**文章编号**:1001-6880(2016)3-0354-05

# 不同生长阶段枇杷叶总黄酮含量的二维分布检测

邹小波*,陈　武,徐艺伟,石吉勇,朱瑶迪,翟晓东

江苏大学食品与生物工程学院,镇江 212013

**摘　要**:利用高光谱图像技术研究了枇杷叶总黄酮含量在不同生长阶段(新叶、成熟叶、老叶)可视化分布。采集120片枇杷叶高光谱(431~962 nm)图像信息,利用分光光度计法测定枇杷叶片的总黄酮含量,并建立7种定量预测模型,其中最小二乘支持向量机(LS-SVM)模型最佳,校正集和预测集相关系数 $r$ 分别为0.8705和0.8996,最小均方根误差 *RMSE* 分别为1.92 mg/g和1.72 mg/g。逐一提取待测枇杷叶高光谱图像中每个像素点在不同波段的光谱信息,并将其带入最佳模型计算各个像素点处的黄酮含量,从而绘制总黄酮含量在整个枇杷叶上的二维分布图。研究表明,枇杷叶总黄酮含量随新叶、成熟叶、老叶而呈递增趋势,且黄酮含量高的区域集中在叶脉和靠近叶脉的叶肉区域,低的区域集中在叶片边缘和远离叶脉的叶肉区域。研究对枇杷叶的分类采集有一定的参考价值,为揭示化学活性成分在农产品中的分布规律提供了技术手段。

**关键词**:高光谱图像技术;枇杷叶;总黄酮;支持向量机;叶面分布

**中图分类号**:O657.3;R282.5　　**文献标识码**:A　　DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.3.006

# Content Distribution of Total Flavonoid in Loquat (*Eriobotrya japonica*) Leaves at Different Growth Stages

ZOU Xiao-bo*, CHEN Wu, XU Yi-wei, SHI Ji-yong, ZHU Yao-di, ZHAI Xiao-dong

*School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China*

**Abstract**: Hyperspectral imaging technology was used to detect total flavonoid content distribution map in loquat (*Eriobotrya japonica*) leaves at different growth stages (Young leaf, Mature leaf, Old leaf). Firstly, 120 loquat leaves were used to collect hyperspectral image data cube and determine total flavonoid concentrations. Secondly, the optimal model ($r$ = 0.8996, *RMSE* = 1.72 mg/g) for predication of total flavonoid was built using Least-Squares Support Vector Machine method. Finally, the calibration model was used to predict the total flavonoid content of each pixel in the hyperspectral image. Distribution maps of total flavonoid content in three leaves (Young leaf, Mature leaf, Old leaf) were calculated. Our results indicated that the level of total flavonoid for Young leaf, Mature leaf and Old leaf were in an increasing order. Higher level of total flavonoid can be noticed in the leaf mesophyll regions near the primary and secondary veins, while the lower levels occurred at the margin area of the leaves. This research provided a method to determine major constituent of food and agricultural products.

**Key words**: hyperspectral imaging technology; loquat leaf; total flavonoid content; support vector machine; distribution

枇杷(*Eriobotrya japonica*)为蔷薇科枇杷属植物,具有极高的医疗价值,现代药理学研究表明枇杷叶具有抗炎、止咳作用,临床常用于治疗急慢性呼吸道等疾病[1,2];近年研究还发现,枇杷叶有抗肿瘤、抗病毒、降血糖、护肝利胆、抗氧化、增强机体免疫功能等作用[3]。黄酮类化合物具有良好的抗氧化、降血脂、抗炎、增强免疫等作用[4]。近年来有关枇杷叶黄酮含量的报道多为黄酮的提取[5,6],黄酮含量的检测[7]等。但由于气候条件(气温、雨量、光照)和生长季节等的影响,枇杷叶的长势以及黄酮的富集会受到一定的影响,在枇杷叶的采集过程中,往往忽略了黄酮随生长阶段的变化而产生的变化,同时也大大降低了枇杷叶的利用率。因此,不同生长阶段(新叶、成熟叶、老叶)的枇杷叶黄酮含量的研究具有一定的意义。

收稿日期:2015-10-08　　接受日期:2015-12-16

基金项目:国家高新技术研究发展计划(863计划)(2011AA100807);全国优秀博士基金(200968);国家自然科学基金(61301239);新世纪优秀人才项目(NCET-11-00986);江苏省杰出青年基金(BK20130010);江苏省研究生创新基金(KYLX_1070)

*通讯作者 Tel:86-511-88780201;E-mail:zou_xiaobo@ujs.edu.cn

传统的化学检测方法[7-9]检测过程会破坏枇杷叶样本,而且前处理时间长、检测费用也较高。近红外以其快速、无损的优点而被用于天然产物的检测[10-12]。但近红外光谱法的光谱采集区域非常小,对应的检测只能反映光谱采集区域的黄酮含量,仅利用光谱信息难以实现枇杷叶黄酮含量分布水平的可视化。

高光谱具备多波段、高分辨率、图谱合一、包含多成分信息等特点,不仅包含每个像素点在各个波段下的光谱信息,还包含样本在各个波段下的图像信息。因此,高光谱图像技术既能对研究对象化学成分进行定量预测,还能对其外部特征进行可视化分析。目前已被应用于食品[13,14]、农业科学[15-17]、医药学[18,19]等领域。石吉勇等利用近红外高光谱技术对银杏叶总黄酮含量及其分布进行了预测[20],然而,该研究仅利用逐步线性回归法对高光谱图像和黄酮含量进行模型预测,难以充分表征高光谱信号与黄酮含量之间的对应关系。此外,银杏叶结构比较均匀,而枇杷叶生理结构较银杏叶更加复杂,依据现有的研究成果无法得知枇杷叶黄酮含量分布情况。

本研究利用高光谱图像技术获取新叶、成熟叶、老叶三个不同生长阶段的光谱信息和图像信息,并利用光谱信息与黄酮含量建立了偏最小二乘法(PLS)、区间偏最小二乘法(iPLS)、后向区间偏最小二乘法(BiPLS)、联合区间偏最小二乘法(SiPLS)、遗传偏最小二乘法(GA-PLS)、神经网络回归(BP-ANN)、最小二乘支持向量机(LS-SVM)预测模型等7种定量预测模型,充分挖掘了高光谱图像信号与枇杷叶中黄酮含量的对应关系,从中得到最佳模型,依次计算各像素点区域对应的黄酮含量,将黄酮含量取代像素点的图像信号,得到黄酮在不同生长阶段枇杷叶片上的分布规律,为合理利用枇杷叶资源提供了有益的借鉴。

# 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

试验用的新鲜枇杷叶采自江苏大学校园,为了使采集的样本具有代表性,分别采摘新叶40片、成熟叶40片、老叶40片,共120片。

## 1.2 仪器与试剂

SQP型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],101A-3型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司),FW177型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),UV-1601紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限责任公司),高光谱成像系统详见1.3。所用试剂均为分析纯。

## 1.3 高光谱图像采集

高光谱成像系统的硬件由光谱扫描仪(ImSpector,VI7E,Spectra Imaging Ltd.,芬兰),CMOS照相机(XEVA-FPA-1.7-320,XenIcsLtd.,比利时),CD照明装置(2900,Illumination Technologies Inc.,美国),传输装置(ZolixTS200AB,Zolix. Corp.,中国)及计算机构成;按照参考文献[20]报道方法采集枇杷叶高光谱图像,得到枇杷叶的高光谱三维数据块。枇杷叶片获取高光谱数据块后立即用1.4方法进行黄酮含量的测定。

## 1.4 黄酮含量的测定

### 1.4.1 标准曲线的绘制

精密称取芦丁对照品0.228 g用70%乙醇溶解并定容至1000 mL,配制成浓度为0.228 mg/mL的芦丁对照品溶液。精密吸取芦丁对照品溶液0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL,分别加入0.3 mL 5% $NaNO_2$溶液,摇匀,6 min后加入0.3 mL 10% $A1(NO_3)_3$溶液,摇匀,静置6 min,各加入4.0 mL 4% NaOH溶液,并用70%乙醇将反应溶液体积补足到10 mL,放置10~15 min,于510 nm处测定吸光值。以吸光值(x)和芦丁含量(y)绘制总黄酮含量标准曲线:$y=0.8535x+0.0149$,$R^2=0.9999$。

### 1.4.2 样品制备及测定

对枇杷叶片精确称重后,于60 ℃干燥箱下烘干至恒重。研碎后称取干燥枇杷叶粉0.5 g加入石油醚20 mL,浸泡30 min,超声脱脂20 min,残渣挥干至无石油醚。在残渣中加入70%乙醇10 mL,浸泡30 min,超声提取2次,每次20 min,提取液合并,定容至25 mL容量瓶,即得总黄酮提取液,再按标准曲线测定的方法,依次加入各试剂,测定510 nm处的吸光值,根据标准曲线计算样品中的总黄酮含量。

# 2 结果与讨论

## 2.1 枇杷叶黄酮含量测定结果

将120个样本分为校正集和预测集,为了避免子集选择的偏移,根据每个样本的黄酮含量值进行排序,按照校正集预测集2:1的比例、每3个样本中中间的样本分入预测集,因此校正集包含80个样本,预测集包含40个样本。如表1所示。

**表 1 枇杷叶黄酮含量检测结果统计表**

Table 1 Statistics of total flavonoids content measurement by the standard destructive method of fresh loquat leaves

| 样本 Samples | 数量 S. N. | 最大值 Maximum(mg/g) | 最小值 Minimum(mg/g) | 平均值 Mean(mg/g) | 标准差 S. D. (mg/g) |
|---|---|---|---|---|---|
| 新叶 Young Leaf | 40 | 24.02 | 11.71 | 18.56 | 3.37 |
| 成熟叶 Mature Leaf | 40 | 30.78 | 16.22 | 25.75 | 3.81 |
| 老叶 Old Leaf | 40 | 33.87 | 20.12 | 29.64 | 4.74 |
| 总数 Total | 120 | 33.87 | 11.71 | 24.54 | 5.82 |
| 校正集 Calibration Set | 80 | 33.87 | 11.71 | 24.48 | 5.90 |
| 预测集 Predication Set | 40 | 33.01 | 12.05 | 24.66 | 5.74 |

Note: S. N.: sample number; S. D.: standard deviation

从表 1 可以看出,老叶的黄酮含量均值最高,达到 29.64 mg/g,新叶最低,仅为 18.56 mg/g,黄酮含量随着新叶、成熟叶、老叶呈递增趋势。

## 2.2 高光谱图像预处理

选取每片叶子上 200 × 200 像素的矩形感兴趣区域(ROI, region of interest)作为研究对象,均选取叶片中部主叶脉两侧叶肉区域,如图 1a 所示;通过计算 ROI 的各个像素点的光谱响应平均值来估算枇杷叶片的相对反射率,120 个样品共获得 120 条平均反射光谱用于分析,如图 1b 所示;经过标准正交变换(SNV)处理后,光谱噪声减少许多,平滑度也有一定的提高,如图 1c 所示。

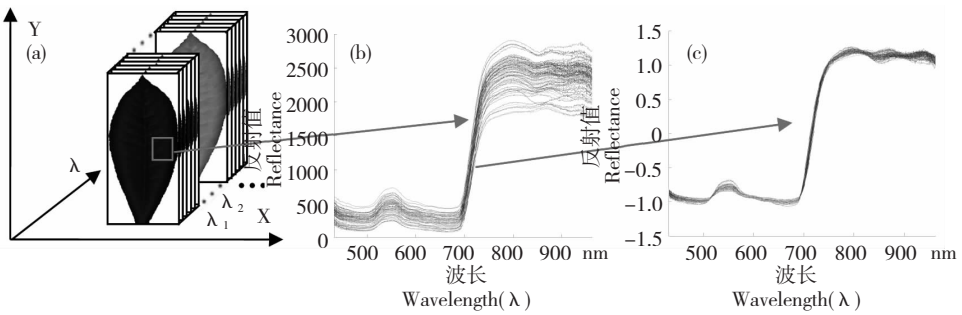


**图 1 枇杷叶光谱数据**

Fig. 1 Hyperspectral imaging data cube and spectra of samples

## 2.3 黄酮含量预测模型建立及分析

从图 1 可以看出,光谱在 850 ~ 962 nm 范围内存在较大噪声,为了避免信噪比过低,选取 431 ~ 850 nm 范围,共 489 个波长的光谱数据进行分析。表 2 为基于高光谱数据采用不同方法建立枇杷叶黄酮含量预测模型的结果对比。可以看出 LS-SVM 模型精度最高,LS-SVM 通过事先选择的核函数将输入的主成分变量映射到高维特征空间,并利用结构

**表 2 各定量模型结果比较**

Table 2 Comparison of each quantitative model

| Model | *RMSECV*(mg/g) | $r_c$ | *RMSEP*(mg/g) | $r_p$ |
|---|---|---|---|---|
| PLS | 2.48 | 0.7602 | 2.56 | 0.7666 |
| iPLS | 2.86 | 0.7301 | 3.81 | 0.6756 |
| BiPLS | 2.14 | 0.8181 | 2.27 | 0.7939 |
| SiPLS | 2.13 | 0.8201 | 2.18 | 0.8075 |
| GA-PLS | 2.01 | 0.8467 | 2.13 | 0.8204 |
| BP-ANN | 1.98 | 0.8533 | 2.81 | 0.7389 |
| LS-SVM | 1.92 | 0.8705 | 1.72 | 0.8996 |

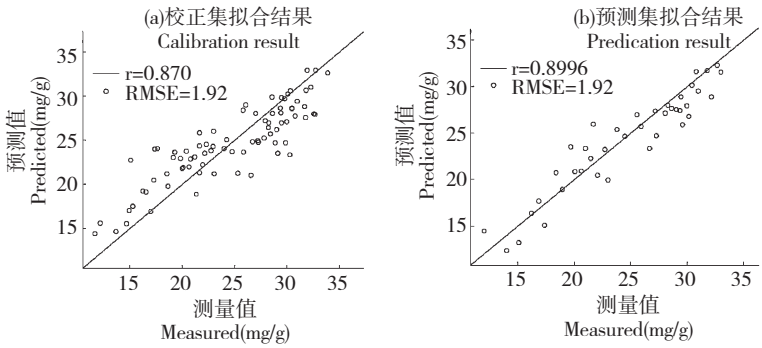


**图 2　LS-SVM 模型结果**

Fig. 2　Calibration and predication results from LS-SVM model

风险最小化原则在这个空间构造最优决策函数,最终所建输入变量同输出值之间的映射是基于最优决策下的,因此模型能达到较高的精度。当主成分数为 11 时,对应总黄酮含量的 LS-SVM 校正模型和预测模型的相关系数 $r$ 分别达到最高的 0.8705 和 0.8996,*RMSE* 分别达到 1.92 mg/g 和 1.72 mg/g。校正集和预测集散点图如图 2a b 所示。

### 2.4　黄酮含量分布检测

在 2.3 中,通过 LS-SVM 建立了高光谱与黄酮含量的最佳定量预测模型,即找到了图像信号与黄酮含量的对应关系。因此,可以按如下过程检测黄酮含量在整个叶片上的二维分布:(1)采集叶片的高光谱图像,标定后提取每个像素点对应的光谱信息;(2)将每条光谱信息代入 2.3 中的黄酮含量预测模型,计算出每个像素点对应的黄酮含量;(3)将每个像素点处的黄酮含量归一化并拉伸到[0,255]范围,得到叶片黄酮含量的灰度分布图;(4)将黄酮含量灰度分布图进行伪彩色处理,得到颜色鲜明、直观的伪彩色分布图像。

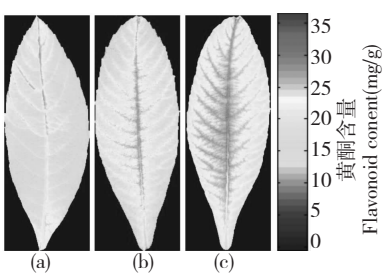


**图 3　枇杷新叶(a)、成熟叶(b)及老叶(c)的黄酮含量叶面分布图**

Fig. 3　Distribution maps of total flavonoids content in young (a), mature (b) and old (c) loquat leaves

根据上文的过程,分别计算了新枇杷叶,成熟枇杷叶,老枇杷叶黄酮含量的伪彩色分布图,结果如图 3 所示。图中,叶片区域不同的颜色及深浅代表对应位置的黄酮含量,右边的颜色标尺指明了颜色与黄酮含量的对应关系,从图中可以看出,(1)黄酮含量高的区域集中在叶脉和靠近叶脉的叶肉区域,黄酮含量低的区域集中在叶片边缘和远离叶脉的叶肉区域;(2)新叶的大部分区域黄酮含量在 15 ~ 25 mg/g 范围,成熟叶的大部分区域黄酮含量在 20 ~ 30 mg/g 范围,老叶的大部分区域黄酮含量在 25 ~ 35 mg/g 范围,与 2.1 中分别计算新叶、成熟叶、老叶中黄酮含量结果一致。(3)黄酮含量叶面显示结果非常直观,凭借肉眼可以直接观察黄酮含量在不同叶片不同区域的分布情况,较常规理化检测方法和近红外只能测出某个化学值,高光谱图像技术显示出其在二维分布方面独特的优势。

## 3　结论

研究采用芦丁标准曲线法测定了不同生长阶段枇杷叶中的总黄酮含量,提取枇杷叶感兴趣区域光谱信息同黄酮含量建立定量预测模型,当采用 LS-SVM 法建模时精度最佳,对应的校正集和预测集相关系数为 0.8705 和 0.8996,均方根误差为 1.92 mg/g 和 1.72 mg/g。并利用高光谱图像技术结合最佳模型计算了不同生长阶段枇杷叶片的黄酮含量分布图。研究表明,枇杷叶中黄酮含量随新叶、成熟叶、老叶呈递增趋势,且黄酮含量最高的区域在叶脉和靠近叶脉的叶肉区域、黄酮含量最低的区域在叶片边缘和远离叶脉的叶肉区域。研究结果为枇杷叶的采摘、分级、加工提供了一种更快、信息更全面的方法。

## 参考文献


1 Wang LW(王立为),Liu XM(刘新民),Yu SC(余世春),*et al*. Anti-inflammatory and antitussive effects of *Eriobotrya japonica*. *Chin Trandit Herb Drugs*(中草药),2004,2:60-62.

2 Huang Y,Li J,Cao Q,*et al*. Anti-oxidative effect of triterpene acids of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lind1. leaf in chronic bronchitis rats. *Life Sci*,2006,78:2749-2757.

3 Tang CY(唐纯翼),Wu XM(吴显明). Optimization of ultrasonic-microwave extraction of chlorogenic acid from *Eriobotrya japonica* leaves by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2014,26:444-449.

4 Huang AL(黄爱玲). Advances in research of pharmacological effects of flavonoid compounds. *Anhui Agric Sci Bull*(安徽农学通报),2007,10:71-72.

5 Wang YM(汪友明),Chen HW(陈宏伟),Tian C(田超),*et al*. Study on extraction method of loquat leaves flavonoids. *J Xuzhou Inst Tech*,*Nat Sci*(徐州工程学院学报,自科版),2014,2:36-38.

6 Wang L(王丽),Fei CF(费春芳). Study on extraction technology of flavonoids from loquat leaves by two kinds of aqueous two-phase systems. *Chem Bioeng*(化学与生物工程),2014,4:55-59.

7 Luo MH(罗美红),Lv H(吕寒),Li WL(李维林). Determination of flavonoids in *Eriobotrya japonica* by HPLC. *Lishizhen Med Mater Med Res*,2011,3:582-583.

8 Deng B(邓斌),Zhang AH(章爱华),Zhang XJ(张晓军). Research on technology for extracting flavonoid from loquat leaves. *Adv Fine Pet Chem*(精细石油化工进展),2010,6:53-55.

9 You JM(游见明),Lan JT(兰江涛). Study on the extractive technology of total flavones from loquat leaf. *Food Res Dev* (食品研究与开发),2006,3:37-38.

10 Gu ZR(顾志荣),Zhang YY(张亚亚),Ding JX(丁军霞),*et al*. Rapid determination of ferulic acid and linolic acid in *Angelica smensis* by near-ifrared diffuse reflectance spectroscopy. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2015,27:849-853.

11 Lei JW(雷敬卫),Fan MY(樊明月),Bai Y(白雁),*et al*. Determination of *Citrus aurantium* based on near-nfrared spectroscopy. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2015,27:1199-1204.

12 Zhang DW(张迪文),Bai Y(白雁),Xie CX(谢彩侠),*et al*. Rapid determination of specnuezhenide in Fructus Ligustri Lucidum by near infrared spectroscopy. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2015,27:1379-1384.

13 Shan JJ(单佳佳),Peng YK(彭彦昆),Wang W(王伟),*et al*. Smiultaneous detection of external and internal quality parameters of apples using hyperspectral technology. *Trans Chin Soc Agric Mach*(农业机械学报),2011,3:140-144.

14 Guo EY(郭恩有),Liu MH(刘木华),Zhao JW(赵杰文),*et al*. Nondestructive detection of sugar content on navel orange with hyperspectral imaging. *Trans Chin Soc Agric Mach* (农业机械学报),2008,5:91-93.

15 Monteiro ST,Minekawa Y,Kosugi Y,*et al*. Prediction of sweetness and amino acid content in soybean crops from hyperspectral imagery. *Isprs J Photogram Remote Sens*,2007,62:2-12.

16 Peng YK(彭彦昆),Zhang LL(张雷蕾). Advancement and trend of hyperspectral imaging technique for nondestructive detection of agro-product quality and safety. *Trans Chin Soc Agric Mach*(农业机械学报),2013,4:137-145.

17 Xie J(谢静),Chen S(陈适),Wang JK(王珺珂),*et al*. Research on SPAD value prediction and distribution of the rice leaf based on hyperspectral imagine technique. *J Huazhong Norm Univ*,*Nat Sci*(华中师范大学学报,自科版),2014,2:269-273.

18 Lyon RC,Lester DS,Lewis EN,*et al*. Near-infrared spectral imaging for quality assurance of pharmaceutical products:Analysis of tablets to assess powder blend homogeneity. *AAPS Pharm Sci Tech*,2002,3(3):1-15.

19 Li JX(李家星),Wu HJ(吴红杰),Li G(李刚),*et al*. Application of hyperspectral imaging technology to objective diagnosis of TCM syndrome. *Spectrosc Spect Anal*(光谱学与光谱分析),2010,11:3072-3075.

20 Shi JY(石吉勇),Zou XB(邹小波),Zhang DT(张德涛),*et al*. Determination of total flavonoid content distribution on different color *Ginkgo biloba* leaves. *Trans Chin Soc Agric Mach*(农业机械学报),2014,11:242-245.