

NIRS 快速测定河南产不同加工方法野菊花中木犀草素的含量

周琳琳, 王艳慧, 龚海燕, 胡小莉, 雷敬卫*

河南中医药大学, 郑州 450046

摘要: 本文利用近红外光谱技术(NIRS)快速测定河南产不同加工方法野菊花药材中木犀草素的含量。采用3种加工方法(直接晒干、蒸后晒干和炒后晒干)对河南新郑、三门峡和信阳三个不同产地的野菊花药材进行炮制加工, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定野菊花药材中木犀草素的含量, 采集野菊花药材的NIRS图谱, 运用偏最小二乘法(PLS)建立河南不同产区不同加工方法野菊花药材中木犀草素的定量分析模型。结果表明所建立的木犀草素定量分析模型的内部交叉验证相关系数(R^2)、校正均方差(RMSEC)、预测均方差(RMSEP)分别为0.94525、0.0142、0.0428; 验证集样品的木犀草素含量近红外预测值的平均相对偏差为2.95%, 预测性能良好。该方法测定高效、快捷、准确度高, 可用于河南产不同加工方法的野菊花药材中木犀草素含量的快速测定。

关键词: 野菊花; 不同加工方法; 木犀草素; 近红外光谱技术; 快速测定

中图分类号: O657.33

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.014

Quantitative Analysis of Luteolin in *Chrysanthemum indicum* Originating from Henan by Near-infrared Spectroscopy

ZHOU Lin-lin, WANG Yan-hui, GONG Hai-yan, HU Xiao-li, LEI Jing-wei*

Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Near-infrared spectroscopy method was established for the rapid determination of luteolin in *Chrysanthemum indicum* made by different processing methods and from different producing areas of Henan. Three manufacturing methods (drying directly, drying after steaming, drying after firing) were adopted to process wild chrysanthemum flower from Xinzheng, Sanmenxia and Luoyang, respectively. The content of luteolin in the *C. indicum* was measured by HPLC. The NIRS spectra of wild *Chrysanthemum* were collected. Then, the near-infrared spectroscopy was combined with PLS analysis to establish the quantitative model of luteolin in *C. indicum*. The correlation coefficients (R^2), root mean square error of calibration (RMSEC) and the root mean square error of predication (RMSEP) of the established quantitative analysis model of luteolin were 0.94525, 0.0142 and 0.0428, respectively. The near infrared prediction correlation coefficient of luteolin content in validation sets samples was 2.95%, which suggested good quality of prediction. The method was efficient, rapid and accurate, and can be used for the rapid determination of the content of luteolin in *C. indicum* from Henan.

Key words: *Chrysanthemum indicum*; different manufacturing methods; luteolin; NIRS; rapid determination

野菊花是菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 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]。野菊花具有抗炎抗氧化、抗肿瘤、抗菌抗病毒等功效^[2]。2015年版《中国药典》一部及相关文献报道将蒙花苷、木犀草素、绿原酸等作为野菊花的指标性成分进行含量测定, 其中, 木犀草素是天然的黄酮类化合物, 是野菊花药理活性的

主要成分之一, 具有消炎、抗菌、抗病毒、降血脂、降血糖等作用^[3-5]。传统的野菊花中木犀草素的测定方法通常为高效液相法或反高效液相法^[6-8], 均需要复杂的前处理, 不利于木犀草素含量的快速检测。

近红外光谱技术(NIRS)作为一种近年来被广泛应用于中药材定性定量分析中的绿色分析技术, 具有方便快捷, 无污染, 无复杂的前处理, 准确度高等优势^[9], 本文以河南三种不同产区不同加工方法野菊花药材为研究对象, 运用NIRS结合偏最小二乘法(PLS)快速测定野菊花药材中木犀草素含量, 建立其指标性成分木犀草素的近红外定量分析模

收稿日期: 2016-10-08 接受日期: 2016-12-02

基金项目: 河南中医学院科技创新人才项目(2014xcxrc03); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(162102310448)

* 通讯作者 Tel: 86-371-65575596; E-mail: 851282210@qq.com

型,为研究不同产地、不同加工方法的野菊花中指标性成分的含量测定提供新方法。

1 仪器与材料

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 Analyst8.0 分析软件,美国 Thermo Nicolet 公司);Waters2695 型高效液相色谱仪(配有 2695-2414 系统,美国 Waters 公司);FW-100 高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司);AL204 型万分之一天平与 H54AR 型十万分之一天平(瑞士 METTLER 公司);Milli-Q Academic A10 超纯水机(美国 Millipore 公司);HH-S6 电子恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限公司)。

木犀草素对照品(批号: MUST-11051001,纯度 $\geq 98\%$)购自成都曼思特生物科技有限公司;甲醇为色谱纯、无水乙醇为分析纯。野菊花药材采于河南三个产区,经河南中医学院陈随清教授鉴定为野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的头状花序。对所采集的样品进行加工编号,其中 1-10、31-40、61-70 号样品为直接晒干;11-20、41-50、71-80 为炒后晒干;21-30、51-60、81-90 号样品为蒸后晒干。

2 实验方法

2.1 近红外光谱的采集

取上述 90 份野菊花样品适量,粉碎,过 40 目筛。采用积分球漫反射,分辨率 8 cm^{-1} ,扫描次数 64 次,扫描范围 $12000\sim 4000\text{ cm}^{-1}$,温度 $18\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度 34%。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,按上述实验条件进行扫描,每个样品重复扫描 3 次,求平均光谱。90 份野菊花样品的近红外光谱叠加图见图 1。

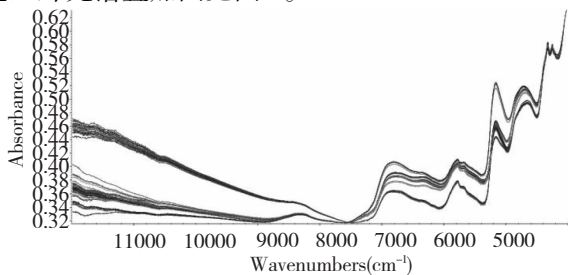


图 1 90 份野菊花样品的近红外原始光谱叠加图

Fig. 1 NIRS spectra of 90 *Chrysanthemum* samples

2.2 野菊花药材中木犀草素含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱 Diamonsil C_{18} 色谱柱($4.6 \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$);流动相为 0.05% 磷酸-甲醇(39:61);柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$;检测波长为 380 nm ;流速 1.0 mL/min ,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.2.2 溶液的制备

对照品溶液的配制:取木犀草素对照品适量,精密称定,加 75% 乙醇溶解,制成每 1 mL 含木犀草素 $68\text{ }\mu\text{g}$ 的溶液,即得。

供试品溶液的制备:精密称取 1 项下野菊花样品各 0.2 g ,置 50 mL 具塞三角瓶中,精密加入 75% 乙醇 10 mL,称定重量,水浴($80\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h),放冷,再称定重量,补足失去的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 方法学验证

线性关系考察:取 2.2.2 项下木犀草素对照品溶液,分别精密吸取 1、3、5、7、9 μL ,注入高效液相色谱仪,按 2.2.1 项下的色谱条件测定峰面积。以对照品的进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制出标准曲线,计算得回归方程为: $Y = 2E + 06X - 26328$,相关系数 $R^2 = 0.9999$ 。木犀草素进样量在 $0.068\sim 0.612\text{ }\mu\text{g}$ 时与峰面积呈良好的线性关系。

精密度实验:取 2.2.2 项下供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件,重复进样 6 次,测得木犀草素的峰面积,计算 RSD 为 0.80%,结果表明仪器精密度良好。

重复性实验:取 2.2.2 项下供试品溶液 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件进样,测定木犀草素含量,其 RSD 为 1.5%,表明本实验方法重复性较好。

稳定性实验:取 2.2.2 项下供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样,分别在 0、2、4、6、8、10、12 h,测得木犀草素峰面积,其 RSD 为 0.85%,表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

加样回收率实验:取 4 号野菊花样品 9 份,精密称定 0.20 g ,分 3 组,分别按样品木犀草素含量的 80%、100% 和 120% 加入木犀草素标准品,按 3.1 项下制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定木犀草素的含量。测得样品的平均回收率为 99.41%,RSD 值为 0.51%,结果表明该方法准确度较高。

2.2.4 野菊花中木犀草素的含量测定

下色谱条件进样,计算 90 批样品野菊花中木犀草素

取 2.2.2 项下的 90 份供试品溶液,按 2.2.1 项 的含量,结果见表 1:

表 1 90 份野菊花样品木犀草素含量测定结果(%)

Table 1 The content of luteolin in 90 *Chrysanthemum* samples(%)

新郑 Xinzheng		三门峡 Sanmenxia		信阳 Xinyang	
编号 No.	木犀草素含量 Content of luteolin(%)	编号 No.	木犀草素含量 Content of luteolin(%)	编号 No.	木犀草素含量 Content of luteolin(%)
1	0.46	31	0.32	61	0.26
2	0.45	32	0.33	62	0.23
3	0.44	33	0.32	63	0.22
4	0.43	34	0.32	64	0.24
5	0.45	35	0.33	65	0.23
6	0.45	36	0.31	66	0.23
7	0.43	37	0.32	67	0.25
8	0.46	38	0.33	68	0.22
9	0.42	39	0.34	69	0.23
10	0.45	40	0.29	70	0.22
11	0.39	41	0.25	71	0.26
12	0.38	42	0.27	72	0.28
13	0.39	43	0.25	73	0.29
14	0.41	44	0.26	74	0.31
15	0.39	45	0.29	75	0.28
16	0.37	46	0.31	76	0.32
17	0.41	47	0.26	77	0.3
18	0.37	48	0.25	78	0.26
19	0.38	49	0.27	79	0.25
20	0.39	50	0.28	80	0.26
21	0.36	51	0.24	81	0.22
22	0.34	52	0.23	82	0.21
23	0.36	53	0.24	83	0.24
24	0.35	54	0.24	84	0.24
25	0.35	55	0.23	85	0.21
26	0.36	56	0.22	86	0.23
27	0.34	57	0.24	87	0.21
28	0.35	58	0.31	88	0.22
29	0.34	59	0.27	89	0.24
30	0.33	60	0.28	90	0.22

由表 1 可知:河南三个产区的野菊花中木犀草素的含量相比较,新郑 > 三门峡 > 信阳;且三个产区野菊花中的木犀草素的含量直晒 > 炒晒 > 蒸晒;不同的产地加工方法对木犀草素含量有一定影响,新

郑和三门峡两个产区的直接晒干的野菊花药材中木犀草素含量最高,蒸晒的野菊花中木犀草素含量最低。不同产地加工方法对信阳产区的野菊花中木犀草素含量影响不大。

2.3 近红外定量模型的建立

根据野菊花木犀草素含量的分布范围,将样品随机分为校正集和验证集,并保证校正集样品浓度范围大于验证集^[10]。校正集和验证集的含量分布见表2。利用 TQ 8.0 软件对样品光谱进行处理,采用偏最小二乘法(PLS)对校正集样品建立校正模

表2 定量分析模型校正集和验证集木犀草素含量分布(%)

Table 2 Luteolin content distribution of calibration and validation set(%)

项目 Project	样品数量 Number of sample	最大值 Maximum(%)	平均值 Mean(%)
校正集 Calibration set	70	0.46	0.31
验证集 Validation set	20	0.45	0.29

3 结果与分析

3.1 木犀草素定量校正模型的建立

由于光谱的原始数据中除含有与样品组成有关的化学信息外,还含有来自于各方面的噪声影响,如电噪声、杂散光、样品背景干扰等。因此,光谱预处理的主要目的是滤除噪声干扰、优化光谱信号,为下

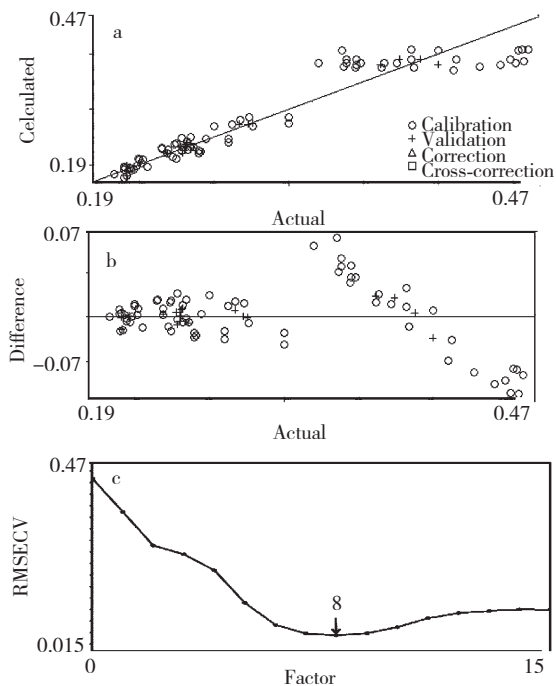


图2 木犀草素含量预测值与参考值的相关性(a)、偏差图(b)以及RMSECV与主成分之间的相关图(c)

Fig.2 Correlation(a) and deviation(b) of NIR predicted values and reference values of the content of luteolin as well as variation of RMSECV with the change of principal components(c)

型,同时作交叉验证,根据近红外定量校正模型的主要参数确定最佳模型。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。对于同一样品集所构建的近红外定量校正模型来说,相关系数越大、均方差越小,表明所建模型适用性越强、预测效果越好^[11]。

步校正模型的建立打下基础。另外,通过谱图的预处理,还可解决模型的适用性和模型的传递问题。采用 TQ 8.0 软件对 NIR 光谱进行全面分析,以 2.3.1 项下的近红外定量模型参数为依据,最终确定对 NIR 光谱进行标准正则变换(SNV) + 一阶导数法(FD) + N-D 平滑法处理,在 8824.66 ~ 5869.88 cm^{-1} 谱区范围内选择前 8 个主成分建立了木犀草素的定量分析模型,见图 2。其各评价指标 R^2 为 0.9424, RMSEC 为 0.0142, RMSEP 为 0.0428。结果表明,模型预测性良好。

3.2 木犀草素定量分析模型的验证

以上述建立的模型,将验证集样品的近红外谱图代入模型中,得到预测值,将 HPLC 的测定值作为参考值来对模型进行检验。结果见表 3。验证集木犀草素参考值与预测值的相关性,见图 3。

由表 3 可知:20 份验证集样品预测值平均相对偏差为 2.95%,预测相关系数(r^2)为 0.9215,预测结果较为准确。

4 讨论与结论

木犀草素作为野菊花药材有效成分之一,具有较为实用的药理价值,传统的木犀草素的含量测定在成分提取时多采用超声或水浴提取,前处理较为复杂,且有大量的试剂消耗,检测周期较长,使原药材在收购和流通过程的快速、批量检测方面的难度加大,而近红外光谱技术作为近年来被广泛应用于中药材定性定量分析的一种快速、绿色的分析技术,大大弥补了传统分析技术的缺点,可准确、快速的完成对野菊花药材中木犀草素的含量测定。

本实验的研究对象选自河南三个不同产区的

表3 20份验证集样品的预测值和参考值(%)

Table 3 NIR predicted values of 20 samples in validation set(%)

样品编号 No.	参考值 Reference value(%)	预测值 Predicted value(%)	绝对偏差 Absolute deviation(%)	相对偏差 Relative deviation(%)	平均相对偏差 Mean relative deviation(%)
5	0.45	0.44	-0.01	-2.27	
11	0.39	0.38	-0.01	-2.63	
18	0.37	0.39	0.02	5.13	
19	0.38	0.36	-0.02	-5.56	
33	0.32	0.33	0.01	3.03	
37	0.32	0.34	0.02	5.88	
38	0.33	0.32	-0.01	-3.13	
42	0.27	0.28	0.01	3.57	2.95
43	0.25	0.27	0.02	7.41	
44	0.24	0.26	0.02	7.69	
58	0.31	0.3	-0.01	-3.33	
63	0.22	0.23	0.01	4.35	
64	0.24	0.26	0.02	7.69	
73	0.29	0.28	-0.01	-3.57	
74	0.31	0.33	0.02	6.06	
75	0.28	0.26	-0.02	-7.69	
77	0.3	0.32	0.02	6.25	
80	0.26	0.28	0.02	7.14	
83	0.24	0.25	0.01	4.00	
90	0.22	0.21	-0.01	-4.76	

90批样品,其含量覆盖范围较广,具有一定的代表性。2015版中国药典一部及相关文献记载野菊花的炮制加工方法有晒干、蒸后晒干和炒后晒干,实验中以这三种炮制加工所得的野菊花为研究对象,所得木犀草素含量测定范围为0.21%~0.46%,不同产区、不同加工方法的野菊花药材中木犀草素的含量有差异,这也与相关文献研究的结果是一致的^[8]。

实验利用近红外光谱技术结合化学计量法建立了河南不同产区、不同加工方法的野菊花中木犀草素的定量分析模型,该方法快速、准确,且操作简便、无污染,为野菊花中木犀草素成分的快速测定提供了新的检测方法。本课题还将持续采集更多不同产地、不同加工方法的野菊花样本,不断充实完善检验模型,以提高模型的适用性。

参考文献

1 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, 2015. Vol I,314.

- Liu YP(刘远俊), Wang SP(王双平), Wen N(温娜), et al. Research progress on activity and mechanism of extracts from *Chrysanthemum*. *Guangxi Tradit Chin Med*(广西中医药), 2015, 38(6):11-13.
- Zhao CQ(赵长祺), Guo ZY(郭志义). Progress in pharmacological action research of luteolin. *J Chengde Med Coll*(承德医学院学报), 2015, 2:148-150.
- Wang JS(王继双), He Y(何焱), Zhang WJ(张文静), et al. Progress in pharmacological action research of luteolin. *Life Sci*(生命科学), 2013, 25:561-565.
- Li XX(李星霞), Guo C(郭澄). Study on the pharmacological activity of luteolin. *China Dispensary*(中国药房), 2007, 18:1421-1424.
- Cui LC(崔兰冲), Li XQ(李小琴), Han Y(韩莹), et al. Determination of linarin in Flos *Chrysanthemi Indici* and luteolin by HPLC. *China J Tradit Chin Med*(中国中药杂

- 志), 2007, 32(1):33-35.
- 7 Wang JJ(王锦军), Zhang XM(张秀梅), Wang HL(王宏林). Simultaneous determination of quercetin in *Herba plantaginis*, luteolin, kaempferol, apigenin content by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chin Pat Drug(中成药)*, 2008, 31:772-775.
- 8 Xia BH(夏伯候), Zhou YM(周亚敏), Xie JC(谢家驰), et al. Determination of 5 antioxidant active components in *Chrysanthemum* by UPLC. *Tradit Chin Med Mater(中药材)*, 2016, 39:348-351.
- 9 Zhan H(战皓), Liu MT(柳梦婷), Fang J(方婧), et al. Recent advances in the application of near infrared spectroscopy in identification and determination of traditional Chinese Medicine. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2015, 21:231-234.
- 10 Zhang SN(章顺楠), Yang HL(杨海雷), Liu ZQ(刘占强). On line monitoring of active components in Compound Danshen Dripping Pills by near infrared spectroscopy. *J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2009, 29:192-196.
- 11 Zhang W(张威), Bai Y(白雁), Lei JW(雷敬卫). Determination of Baicalin in Radix extract by near infrared spectroscopy. *Computer Appl Chem(计算机与应用化学)*, 2010, 27:1698-1699.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

丁克	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹胜	吕兆林
DING Ke	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin
伍婉卿	刘相国	孙昊鹏	孙桂波	孙黔云	李芸霞
WU Wanqing	LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	SUN Qianyun	LI Yunxia
李良成	李国友	邱莉	汪海波	沐万孟	张炳火
LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo
陈益华	林茂祥	林昌俊	欧阳杰	易华西	罗应刚
CHEN Yihua	LIN Maoxiang	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi	LUO Yinggang
周文	胡友财	袁涛	夏永刚	高慧敏	唐金山
ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan
黄胜雄	韩淑燕	蓝蔚青	廖晨钟	潘卫东	薛永波
HUANG Shengxiong	HAN Shuyan	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	PAN Weidong	XUE Yongbo