶倒数 + N-D 平滑	0	95.0

表 6 不同光谱预处理方法对定量分析模型的影响

Table 6 Influence of different pretreatment methods on performance of quantitative analysis model

光谱预处理方法	R^2	RMSEC	RMSEP
一阶倒数 + S-G 平滑	0.995 38	0.008 12	0.012 8
一阶倒数 + N-D 平滑	0.990 65	0.012 80	0.012 7
二阶倒数 + S-G 平滑	0.993 91	0.011 01	0.014 0
二阶倒数 + N-D 平滑	0.992 95	0.011 81	0.011 1

2.3.3 建模波段的选择 在建立模型时需要选择建模波段以调整模型的准确性。表 7 和表 8 分别显示了不同光谱范围对定性分析模型和定量分析模型的影响。由表可知, 定性分析模型的最佳建模波段

为 4 000 ~ 7 600 cm^{-1} , 此时误判例数最少, PI 最高; 定量分析模型的最佳建模波段为 4 000 ~ 6 000 cm^{-1} , 此波段范围内 R^2 最接近 1, RMSEC 和 RMSEP 最小, 模型预测准确度最高。

表 7 不同光谱范围对定性分析模型的影响

Table 7 Influence of different spectral ranges on qualitative analysis model

光谱范围/ cm^{-1}	误判/例	PI
4 000 ~ 10 000	3	92.4
4 000 ~ 7 600	0	95.0
5 000 ~ 8 000	2	92.9
6 000 ~ 8 000	4	90.7

表 8 不同光谱范围对定量分析模型的影响

Table 8 Influence of different spectral ranges on quantitative analysis model

光谱范围/ cm^{-1}	R^2	RMSEC	RMSEP
4 000 ~ 10 000	0.991 33	0.011 60	0.010 7
3 000 ~ 7 000	0.994 59	0.009 80	0.010 5
4 000 ~ 6 000	0.995 38	0.008 12	0.012 8
5 000 ~ 8 000	0.985 80	0.011 10	0.026 0

2.3.4 主成分数的选择 主成分数的选择影响 NIR 定性定量分析模型的稳定性和预测性。定性分析模型以累积贡献率 (Cumulative) 为评价指标, 累积贡献率越高, 所选主成分数越能代表样品的光谱信息。定量分析模型以校正集样本的内部交叉验证均方差 (RMSECV) 为评价指标, 当 RMSECV 最小时, 所选主成分数最佳。本研究中定性分析模型的主成分数为 10 时, 累积贡献率为最大值 99.094 5%; 定量分析模型的主成分数是 10 时, RMSECV 为最小值 0.021 93, 见图 2, 3, 故定性定量模型的主成分数均选择 10。

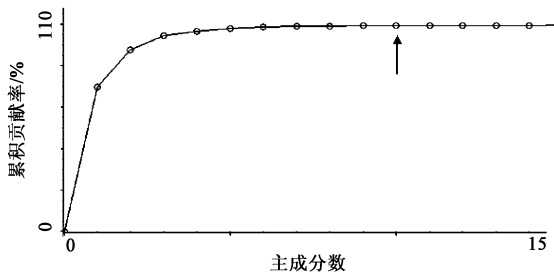


图 2 定性分析模型累积贡献率随主成分数的变化

Fig. 2 Cumulative changed with change of principal component in qualitative analysis model

2.3.5 模型的建立 分别用上述优选过的参数建立定性定量分析模型。定性模型采用 MSC + 二阶导数 + N-D 平滑的预处理方法, 4 000 ~ 7 600 cm^{-1} 的光谱范围内, 主成分数为 10 建立模型, 误判例数

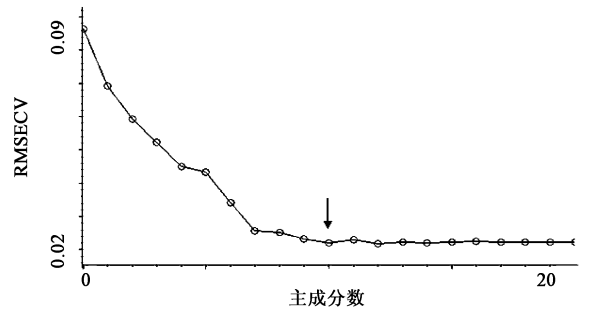
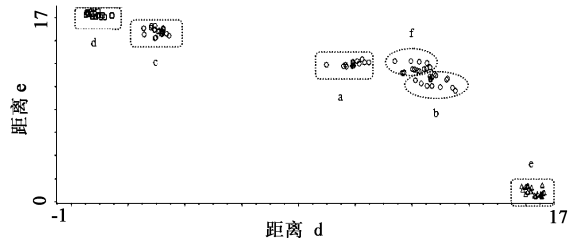


图 3 定量分析模型 RMSECV 随主成分数的变化

Fig 3 RMSECV changed with change of principal component in quantitative analysis model

为 0, 性能指数 PI 为 95.0, 6 个不同产地的野菊花样品可以被明显区分, 见图 4。定量分析模型采用 MSC + 二阶导数 + S-G 平滑的预处理方法, 4 000 ~ 6 000 cm^{-1} 的光谱范围, 主成分数为 10, R^2 , RMSEC, RMSEP 分别为 0.995 38, 0.008 12 和 0.012 8, 绿原酸 NIR 预测值与参考值相关性见图 5, 偏差见图 6, 从图中可以看出预测值与参考值接近, 模型预测性能良好。



a. 湖北襄樊; b. 江西修水; c. 河南三门峡; d. 河南新郑; e. 河南信阳; f. 浙江桐乡

图 4 不同产地野菊花判别分析示意

Fig. 4 Discriminant analysis of 6 different origin

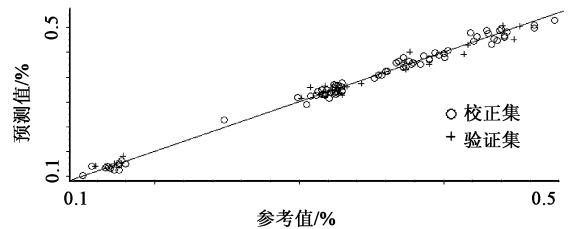


图 5 绿原酸 NIR 预测值与参考值相关性

Fig. 5 Correlation of NIR predicted values and reference values of content of chlorogenic acid

2.4 模型的验证 将定性分析模型的 21 份验证集样品图谱输入定性分析模型中, 得到不同产地野菊花样品的产地判别, 结果见表 9, 不同产地野菊花样品均可被准确归类; 将定量分析模型的 21 份验证集样品图谱输入定量分析模型中, 21 份验证集样品的 NIR 预测值与 HPLC 参考值见表 10, NIR 预测值与参考值接近, 预测准确度高。经验证, 定性定量分析

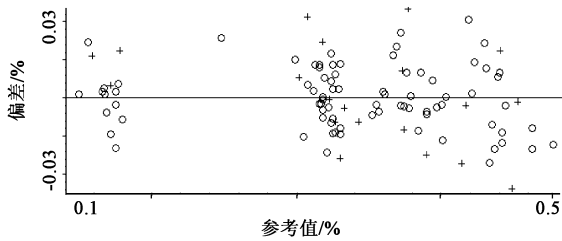


图 6 绿原酸 NIR 预测值与参考值偏差

Fig. 6 Deviation of NIR predicted values and reference values of content of chlorogenic acid

模型均具有较好的预测性能。

表 9 定性分析模型不同产地野菊花验证集样本判别分析

Table 9 Discriminant analysis of validation set of different origin in qualitative model

No.	产地	实际分类	NIR 分类	No.	产地	实际分类	NIR 分类
2	湖北襄樊	a	a	57	河南新郑	d	d
6	湖北襄樊	a	a	61	河南新郑	d	d
9	湖北襄樊	a	a	67	河南新郑	d	d
17	江西修水	b	b	73	河南信阳	e	e
21	江西修水	b	b	79	河南信阳	e	e
25	江西修水	b	b	84	河南信阳	e	e
34	河南三门峡	c	c	89	河南信阳	e	e
39	河南三门峡	c	c	94	浙江桐乡	f	f
43	河南三门峡	c	c	99	浙江桐乡	f	f
49	河南三门峡	c	c	103	浙江桐乡	f	f
53	河南新郑	d	d				

注:相同字母代表分类相同,不同字母代表不同分类。

表 10 验证集样品绿原酸质量分数参考值与 NIR 预测值

Table 10 NIR predicted values and HPLC reference values of validation set in quantitative model %

No.	参考值	NIR 预测值	No.	参考值	NIR 预测值
5	0.18	0.19	55	0.45	0.45
6	0.16	0.17	63	0.42	0.42
15	0.17	0.18	70	0.45	0.42
22	0.34	0.34	74	0.39	0.38
23	0.32	0.33	80	0.37	0.36
24	0.37	0.38	81	0.41	0.39
27	0.30	0.31	85	0.38	0.39
29	0.32	0.33	90	0.44	0.43
34	0.33	0.32	93	0.24	0.24
45	0.33	0.33	95	0.33	0.32
50	0.31	0.32			

3 讨论

本文收集了 6 个不同产地的野菊花样品进行定性判别分析。从判别结果可知,6 个不同产地的野菊花可以被准确地地区分,其中湖北襄樊、江西修水、浙江桐乡 3 个产地的判别分析结果距离较近,这与 3 个产地的实际地理位置相对接近结果是一致的;河南新郑和河南三门峡判别分析距离较近,距离河南信阳相对较远,这也与河南省内 3 个不同产地的

地理位置分布是一致的,分析原因地理位置接近的产地可能因气候、土壤等因素相似,因而野菊花药材表现出了相近的判别结果,但这些因素又不完全相同,因此不同产地的野菊花样品可被明显区分。结果表明近红外光谱可以比较全面地反映出不同产地样品的信息,该模型可用于野菊花的产地判别分析。

NIR 定量分析模型的建立需要收集含量范围广、代表性强的样品。本文收集的野菊花样品来自 6 个不同产地,绿原酸含量分布范围广且分布均匀,具有一定的代表性,可用于定量分析模型的建立。本文将综合其他指标成分,进一步研究 NIRS 在野菊花药材快速分析中的应用。

本文以 6 个不同产地的野菊花为研究对象,利用 NIRS 分别进行了定性定量分析,得到了较好的分析结果,定性定量分析模型可分别对野菊花进行产地判别和绿原酸含量的准确预测,该方法快速简便,准确度高,为野菊花药材的质量分析提供了一种新的方法。野菊花药材产地分布广泛,本文所采集的 6 个产地样品代表性不足,模型的使用过程中需要不断补充新的样品对模型进行完善,以扩大定性定量模型的适用性。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:295.
- [2] 雷敬卫,李小庆,白雁,等. 近红外光谱法快速测定逍遥丸(浓缩丸)中水分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(19):132-135.
- [3] 吴志生,史新元,隋丞琳,等. 清开灵注射液中间体银黄液中黄芩苷含量近红外测定方法的建立和验证[J]. 中华中医药杂志,2012,27(4):1021-1024.
- [4] 史会齐,白雁,龚海燕,等. 近红外漫反射光谱法快速鉴别不同厂家的六味地黄丸[J]. 实验技术与管理, 2011,28(10):34-37.
- [5] 何小珍,蒋军辉,徐小娜,等. 野菊花中绿原酸与木樨草苷同时超声提取条件优化[J]. 广州化工,2012,40(5):8-10.
- [6] 杨海龙,臧恒昌,胡甜,等. 近红外漫反射光谱法对不同产地山楂的定性鉴别和定量分析[J]. 药物分析杂志,2014,34(3):396-401.
- [7] 崔永霞,吴明侠,许闽,等. 不同产地野菊花中绿原酸、4,5-二咖啡锡安奎尼酸的含量测定[J]. 中国现代应用药学,2012,29(9):799-801.
- [8] 李家春,萧伟,孙兰,等. 基于近红外光谱的白芍药材快速分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):57-60.

[责任编辑 顾雪竹]