

基于近红外光谱的淫羊藿定性鉴别及定量检测

范茹军¹, 秦晓晔², 宋岩^{2*}, 陶贵斌²

(1. 吉林大学白求恩制药厂, 长春 130012; 2. 长春中医药大学中医药与生物工程研发中心, 长春 130021)

[摘要] 目的: 对淫羊藿进行产地的定性鉴别和主成分的定量检测。方法: 对9个不同产地的样品分别对其采用矢量归一化、一阶导数、一阶导数加上矢量归一化的预处理方法进行定性检测; 通过高效液相色谱法得到淫羊藿主成分的含量, 并将其与对应的近红外漫反射光谱相对应, 利用多元散射校正方法进行处理, 建立偏最小二乘定量校正模型。结果: 采用矢量归一化的预处理方法所得的定性模型效果最好, 聚类结果令人满意, 误分率为0, 可将不同产地淫羊藿样品进行定性鉴别; 偏最小二乘法所得到的预测集样本的标准偏差为0.0206, 建立的模型预测精度非常高, 预测效果良好。结论: 所建立的方法操作简单, 测定速度快, 费用低, 无需进行复杂的前处理, 可直接对大量未知样品进行测定, 为近红外光谱技术应用于药物检测与分析提供了有效的方法和依据。

[关键词] 淫羊藿; 近红外光谱; 化学计量学; 偏最小二乘; 定性鉴别; 定量检测

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0085-05

Qualitative Identification and Quantitative Detection of Epimedy Based on Near Infrared Spectroscopy

FAN Ru-jun¹, QIN Xiao-ye², SONG Yan^{2*}, TAO Gui-bin²

(1. Pharmaceutical Factory, Normal Bethune University of Medical Science, Changchun 130012, China;

2. Development Center for Chinese Medicine and Bioengineering, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

[Abstract] Objective: Near infrared (NIR) spectroscopy and chemometrics were used to identify the origins of *Aceranthus sagittatus* samples and to quantitatively analyze their active ingredients. **Method:** Nine different samples collected from different areas were analyzed, using vector normalization and/or first-order derivative processing methods. The active ingredients of these *Aceranthus sagittatus* samples were determined using HPLC method, and then they were used as the training data to generate the NIR quantitative analysis model using partial least square (PLS) method. **Result:** The results suggest that the vector normalization data processing gave us better qualitative identification model, the cluster analysis gave us satisfactory results. The classification error rate was 0. It can effectively identify the different origins of the samples thus this resulted qualitative analysis model can be used to quickly identify the origin of unknown samples. The PLS method indicated that the standard deviation of the prediction was 0.0206, which means that it has very good accuracy of prediction. **Conclusion:** This analysis method is fast, simple and low-cost, which provides us a novel way for the qualitative identification of herbal medicine.

[Key words] epimedy; near infrared spectroscopy; chemometrics; partial least square; qualitative identification; quantitative detection

[收稿日期] 20100622(003)

[第一作者] 范茹军, 工程师, 从事药品检验工作, E-mail: fanrujun2002@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 宋岩, 副研究员, 从事中药化学研究, Tel: 13944091551, E-mail: ccutcm@tom.com

淫羊藿是一味常用中药, 为小檗科 (Berberidaceae) 淫羊藿属 (Epimedium) 多年生草本植物的干燥地上部分, 是我国传统补肾类中药。现代药理实验表明, 淫羊藿能增加心脑血管血流量, 促

进造血功能、免疫功能及骨代谢,还具有抗衰老、抗肿瘤等作用^[1-5]。目前一致认为淫羊藿主要有效成分为黄酮类成分,因此,进行淫羊藿中黄酮类成分的研究,测定淫羊藿中黄酮类成分的含量,制定其相应的质量标准,开发其潜在的药用价值,对有效、合理利用淫羊藿资源具有十分重要的意义。但近年来主要采用紫外分光光度法^[6]和高效液相色谱法^[7],这两种方法虽然具有重现性较好、阴性样品无干扰等优点,但也存在操作比较烦琐,费时、费力等不足之处,而应用了化学计量学方法的近红外光谱法具有快速、无损、原位等优点,不仅可以对样品进行定性鉴别(产地、真伪等)^[8-10],还可以对其主成分进行快速的定量分析,这在中药的定性定量检测中扮演着非常重要的角色^[11-13]。

1 仪器与试药

仪器是由德国布鲁克公司提供的 MPA 近红外光谱仪。扫描的范围是 12 500 ~4 000 cm^{-1} ,积分球漫反射检测器,分辨率为 8 cm^{-1} ,扫描次数为 64 次,使用的采集软件为设备附带的软件 OPUS 6.0 以及 OriginLab 公司的 Origin 7.5。每个样品在不同时间扫描 3 次。

朝鲜淫羊藿野生样品分别采自吉林省集安的榆树、头远、清河、古马岭,抚松的漫江、万良,柳河的凉水,通化的三颗榆树、大都岭、富江、合厂,靖宇的榆树川、西南岔、榆树乡等地;朝鲜淫羊藿栽培样品分别采自吉林省通化的龙头及园艺两个栽培基地。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿的近红外光谱定性聚类鉴别 聚类分析是数理统计中的一种方法,特别是用于试样归属不清楚的情况,其基本思想是首先定义试样之间和类与类之间的距离。在各自成类的试样中,将距离最近的两类合并,重新计算新类与其他类的距离,并按最小距离归类,重复此过程,每次减少一类,直到所有的试样都归为一类为止。其聚类过程用图表示,成为聚类图。定义类与类之间距离有多种方法,不同的定义就产生了不同的系统聚类分析方法。常用的主要有:最短距离法,最长距离法,平均距离法,加权平均距离法,中间距离法,重心法和 Ward's 算法。本文的聚类分析主要应用 Ward's 算法。以上所介绍的方法都是将两个最相似的组聚在一起,而 Ward 式技术试图找到最均匀的组。

取不同产地的淫羊藿粉末,置于 100 真空干

燥 1 小时,取出至于干燥器内冷却,然后再通过 100 目筛。选取 9 个不同产地的淫羊藿样品,对其进行了近红外漫反射光谱的检测,每个样品在不同时间测试 3 次,尽量消除不同的测试时间对样品造成的测试误差。所得到的光谱如图 1 所示。

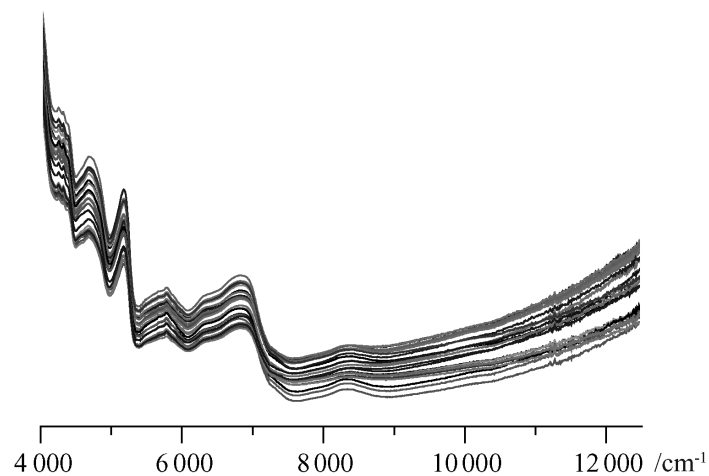


图 1 不同产地淫羊藿样品的近红外漫反射光谱图

对于以上样品本文分别采用矢量归一化,一阶导数,一阶导数加上矢量归一化的预处理方法,再利用 Ward's 算法,应用聚类分析中的标准法得到表征来源于 9 个不同产地样品系统关系树状图,如图 2 所示。

由上述 9 种不同产地的淫羊藿样品的近红外漫反射光谱的 3 种不同预处理的聚类分析结果来看,采用矢量归一化的预处理方法所得的定性模型效果最好,聚类结果令人满意,误分率为 0,达到了将不同产地淫羊藿样品进行定性鉴别的目的。尤其对于其他产地来说,我们可以利用已经建立的定性模型,快速给出未知产地淫羊藿的定性结果。

2.2 基于偏最小二乘的淫羊藿近红外光谱的定量分析

2.2.1 样品中淫羊藿苷含量的化学测定 上述样品经处理后,利用高效液相色谱(HPLC)技术对样品中的主成分进行分离,测得淫羊藿苷的峰面积值,如表 1 所示。由于其峰面积值与淫羊藿苷含量具有线性关系,因此,在建模过程中,对各个样品的淫羊藿苷化学测定值以其峰面积值作为依据,并在建模前进行了归一化处理。

2.2.2 淫羊藿的近红外光谱及导数光谱 本实验采用与仪器配套的小玻璃杯装样,尽量保证样品的松紧度一致,以减少样品不均所产生的散射,并对淫羊藿样品在不同时间测量 3 次,尽量消除不同的测试时间对样品造成的测试误差。所得的结果如图 3 所示。同时,为了消除由于偏移和漂移引起的光谱

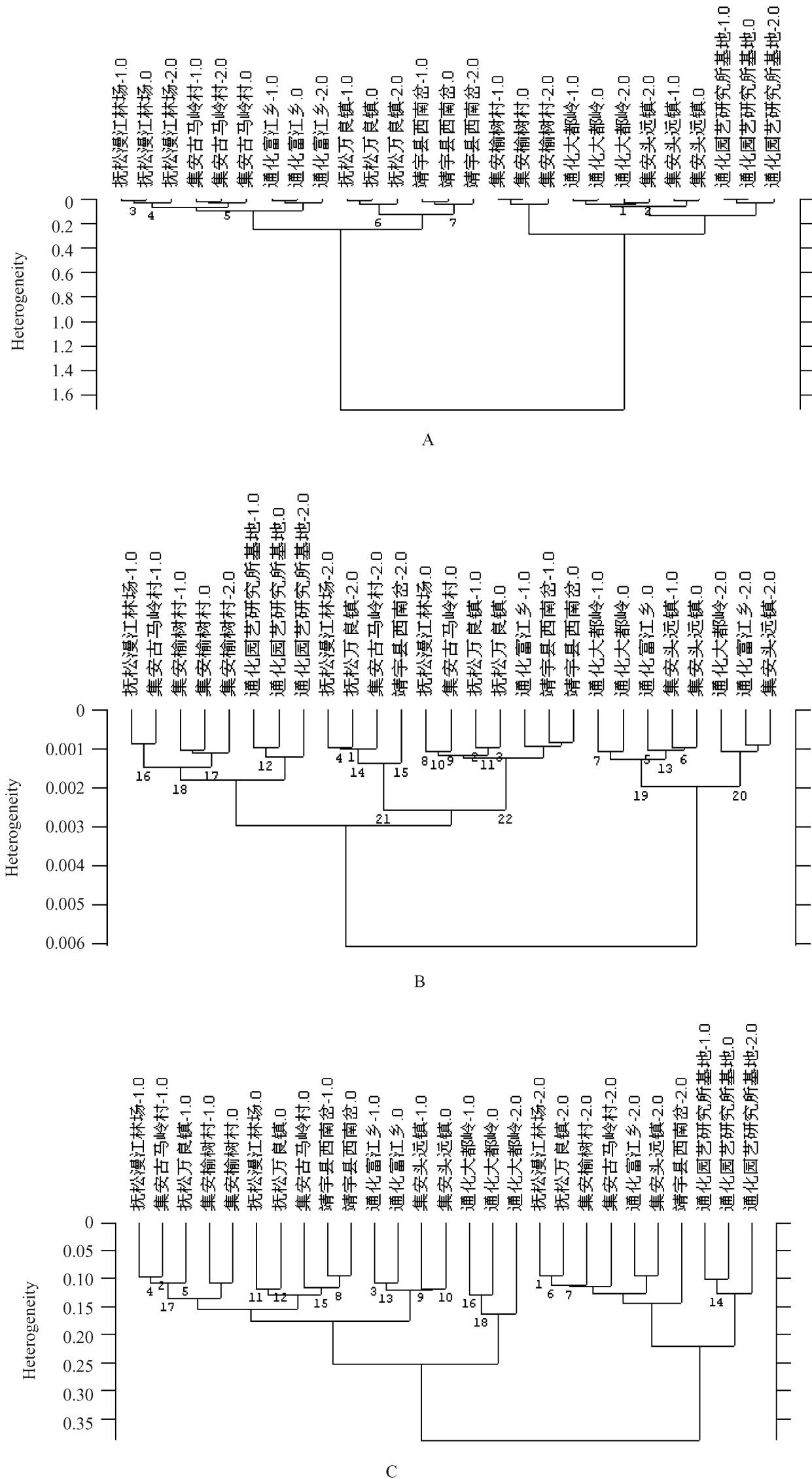


图 2 经过不同方法预处理后的聚类分析树状图(A) 矢量归一化, (B) 一阶导数, (C) 一阶导数加上矢量归一化

表 1 18 批朝鲜淫羊藿药材指纹图谱相对峰面积比值

No.	样品	峰面积
1	集安榆树村野生	39.42
2	集安头山镇野生	27.38
3	抚松万良镇野生	35.64
4	集安清河镇野生	30.63
5	通化园艺研究所基地栽培	28.49
6	柳河县凉水镇野生	31.72
7	通化龙头村基地栽培	25.47
8	通化三棵榆树镇野生	33.34
9	抚松漫江林场野生	35.83
10	靖宇县榆树乡野生	38.77
11	集安古马岭村野生	33.54
12	集安榆树镇野生	32.3
13	集安清河镇野生	38.59
14	通化大都岭野生	38.2
15	通化富江乡野生	36.71
16	通化合厂镇野生	35.26
17	靖宇县西南岔野生	37.88
18	靖宇县榆树川野生	36.55

偏差,并利于对样品的鉴别,更细致的反映不同样品的信息^[14],对谱图进行了一阶导数处理,其结果如图 4 所示。不难看出,来源于不同产地的淫羊藿样品的近红外光谱及其导数光谱十分相似,不易辨认。因此,必须采用化学计量的相关技术对其作深入的研究。

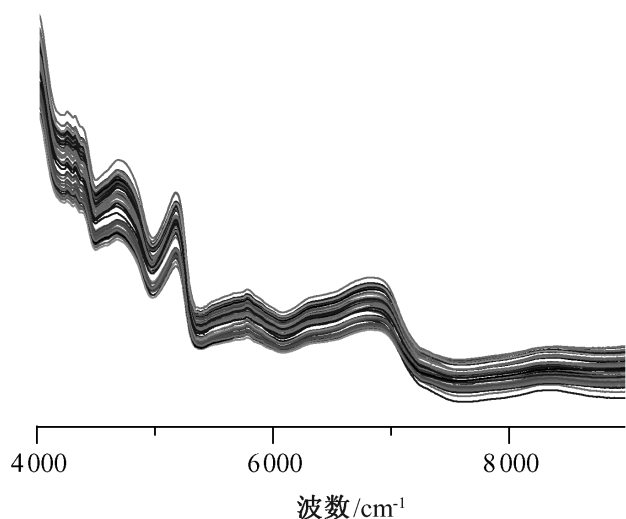


图 3 淫羊藿样品的近红外光谱图

2.2.3 光谱数据的预处理 为了从光谱测量数据中充分提取有效的信息,减少各种误差对校正模型的影响,需要对光谱信号进行预处理,本文通过求一阶导数、二阶导数、多元散射校正、矢量归一化和消除常数偏移量,减去一条直线以及不同波段的选取等方法处理,以消除基线漂移、样品不均、光散射及高频噪声等因素的影响。处理后的测量数据建立模型,根据 OPUS 6.0 分析软件得出的决定系数为 (R^2),交叉检验的均方根误差 (RMSECV),相对分析误差 (RPD) 等指标确定最优的实验模型。若 R^2

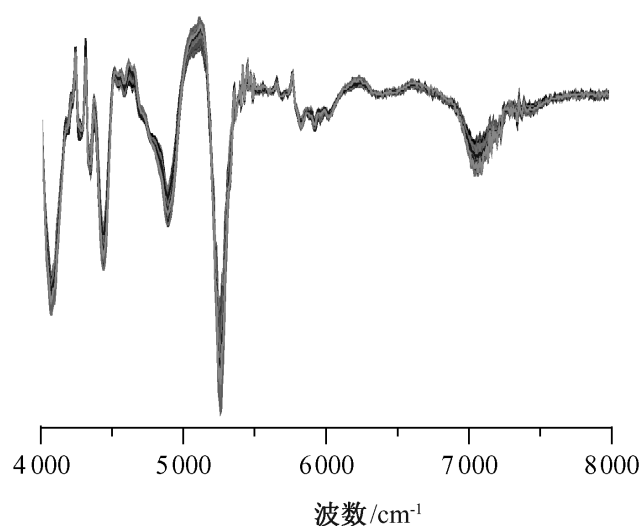


图 4 淫羊藿样品的一阶导数光谱图

越大、RMSECV、主成分维数 (Ranks) 越小,则模型的预测精度越高。模型初步建立好以后,再用 OPUS 6.0 的剔除光谱异常点来再次建立优化模型,直到得到满意的模型为止。预处理结果见表 2。

表 2 各种预处理方法

No.	预处理方法	波数范围 / cm^{-1}	RMSECV	维数
1	多元散射校正	7 502.1 - 4 597.7	0.018 2	10
2	矢量归一化	7 502.1 - 4 597.7	0.018 6	10
3	最大 - 最小归一化	7 502.1 - 4 597.7	0.018 8	10
4	一阶导数	7 502.1 - 4 246.7	0.020 4	10
5	消除常数偏移量	7 502.1 - 4 597.7	0.021 4	10
6	一阶导数 + 多元散射校正	7 502.1 - 4 246.7	0.021 8	10
7	一阶导数 + 矢量归一化	7 502.1 - 6 098.1		
		5 450.1 - 4 246.7	0.022 9	10
8	多元散射校正	7 502.1 - 4 246.7	0.023 4	10
9	矢量归一化	7 502.1 - 4 246.7	0.023 7	10
10	一阶导数 + 多元散射校正	7 502.1 - 4 597.7	0.024 2	10

2.2.4 利用偏最小二乘 (PLS) 方法建模 从表 2 可以看出,各种预处理方法经优化组合后,原始光谱经过多元散射校正后所建模型的 RMSECV 最小,因此,本文选取了波长范围为 $7502.1 \sim 4597.7 \text{ cm}^{-1}$ 的区间作为研究的主要范围,并采用多元散射校正对光谱进行了预处理。在波数 $7502.1 \sim 4597.7 \text{ cm}^{-1}$ 范围,随机选取了 42 个淫羊藿样品为校正集,利用多元散射校正方法处理后,建立了 PLS 定量校正模型,并利用 9 个预测淫羊藿样品对模型进行了检验,其结果如图 5 所示,预测决定系数 R^2 为 0.964, RMSECV 为 0.0182。图 5 显示了淫羊藿样品中淫羊藿苷的预测值和化学测定值之间的相关性。

由图 5 可以看出,该定量模型的结果令人满意。采用上述方法得到的最优模型来随机预测 9 个淫羊藿样品的淫羊藿苷的含量,所得结果见表 3。从图 5

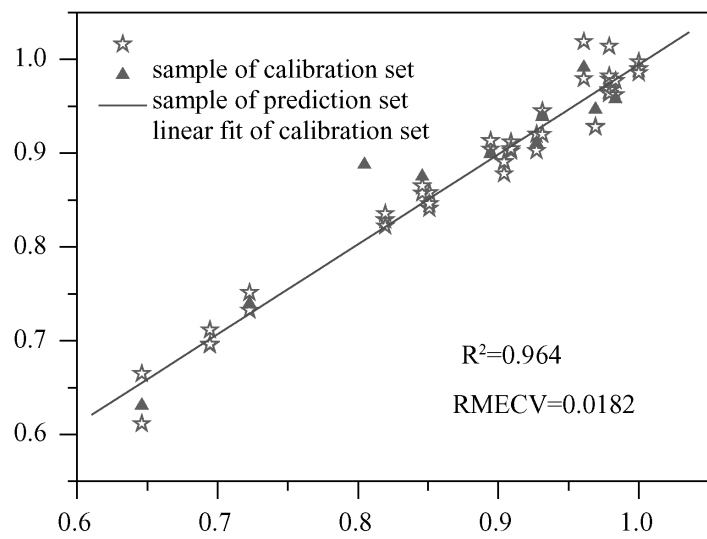


图 5 PLS 建模时淫羊藿样品的预测值和化学测定值之间的相关性
以及表 3 可以看出,采用 PLS 法所得到的预测集样本的标准偏差为 0.020 6,建立的模型预测的精度非常高,预测效果良好。

表 3 预测集中样品的化学测定值、预测值、相对误差

No.	真值	预测值	偏差	RSD/%
1	0.960 9	0.991 4	0.030 5	3.174 7
2	0.927 2	0.910 7	-0.016 5	-1.784 3
3	0.983 5	0.957 6	-0.026 0	-2.638 6
4	0.969 1	0.946 6	-0.022 5	-2.316 8
5	0.931 3	0.938 7	0.007 5	0.803 9
6	0.894 5	0.899 3	0.004 8	0.536 7
7	0.646 1	0.630 8	-0.015 3	-2.364 7
8	0.845 8	0.875 1	0.029 4	3.471 0
9	0.722 7	0.739 1	0.016 4	2.262 3

3 讨论

应用近红外光谱技术与化学计量学方法联用,不仅对淫羊藿样品进行了产地的定性鉴别,同时还实现了对其进行主成分的定量检测,大大简化了测试步骤,缩短了检测时间,节约了测试成本。为近红外技术应用用于淫羊藿的定性、定量检测提供了一个理论依据,同时也为近红外技术应用用于中药检测领域提供了一个新的途径。

[参考文献]

[1] Colic M, Doslov-Kokorus Z, Backovic A, et al. Evaluation of the stimulatory effect of *Epimedium alpinum* L. methanolic extract on the immune response in vivo[J]. Pharmazie, 2007, 62(9): 705.
[2] Anon. The effect of *Epimedium brevicornum* Maxim extract on clitoral intracavernous pressure in the rabbit [J]. European Urology Supplements, 2006, 5(2): 27.
[3] Chen K K, Chiu J H. Effect of *Epimedium brevicornum* maxim extract on elicitation of penile erection in the rat [J]. Urology, 2006, 67(3): 631.
[4] Zhang Ge, Qin Ling, Shi Yinyu. *Epimedium*-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on

preventing bone loss in late postmenopausal women: A 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2007, 22(7): 1072.
[5] Zhang Xiaoyu, Chen Fenghua, Wei Pinghui, et al. Studies on the effects of epimedium extract on erythrocytes[J]. Chinese Chemical Letters, 2006, 17(8): 1105.
[6] 陈肖家,张庆文,季晖,等.紫外分光光度法和高效液相色谱法测定淫羊藿总黄酮含量的比较研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 625.
[7] 朱升,欧海军,赵淑儿,等.高效液相色谱法测定不同产地淫羊藿中淫羊藿苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2080.
[8] Sinelli N, Spinardi A, Di Egidio V, et al. Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy[J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 50(1): 31.
[9] Moros J, Martinez-Sanchez M J, Perez-Sirvent C, et al. Testing of the region of murcia soils by near infrared diffuse reflectance spectroscopy and chemometrics[J]. Talanta, 2009, 78(2): 388.
[10] Michel K, Terhoeven-Urselmans T, Nitschke R, et al. Use of near-and mid-infrared spectroscopy to distinguish carbon and nitrogen originating from char and forest-floor material in soils[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde, 2009, 172(1): 63.
[11] Wu Yanwen, Sun Suqin, Zhou Qun, et al. Fourier transform mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid quality assessment of chinese medicine preparation honghua oil [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 46(3): 498.
[12] Li Yanzhou, Min Shungeng, Liu Xia. Applications of near-infrared spectroscopy to analysis of traditional chinese herbal medicine[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(7): 1549.
[13] Yan Shikai, Luo Guoan, Wang Yiming, et al. Study on real-time control of extraction procedure of *furitus gardenia* by near infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2006, 26(6): 1026.
[14] 罗一帆,郭振飞,朱振宇,等.近红外光谱测定茶叶中茶多酚和茶多糖的人工神经网络模型研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(8): 1230.

[责任编辑 顾雪竹]