

文章编号:1001-6880(2016)11-1712-06

基于 FTIR 的黄芪药材产地鉴别及预测研究

李 芳¹, 李 钦², 顾志荣³, 吴国泰¹, 胡继宏^{1*}¹甘肃中医药大学; ²甘肃省中医院; ³甘肃省人民医院, 兰州 730000

摘要:采集 12 个主产县 90 批黄芪药材的 FTIR 指纹图谱, 分析各产地药材的光谱特征, 采用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)及反向传播人工神经网络(BP-ANN)建立其产地的快速鉴别及预测模型。结果表明, 不同产地黄芪药材 FTIR 指纹图谱及平均光谱均具有一定差异; 所建 OPLS-DA 模型能够对不同产地黄芪药材进行较为明确的分类鉴别; 不同产地黄芪药材的 FTIR 光谱差异主要分布在 3400 ~ 2920、1650 ~ 1420、1370 ~ 1050、930 ~ 770 cm⁻¹ 及 590 ~ 520 cm⁻¹ 波数范围; 所建 BP-ANN 模型对测试集黄芪药材产地的预测准确率大于 83%。因此, 基于 FTIR 指纹图谱的 OPLS-DA 模型及 BP-ANN 模型能够用于黄芪药材的产地鉴别及预测。

关键词:黄芪;傅里叶变换红外光谱;指纹图谱;正交偏最小二乘-判别分析;反向传播-人工神经网络

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.005

Origin Identification and Prediction of Astragali Radix Based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy

LI Fang¹, LI Qin², GU Zhi-rong³, WU Guo-tai¹, HU Ji-hong^{1*}¹Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; ²Traditional Chinese MedicineSchool of Gansu Province, Lanzhou 730000, China; ³Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China

Abstract: In this study, collecting the fingerprints of 90 batches of Astragali Radix from 12 counties, investigating the spectral characteristics of Astragali Radix from different origins, and establishing model of OPLS-DA (orthogonal partial least squares-discriminant analysis) and BP-ANN (back-propagation neural network) to realize the rapid identification and prediction of origin. The results showed that the FTIR fingerprints and its average spectrums of Astragali Radix from different origins showed some differences; the established OPLS-DA model can be used to accurately classify Astragali Radix from different origins; the differences of FTIR fingerprints of Astragali Radix from different origins were mainly existing in the wave number ranges of 3400 ~ 2920, 1650 ~ 1420, 1370 ~ 1050, 930 ~ 770 cm⁻¹, and 590 ~ 520 cm⁻¹; the prediction accuracy of testing set was higher than 83% based on BP-ANN model. Hence the established OPLS-DA and BP-ANN model based on FTIR fingerprints can be used to identify and predict the origin of Astragali Radix.

Key words: Astragali Radix; fourier transform infrared spectroscopy; fingerprint; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; back-propagation neural network

黄芪为豆科黄芪属蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fish) Bge. Var. *Monghoicus* (Bge) Hisao] 或膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fish) Bge.] 的干燥根, 是药食两用的名贵中药, 具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、托毒排脓、行滞通痹及敛疮生肌之功效^[1]。黄芪的主要化学成分包括黄芪多糖(APS)、皂苷、生物碱、黄酮以及多种矿质元素^[2], 具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、降血压、降

血糖和肝肾保护等药理作用^[3]。据报道, 黄芪主产于内蒙古、甘肃、宁夏、陕西、山西及黑龙江等地, 多为 2 年生育苗移栽品, 极少数为多年生野生或仿野生品^[4], 本文采集了这 6 个省共 12 个主产县的 90 批黄芪药材进行建模, 能够较为完整地反映黄芪的产地分布, 代表性较强。

中药品质及道地性形成是生态因子与人文环境综合作用的结果, 而产地的生态环境起主导作用; 不同的产地, 其海拔、土壤、光照、降雨及栽培方式等环境因子截然不同^[5]。近年来, 学术界利用各种色谱及光谱技术对黄芪药材的道地性形成及成分差异进行了研究^[6,7], 证实了不同产地的黄芪药材的质量

收稿日期:2016-04-5 接受日期:2016-08-31

基金项目:国家自然科学基金(81260597); 甘肃省中医药管理局
科研项目(GZK-2015-45)

*通讯作者 Tel:86-013519311935; E-mail:hujihonghappy@163.com

及临床疗效均具有较大差异,这些研究对于黄芪药材的综合质量评价及规范化种植具有一定指导作用。FTIR 技术以其整体、无损及快速等优点,在中药复杂体系鉴定及质量评价中应用广泛。本研究首先分析不同产地黄芪药材的 FTIR 光谱特征,揭示其光谱差异,在此基础上建立其产地的快速鉴别及预测模型。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

90 批黄芪药材,采集于内蒙古、甘肃、宁夏、陕

表 1 黄芪药材样品信息表
Table 1 Sample information of Astragali Radix

产地 Producing orgins	批次 Batch	编号 Number	产地 Producing orgins	批次 Batch	编号 Number
内蒙古固阳县(GY)	7	1~7	宁夏隆德县(LD)	7	46~52
内蒙古达茂旗(DM)	8	8~15	宁夏彭阳县(PY)	8	53~60
甘肃陇西县(LX)	9	16~24	陕西绥德县(SD)	8	61~68
甘肃岷县(MX)	6	25~30	陕西柞水县(ZS)	7	69~75
山西浑源县(HY)	8	31~38	黑龙江伊春区(YC)	9	76~84
山西天镇县(TZ)	7	39~45	黑龙江密山县(MS)	6	85~90

精确称取 3 mg,与 250 mg KBr 碎晶一起加入玛瑙研钵中研磨均匀,以压片机压成薄片,以透射方式采集 FTIR 光谱数据。扫描范围 4000~400 cm⁻¹,光谱分辨率 4 cm⁻¹,扫描次数 16,扫描时扣除 H₂O 和 CO₂ 干扰。控温范围 50~120 °C,每 10 °C 扫描一次,升温速率 2 °C/min。平行测量 3 次,取平均光谱。

1.2.2 光谱预处理及分析

所得一维 FTIR 采用 OMNIC 8.2 光谱处理软件对光谱数据进行 13 点平滑滤波,基线校正,Noise 去

噪,以及 MSC(多元散射校正)预处理^[8]。FTIR 指纹图谱相似度、OPLS-DA 及 BP-ANN 模型建立均采用 Matlab 6.5 软件执行。

1.2 实验方法

1.2.1 光谱采集方法

样品粉末(过 100 目筛)于 60 °C 干燥至恒重,

以及 MSC(多元散射校正)预处理^[8]。FTIR 指纹图谱相似度、OPLS-DA 及 BP-ANN 模型建立均采用 Matlab 6.5 软件执行。

2 结果与分析

2.1 黄芪药材 FTIR 指纹图谱及光谱特征

预处理后的 12 个主产县 90 批黄芪药材的 FTIR 指纹图谱见图 1。整体分析,不同产地黄芪药材的 FTIR 指纹图谱走势及主要吸收峰位均基本一

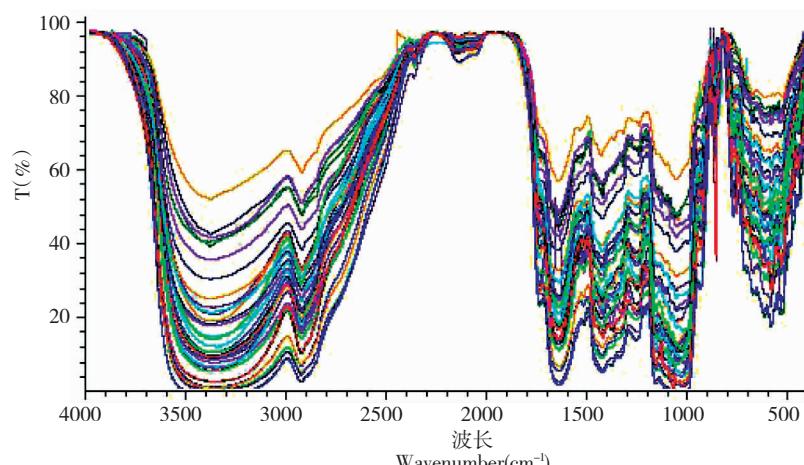


图 1 12 个主产县 90 批黄芪药材的 FTIR 指纹图谱

Fig. 1 FTIR fingerprints of 90 batches of Astragali Radix from 12 producing orgins

表 2 90 批黄芪药材 FTIR 指纹图谱相似度分析

Table 2 Similarity analysis of FTIR fingerprints of 90 batches of Astragali Radix

编号 Number	相似度 Similarity										
1	0.9802	16	0.9932	31	0.9795	46	0.9721	61	0.9884	76	0.9897
2	0.9811	17	0.9941	32	0.9802	47	0.9712	62	0.9874	77	0.9984
3	0.9819	18	0.9949	33	0.9649	48	0.9857	63	0.9859	78	0.9996
4	0.9793	19	0.9871	34	0.9816	49	0.9771	64	0.9618	79	0.9971
5	0.9837	20	0.9880	35	0.9838	50	0.9839	65	0.9865	80	0.9946
6	0.9845	21	0.9860	36	0.9747	51	0.9897	66	0.9868	81	0.9921
7	0.9539	22	0.9897	37	0.9655	52	0.9897	67	0.9871	82	0.9896
8	0.9863	23	0.9949	38	0.9563	53	0.9927	68	0.9874	83	0.9576
9	0.9871	24	0.9871	39	0.9558	54	0.9946	69	0.9877	84	0.9880
10	0.9880	25	0.9885	40	0.9506	55	0.9921	70	0.9879	85	0.9712
11	0.9889	26	0.9880	41	0.8143	56	0.9896	71	0.8924	86	0.9657
12	0.6758	27	0.9522	42	0.9851	57	0.9885	72	0.9754	87	0.9771
13	0.9906	28	0.9857	43	0.6856	58	0.9880	73	0.9888	88	0.9746
14	0.9915	29	0.9781	44	0.9662	59	0.9712	74	0.9891	89	0.9721
15	0.9923	30	0.9760	45	0.9692	60	0.9857	75	0.9894	90	0.9696

致,仅从一阶 FTIR 光谱难以进行产地鉴别。以 90 批黄芪药材的 FTIR 平均光谱作为对照,采用“相关系数法”求取各样品 FTIR 图谱的相似度^[9],结果见表 2。可知,除 4 批样品相似度小于 0.90 外,其余黄芪药材的 FTIR 相似度均大于 0.95,表明不同产地黄芪药材的成分组成及含量较为相似。

本研究对 86 批(除去 4 批相似度小于 0.90 者)黄芪药材的 FTIR 图谱求取平均光谱,并求取平均光谱的一阶导数光谱,然后对其特征吸收进行初步归属。为了便于比较,将 2 种平均光谱绘制在一张坐标上,见图 2。结合黄芪药材的主要成分皂苷、多

糖、黄酮及氨基酸等结构特点,对黄芪药材 FTIR 光谱共有峰的特征吸收归属如下:3396 cm⁻¹为羟基伸缩振动吸收峰,表现为宽强羟基峰;2925 cm⁻¹为甲基伸缩振动吸收峰,表现为尖锐的中等强度甲基峰;1647 cm⁻¹为 C=O 及 C=C 双键吸收峰;1426 cm⁻¹及 1247 cm⁻¹为氨基酸的氨基及酸根吸收峰;1058 cm⁻¹为 C-O 单键的伸缩振动吸收峰;867 cm⁻¹为糖的小峰;528 cm⁻¹为羟基的面外弯曲振动吸收峰^[6,10]。

2.2 不同产地黄芪药材的 FTIR 光谱差异分析

为了比较 12 个不同主产县所产黄芪药材的 FTIR 光谱差异,本研究求取了各产地黄芪药材的 FTIR 平均光谱进行比较,如图 3。可知,除共有峰外,不同产地黄芪药材的 FTIR 光谱具有一定差异性。其中,黑龙江伊春区、山西天镇县、陕西绥德县及柞水县、宁夏隆德县以及内蒙古达茂旗所产黄芪药材在 1515 cm⁻¹附近出现 C=O 及 C=C 双键的吸收峰(峰 a),且内蒙古达茂旗所产黄芪该峰吸收较强。黑龙江伊春区、山西天镇县、陕西绥德县、内蒙古达茂旗及甘肃岷县所产黄芪药材在 1370 cm⁻¹附近出现氨基吸收峰(峰 b),且甘肃岷县所产黄芪该峰吸收较强。黑龙江伊春区及宁夏隆德县所产黄芪在 1319 cm⁻¹附近出现 C-N 键弯曲振动吸收峰(峰 c)。陕西绥德县及内蒙古固阳县所产黄芪在 1157 cm⁻¹附近出现 C-N 及 C-O 键伸缩振动吸收峰(峰 d)。

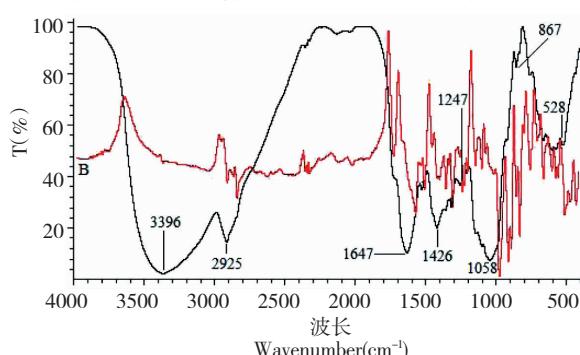


图 2 黄芪药材 FTIR 指纹图谱(A)及一阶导数光谱(B)的平均光谱

Fig. 2 The average spectra of FTIR fingerprints (A) and first derivative spectrum (B) of Astragali Radix

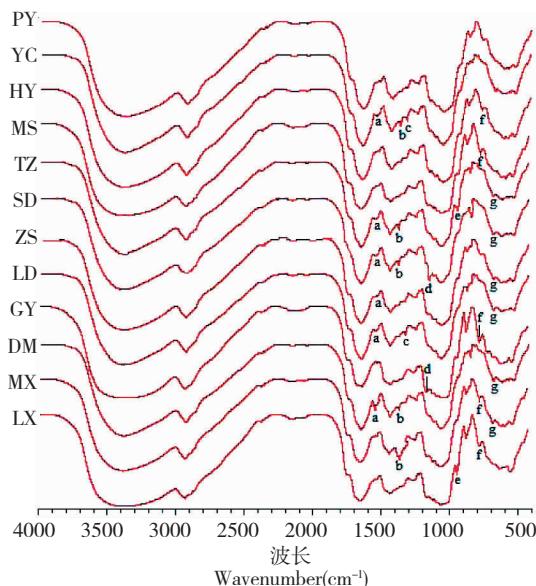


图 3 12 个主产县黄芪药材的 FTIR 平均光谱比较

Fig. 3 The comparison of average spectrum of Astragali Radix from 12 producing orgins

d)。山西天镇县及甘肃陇西县所产黄芪在 931 cm^{-1} 附近出现 C-N 键面外弯曲振动吸收峰(峰 e)。山西浑源县、黑龙江密山县、内蒙古固阳县、甘肃岷县及陇西县所产黄芪在 772 cm^{-1} 附近出现 N-H 及 C-H 键面外弯曲振动吸收峰(峰 f)。山西天镇县、陕西绥德县及柞水县、宁夏隆德县、内蒙古达茂旗及甘肃岷县所产黄芪在 589 cm^{-1} 附近出现 C-H 键面外弯曲振动吸收峰(峰 g)。其中,山西浑源县及黑龙江密山县所产黄芪均出现峰 f,此外无其他差异峰,说明这两个产地所产的黄芪药材较为相似;内蒙古达茂旗、

陕西绥德县及山西天镇县均有峰 a、峰 b 及峰 g,说明这 3 个产地所产的黄芪药材较为相似;这也说明这些产地所产的黄芪药材与其他产地差异较大。

2.3 不同产地黄芪药材的正交-偏最小二乘判别分析

为了对不同产地黄芪药材进行分类鉴别,本文基于经过预处理的黄芪药材 FTIR 指纹图谱数据建立正交-偏最小二乘-判别模型(OPLS-DA)。将以 OMNIC 8.2 光谱处理软件预处理后的光谱数据以 ASCII 的格式(*.csv)输出,然后导入 Matlab 6.5 软件,得到由波数(cm^{-1})与相应透光率(%)组成的矩阵,采用修正 80% 的原则来剔除缺失值,得到建模的数据矩阵。采用 Matlab 6.5 软件运用正交-偏最小二乘投影脚本建立 OPLS-DA 模型,模型参数 R^2Y 表示模型的拟合程度, Q^2 表示模型的可预测程度,当 $Q^2 > 0.4$ 时认为预测结果可接受, $Q^2 > 0.9$ 时预测结果更可靠^[11,12]。本文所建模型的 R^2Y 和 Q^2 分别为 0.9203 和 0.8465,说明该模型较为可靠。OPLS-DA 投影图及载荷图分别见图 4 及图 5。

从投影图可以看出,除少数黄芪样本离群外,可根据 FTIR 指纹图谱对 12 个不同主产县所产黄芪药材进行明显的分类鉴别。I 类主要是甘肃岷县所产黄芪,II 类主要是甘肃陇西县所产黄芪,这两个产地所产黄芪在更大的投影空间内可同被归为 A 类,说明这两个产地所产黄芪药材的 FTIR 光谱相似性较强。黑龙江的伊春区及密山县所产黄芪在投影空间内未能被明显分开,但两者在更大的投影空间内一同被归为 III 类,说明两个产地所产黄芪药材较为相似。IV 类主要是陕西绥德县所产黄芪,V 类主要是

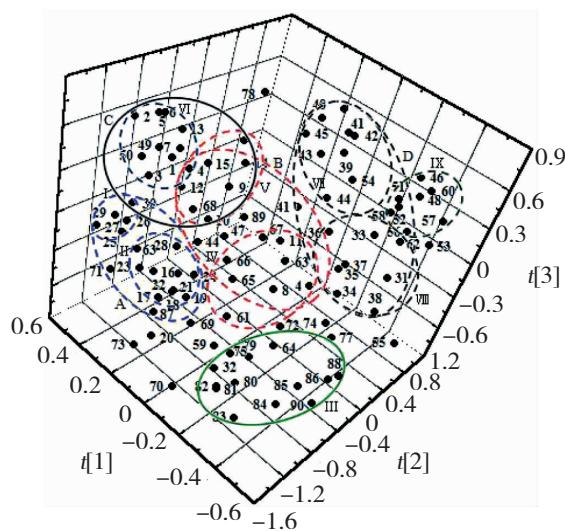


图 4 不同产地黄芪 OPLS-DA 三维模式投影图

Fig. 4 Three-dimensional mode projection of OPLS-DA of Astragali Radix from different producing orgins

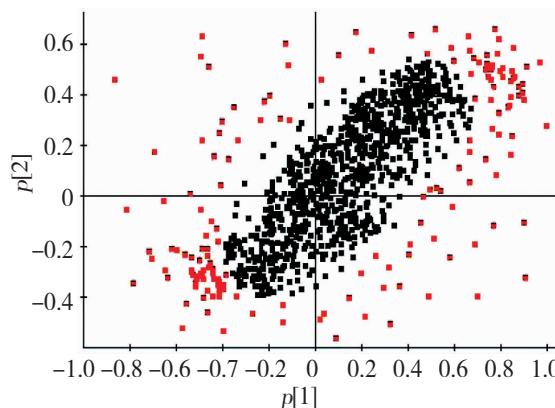


图 5 不同产地黄芪 OPLS-DA 二维载荷图

Fig. 5 Two-dimensional loading plots of OPLS-DA of Astragalus Radix from different producing origins

内蒙古达茂旗所产黄芪,两者在更大的投影空间内可同被归为 B 类,说明两个产地所产黄芪药材的 FTIR 光谱较为相似。VI 类主要是内蒙古固阳县所产黄芪,其与 V 类(内蒙古达茂旗所产黄芪)在更大的投影空间内可同被归为 C 类,说明这两个主产县所产黄芪药材较为相似。VII 类主要是山西天镇县所产黄芪,VIII 主要是山西浑源县所产黄芪,两者在更大的投影空间内可同被归为 D 类,说明这两个主产县所产黄芪药材较为相似。宁夏隆德县及彭阳县所产黄芪在投影空间内未能被明显分开,但在更大的投影空间内可一同被归为 IX 类,说明两个产地所产黄芪药材较为相似。综上可知,不同主产县所产黄芪药材的 FTIR 指纹图谱具有较明显的差异,也说明不同主产县所产黄芪药材的化学成分具有明显差异,据此可通过建立 OPLS-DA 模型对其进行较为明确的分类鉴别。

OPLS-DA 的载荷图表明了模型变量(光谱波数)对样本分类鉴别的贡献大小,距离原点越远对分类鉴别的贡献越大^[13]。本研究载荷图中,距原点较远的光谱变量其波数范围主要分布在 3400 ~ 2920、1650 ~ 1420、1370 ~ 1050、930 ~ 770 cm⁻¹ 以及 590 ~ 520 cm⁻¹。这些波数是对不同产地黄芪药材进行分类鉴别的差异所在,这也与不同产地黄芪药材的 FTIR 光谱差异分析的结论较为一致。

2.4 基于反向传播-人工神经网络模型的黄芪药材产地预测

本研究采用 Matlab 6.5 软件中的 Neural Network 包中的“newcf 函数”创建含 1 个隐层的 3 层结构 BP-ANN 模型进行黄芪药材的产地预测^[14]。首先根据已建立的 OPLS-DA 模型中各变量(波数)的影响权重(VIP)筛选特征变量,以非参数检验选取

VIP > 1 的波数,最后得到 122 个特征变量(波数)。经组合优选,设定 Sigmoid 函数为该模型的神经元激活函数,最小训练速率设为 0.1,动态参数设为 0.6,隐含层节点数设为 6,Sigmoid 参数设为 0.9,允许误差为 10⁴,最大训练迭代次数为 5000,模型进行训练前对光谱数据进行标准化变换。

本研究将 12 个产地 86 批黄芪药材(除去 4 批相似度小于 0.90 者)随机分为训练集与测试集 2 部分,其中训练集 60 批(占 70%),测试集 26 批(占 30%),所建 BP-ANN 模型的预测结果见表 3。可知,所建 BP-ANN 模型的训练集与测试集的平均整体相对误差均小于 4%,预测准确率均大于 74%,测试集的预测准确率大于 83%,说明该模型的预测准确率尚好,可结合其他鉴别方法用于不同产地黄芪药材的产地预测。

3 结论

本文在 13 点平滑滤波、基线校正及 Noise 去噪的基础上,以 OPLS-DA 模型的 R^2Y 和 Q^2 为评价指标,分别考察了采用 MSC、SNV(标准正态变量校正)及 OSC(正交信号校正)等 3 种方法对黄芪药材 FTIR 光谱进行预处理,结果表明采用 13 点平滑滤波、基线校正、Noise 去噪及 MSC 相结合的预处理效果最佳。本文所建 OPLS-DA 模型能够较为准确地对不同产地黄芪药材进行分类鉴别。与传统的 PCA(主成分分析)及 PLS-DA(偏最小二乘判别分析)模型相比,OPLS-DA 模型将正交信号校正(OSC)与偏最小二乘法(PLS)相结合,滤除了光谱变量矩阵中与判别结果无关的信息即随机噪声,因此能更好地区分组间差异,提高模型的有效性和分类效能。

表 3 所建 BP-ANN 模型的预测结果

Table 3 Prediction result of BP-ANN model

样本集 Sample set	样本量 Sample size	平方和误差 Error of sum square (%)	平均整体相对误差 Average relative error (%)	预测准确率 Prediction accuracy (%)
训练集 Train set	60	3.458	3.697	74.462
测试集 Test set	26	2.548	3.132	83.658

黄芪主要产地横跨我国西北、华北及东北广大区域。本研究结果发现,地理位置相近的产地所产黄芪药材的 FTIR 光谱相似,药材质量相近,如内蒙古固阳县与达茂旗所产黄芪,甘肃岷县与陇西县所产黄芪,黑龙江伊春区与密山县所产黄芪,宁夏隆德县与彭阳县所产黄芪等。本研究结果证实了以药材质量结合产地区域来划分中药道地性的科学性。本研究也显示,内蒙古达茂旗与陕西绥德所产黄芪也较为相似,但这两个产地在地域上并不接近。这说明,除了产地因素外,黄芪药材质量可能还与种质资源、遗传因素以及栽培方式等其他因素有关。

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, 302-303.
- 2 Chen HG, Zhou X, Zhang JZ. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*. *Carbohydr Polym*, 2014, 111:567-575.
- 3 Lim JD, Yu CY, Kim SH, et al. Structural characterization of an intestinal immune system-modulating arabino-3, 6-galactan-like polysaccharide from the above-ground part of *Astragalus membranaceus* (Bunge). *Carbohydr Polym*, 2016, 136: 1265-1272.
- 4 Wang XM(王雪梅), Jia TT(贾天玉), Guan B(管彬), et al. Effects of *Astragalus* polysaccharide on CD4⁺CD25⁺Treg Cells and Th17 cells in immunesuppressed mice. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27:153-157.
- 5 Huang LQ(黄璐琦), Guo LP(郭兰萍). Chinese Medicinal Materials Resource Ecology(中药资源生态学). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2009. 177-227.
- 6 Huang DL(黄冬兰), Chen XK(陈小康), Xu YQ(徐永群). Identification of *Radix Astragali* from different regions using FTIR and two-dimensional correlation infrared spectroscopy. *J Anal Sci*, 2015, 31:379-383.
- 7 Rui W, Chen HY, Feng YF, et al. Classification of *Astragalus Membranaceus* (Fisch.) Bge. Var. *Mongolicus* (Bge.) Hsiao from different areas based on chemometric methods with R software. *Proc Eng*, 2012, 29:2172-2176.
- 8 Bruno GB, Nádia R, Leandro SO, et al. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Food Chem*, 2015, 181(15):31-37.
- 9 Wang YQ(王元清), Han B(韩彬), Xiang R(向荣), et al. Evaluation of consistency and difference of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* pieces using total statistical moment method combined with cluster analysis and principal component analysis. *Chin Tra Herb Drug*, 2015, 46:2863-2869.
- 10 Chen RZ, Tan L, Jin CG, et al. Extraction, isolation, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*. *Ind Crop Prod*, 2015, 77:434-443.
- 11 Miao YJ, Shi YY, Li FQ, et al. Metabolomics study on the toxicity of *Annona squamosa* by ultra performance liquid-chromatography high-definition mass spectrometry coupled with pattern recognition approach and metabolic pathways analysis. *J Ethnopharmacol*, 2016, 184:187-195.
- 12 Mao Q, Bai M, Xu JD, et al. Discrimination of leaves of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius* by ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics. *J Pharm Biom Anal*, 2014, 97: 129-140.
- 13 Du LN, Xie T, Xu JY, et al. A metabolomics approach to studying the effects of Jinxin oral liquid on RSV-infected mice using UPLC/LTQ-Orbitrap mass spectrometry. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174:25-36.
- 14 Cai CB, Yang HW, Wang B, et al. Using near-infrared process analysis to study gas-solid adsorption process as well as its data treatment based on artificial neural network and partial least squares. *Vib Spectrosc*, 2011, 56:202-209.
- 15 Samer Y, Moghavvemi M, Haider AFM, et al. Artificial neural networks aided solution to the problem of geometrically bounded singularities and joint limits prevention of a three dimensional planar redundant manipulator. *Neurocomputing*, 2014, 137(5):34-46.