

基于自组织竞争型神经网络的青果 HPLC 指纹图谱

林海明¹, 高昭¹, 汪虎林¹, 李丹丹¹, 廖珊¹, 林励^{1*}, 魏航², 祁龙凯¹

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学 医学信息工程学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:利用自组织竞争型神经网络判别不同产地青果的指纹图谱,为青果的质量评价奠定基础。方法:色谱条件采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(2)100A(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-1% 甲酸,检测波长 270 nm,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 20 °C,建立不同产地青果的指纹图谱,利用竞争层神经元数目为 3,学习率为 0.01,收敛次数为 690 的自组织竞争型人工神经网络模型对其进行分类判别。结果:自组织竞争型神经网络模型对青果 HPLC 指纹图谱分类平均错误率为 39.13%。结论:自组织竞争型神经网络模型无法将不同产地的青果有效分类,不同产地的青果化学成分种类及含量差异不明显。

[关键词] 青果; 自组织竞争型神经网络; 高效液相色谱指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0044-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090044

HPLC Fingerprint of Canarii Fructus Based on Self-organization Competitive Neural Network

LIN Hai-ming¹, GAO Zhao¹, WANG Hu-lin¹, LI Dan-dan¹,
LIAO Shan¹, LIN Li^{1*}, WEI Hang², QI Long-kai¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. School of Medical Information Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the self-organization competitive neural network method for distinguishing the fingerprints of Canarii Fructus from different producing areas, and lay the foundation for quality evaluation of Canarii Fructus. **Method:** The fingerprints of Canarii Fructus from different producing areas of Canarii Fructus were established by HPLC on Phenomenex Luna C₁₈ column (2) 100A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with acetonitrile-1% methanoic acid as the mobile phase; the detection wavelength was 270 nm; the flow rate was 0.8 mL · min⁻¹ and the column temperature was 20 °C. Then the self-organization competitive neural network model was used to distinguish the Canarii Fructus from different producing areas, with 3 competition layer neurons, a learning rate of 0.01, and 690 convergence times. **Result:** The self-organization competitive neural network for distinguishing Canarii Fructus from different producing areas was established, but the rate of error for HPLC fingerprint extract was 39.13% in average. **Conclusion:** The self-organizing competitive neural network can not be used to effectively distinguish the Canarii Fructus from different producing areas, as the differences in types and contents of chemical compositions of Canarii Fructus from different producing areas are not evident.

[Key words] Canarii Fructus; self-organization competitive neural network; HPLC fingerprint

[收稿日期] 20150715(004)

[基金项目] 广东省大学生创新创业训练计划项目(1057213010)

[第一作者] 林海明,在读学士,从事中药化学成分分析研究,Tel:18656251994,E-mail:466783776@qq.com

[通讯作者] * 林励,研究员,从事中药资源开发与新药研究,Tel:020-39358270,E-mail:ll76611@126.com

中药青果是清热解毒、利咽生津之常用中药^[1]。青果品种较多,常见的有檀香、长营、自来圆等,其中以福建省栽培的最多,并被收载入《福建省中药材标准》,在广东、四川、浙江等地亦有分布^[2]。随着青果需求量的不断增加,其栽培面积也逐年扩大,并在多地建立了 GAP 基地^[3]。在 2010 年版《中国药典》中该品种项下仅见性状、显微和薄层鉴别等质控方法,其本身也存在着藏青果(使君子科)、余甘子(大戟科)、油橄榄(木犀科)等多种混淆种类,因此青果的质量评价体系尚不完善。人工神经网络是一种旨在模拟人脑结构及其功能的脑式智能信息处理系统^[4]。其中自组织竞争型神经网络是一种无导师学习,通过竞争的机制自动寻找样本中的内在规律和本质属性,自组织自适应的改变网络参数,对具有共同特征的事物进行准确分类的人工神经网络^[5-7],已在信息处理、医学等领域得到广泛应用。近年来,我国众多研究人员在此方面开展了大量的工作,使自组织竞争型神经网络模型在 HPLC 指纹图谱技术中得到了长足发展,但在中药领域的发展尚不深入。因此,本研究将竞争型神经网络模型应用于不同产地青果指纹图谱的分类判别,可显著提升指纹图谱判别青果产地的高效性、客观性、科学性,为中药青果的质量评价提供了新的途径。

1 材料

1.1 仪器 2695 型高效液相色谱仪(2998 型 PDA 检测器,美国 Waters 公司),BP211D 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartoriou),Phenomenex Luna C₁₈(2) 100A 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 广州菲罗门科学仪器有限公司)。

1.2 试药 没食子酸对照品(纯度 ≥ 98%,上海金穗生物科技有限公司,批号 20141027),乙腈、甲酸为色谱纯,其余试剂均为市售分析纯。

青果鲜品均自采,见表 1,经广州中医药大学中药学院中药鉴定室黄海波副教授鉴定,全部样品均为橄榄科植物橄榄 *Canarium album* 的成熟果实,样品均留样于广州中医药大学中药学院实验管理中心。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 根据相关文献资料及预试验筛选,确定试验条件如下,将 16 批青果鲜品分别在 70 °C 烘干至干燥恒重,粉碎,过 2 号筛,备用。取恒重干燥的药材粗粉约 1 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加 70% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声提取 30 min,取出,放冷,用 70% 甲醇补足减失的质量,

摇匀,以 0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

表 1 青果样品来源

Table 1 Resource of *Canarii Fructus* samples

No.	形态均值 (长 × 宽) (干品)	产地或购置地	采收或 购置时间 (2014 年)
G1	3.1 cm × 1.8 cm	广东省潮州市潮安区	10 月上旬
G2	3.3 cm × 1.5 cm	广东省潮州市潮安区	10 月上旬
G3	3.3 cm × 1.7 cm	广东省潮州市雷岭山	10 月上旬
G4	3.3 cm × 2.0 cm	广东省梅州市丰顺县留隍镇	10 月下旬
G5	3.2 cm × 1.6 cm	广东省高州市根子镇	9 月下旬
G6	3.1 cm × 1.3 cm	广东省揭阳市惠来县葵潭镇	10 月上旬
G7	3.5 cm × 1.7 cm	广东省广州市小洲村	9 月下旬
F1	3.5 cm × 1.8 cm	福建省福清市	10 月上旬
F2	3.0 cm × 1.5 cm	福建省福州市闽侯县鸿尾乡奎石村	10 月中旬
F3	3.3 cm × 1.9 cm	福建省福州市闽侯县白沙镇	10 月下旬
F4	3.5 cm × 1.3 cm	福建省福州市闽侯县白沙镇	10 月下旬
F5	4.0 cm × 1.6 cm	福建省福州市闽清县梅溪镇梅埔村	10 月中旬
F6	3.7 cm × 1.6 cm	福建省福州市闽清县梅溪镇梅埔村	10 月中旬
S1	3.6 cm × 1.6 cm	四川省泸州市合江县	10 月中旬
S2	3.4 cm × 1.8 cm	四川省泸州市纳溪区打鼓镇	10 月中旬
S3	3.0 cm × 2.1 cm	四川省泸州市纳溪区上马镇	10 月下旬

2.2 对照品溶液制备 取没食子酸对照品适量,精密称定,加 70% 甲醇制成每 1 mL 含没食子酸 0.2 mg 的溶液,即得。

2.3 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈(2) 100A 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-1% 甲酸(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 95% A; 10 ~ 15 min, 95% ~ 80% A; 15 ~ 40 min, 80% ~ 72% A; 40 ~ 70 min, 72% ~ 50% A; 70 ~ 74 min, 50% ~ 95% A; 74 ~ 78 min, 95% A),检测波长 270 nm,流速 0.8 mL · min⁻¹,柱温 20 °C。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度 取同一批号药材粉末,按供试品溶液制备方法处理,按上述色谱条件重复进样 6 次,每次 10 μL,结果测得没食子酸峰面积 RSD < 3%。表明仪器的精密度良好。

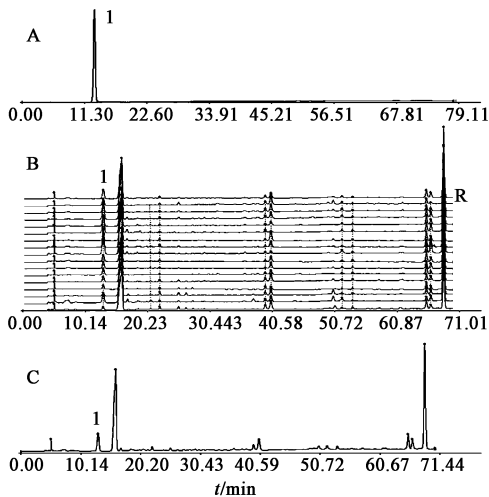
2.4.2 稳定性考察 取同一批号药材粉末,按供试品溶液制备方法处理,按上述色谱条件在 0, 2, 4, 6, 8, 16, 24 h 分别进样,结果测得没食子酸峰面积

RSD < 3%。表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4.3 重复性考察 取同一批号药材粉末共 5 份, 分别按供试品溶液制备方法处理, 按上述色谱条件进样测定, 结果测得没食子酸峰面积 RSD < 3%。说明试验方法的重复性良好。

2.5 相似度评价及聚类分析

2.5.1 相似度评价 使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)对 16 批不同产地青果药材的 HPLC 指纹图谱进行匹配分析, 得到指纹对照图谱及叠加图, 见图 1, 并识别出包括没食子酸在内的 12 个共有峰。采用中位数法, 计算每个样品之间的相似度, 其相似度分布范围为 84.6% ~ 99.8%。说明不同样品间的相似度较高, 无法体现产地间的差异性。



A. 对照品; B. 16 批青果; R, C. 对照谱; 1. 没食子酸

图 1 青果 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of Canarii Fructus

2.5.2 聚类分析 为了消除各指标变化幅度的不同对聚类分析结果的影响, 在聚类分析之前要进行数据的归一化处理, 即把每批样品的峰面积数据映射到 [0, 1] 区间。公式为 $Y = (X_k - X_{min}) / (X_{max} - X_{min})$ 。其中 Y 为转换后的值; X_k 表示色谱指纹图谱中第 k 个样品该种共有峰的峰面积; X_{max} , X_{min} 分别为不同样品中该种共有峰峰面积的最大值和最小值。

将处理后的数据导入 SPSS 软件进行聚类分析。分别采用“组间联接”、“组内联接”、“中位数聚类法”、“ward 聚类法”等 7 种聚类方法, 以及“Euclidean 距离”、“平方 Euclidean 距离”、“余弦”等 8 种距离进行系统聚类分析。以产地为分类依据对分类结果进行判定, 均未有一种组合方法可使分

类结果的正确率达 80% 以上。

2.6 人工神经网络建模 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)对青果药材 HPLC 指纹图谱进行平移校正, 将得到的 12 个共有峰数据归一化处理后进行建模。利用 Matlab2009 软件建立自组织竞争型人工神经网络模型, 通过单因素变量法对试验数据进行测试, 优化收敛次数和学习速率, 发现当竞争层神经元数目为 3, 学习速率为 0.01, 收敛次数为 690 时结果较佳。从广东(7 批), 福建(6 批), 四川(3 批)3 个产地各取 1 批样品作为测试样本, 其他 13 批样品作为训练样本, 对人工神经网络进行训练并测试。按照上述方法依次进行操作, 共进行 63 (即 $7 \times 6 \times 3/2$) 组操作。结果测得在训练样本不同时自组织竞争型人工神经网络模型对于青果 HPLC 指纹图谱的平均测试错误率 $(39.13 \pm 2.06)\%$, 见表 2。

表 2 青果 HPLC 指纹图谱人工神经网络训练

Table 2 Result of infrared fingerprint of SOFM for Canarii Fructus

No.	错误数/个	错误率/%	No.	错误数/个	错误率/%
1	2	66.70	33	1	33.30
2	1	33.30	34	1	33.30
3	2	66.70	35	2	66.70
4	2	66.70	36	1	33.30
5	1	33.30	37	1	33.30
6	2	66.70	38	0	0.00
7	1	33.30	39	1	33.30
8	1	33.30	40	1	33.30
9	1	33.30	41	1	33.30
10	1	33.30	42	1	33.30
11	1	33.30	43	1	33.30
12	1	33.30	44	1	66.70
13	3	100.00	45	1	66.70
14	1	33.30	46	1	33.30
15	1	33.30	47	1	33.30
16	1	33.30	48	1	33.30
17	0	0.00	49	1	33.30
18	1	33.30	50	1	33.30
19	1	33.30	51	1	33.30
20	1	33.30	52	1	33.30
21	1	33.30	53	1	33.30
22	2	66.70	54	1	33.30
23	1	33.30	55	1	33.30
24	1	33.30	56	1	33.30
25	2	66.70	57	1	33.30
26	2	66.70	58	1	33.30
27	1	33.30	59	1	33.30
28	1	33.30	60	1	33.30
29	1	33.30	61	1	33.30
30	1	33.30	62	1	33.30
31	2	66.70	63	1	33.30
32	1	33.30			

3 讨论

本研究利用高效液相色谱法,建立了不同产地青果指纹图谱。结果表明样品中各组分的色谱峰基本分离,该方法稳定、快速、重复性好、灵敏度高,对于青果成分的研究具有一定的借鉴意义。另外,将现代信息科学技术与色谱指纹图谱技术相结合,运用于中药领域,为中药材的质量评价提供了新的发展方向。

在试验过程中曾尝试采用聚类分析对样品数据进行处理,聚类分析是一种可根据数据的特征按照样品的亲属关系将其分为若干类的探索性分类方法。但采用的系统聚类中的方法均不能对不同产地青果 HPLC 指纹图谱进行有效聚类。而人工神经网络属于无导师监督模式,试验结果客观性好,可重复性强,与聚类分析相比无需进行复杂的前期数据处理,可直接应用色谱数据进行判别。为了全面客观地反映中药青果的特点,筛选了青果 HPLC 指纹图谱中包括没食子酸在内的多组共有峰进行平移校正,输入不同的收敛次数进行计算比较,但其判别结果的平均错误率 39.13%,因此建立自组织竞争型神经网络模型无法对广东、福建和四川 3 个产地的青果进行有效分类。这说明不同产地的青果化学成分种类及含量差异不明显。

据多数资料记载福建青果种植历史悠久,栽培采收加工技术成熟,品质最佳,但从其成分的种类及含量的角度比较,不同产地的青果成分差异并不大。

因此,笔者认为青果的质量评价不宜从产地着手。有相关研究表明^[8],同一产地不同品种或采收期的青果药材,其主要成分没食子酸的含量存在一定的差异。故在后续研究中,研究人员可尝试从青果的品种或采收时间着手对其药用价值进行细化研究。

[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,2010:183-185.
- [2] 黄坚航. 福建橄榄道地性研究[J]. 亚太传统医药, 2006(8):77-78.
- [3] 范敏,宋良科,汤昊. 青果的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010,38(34):19358-19360.
- [4] 毛健,赵红东,姚婧婧. 人工神经网络的发展及应用[J]. 电子设计工程, 2011,19(24):62-65.
- [5] 王家华,李志勇,周冠武. 基于 Matlab 的自组织神经网络在油气层识别中的应用研究[J]. 数字社区 & 智能家居, 2006,35(12):119-121.
- [6] 刘丽平,李昂,连森阳,等. 自组织映射神经网络在生物信息学中的应用[J]. 中国家禽, 2011,33(6):47-50.
- [7] 刘波平,荣菡,邓泽元,等. 基于 PLS-自组织竞争神经网络近红外光谱技术对鲜乳和掺假乳的检测方法研究[J]. 分析测试学报, 2008,27(11):1147-1150.
- [8] 廖婉,黄金珠,王继森,等. 不同产地青果中没食子酸含量的比较研究[J]. 成都大学学报:自然科学版, 2012,31(3):215-217.

[责任编辑 顾雪竹]