

文章编号:1001-6880(2018)7-1219-07

近红外光谱技术鉴别白及粉及其混伪品

鄢玉芬,李峰庆,刘珈羽,郭换,陈鸿平*,刘友平*

成都中医药大学药学院 中药材质量标准化教育部重点实验室 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地,成都 611137

摘要:本研究通过近红外光谱仪采集白及不同品种及混伪粉样品的近红外光谱图后,采用聚类分析方法分别建立白及品种及其混伪品的定性鉴别模型,并进行模型的外部验证和内部验证。最终在波段范围为4 400~4 800、5 400~6 600、7 800~10 000 cm⁻¹白及与其同属植物黄花白及、小白及能够分别聚为一类,内部验证准确率达到100%,外部验证准确率达到90%;在波段5 000~10 000 cm⁻¹范围内白及其伪粉也能够分别聚为一类,光谱属性残差都为0,内部验证和外部验证的准确度均为100%。该技术为快速鉴别白及同属药材的鉴别及混伪粉提供了依据。

关键词:白及粉;近红外光谱技术;定性鉴别;聚类分析**中图分类号:**0657.33**文献标识码:**A**DOI:**10.16333/j.1001-6880.2018.7.021

Identification Bletillae Rhizoma and Mixed Pseudo-Powder Samples Based on Near-Infrared Spectroscopy

YAN Yu-fen, LI Feng-qing, LIU Jia-yu, GUO Huan, CHEN Hong-ping*, LIU You-ping*

Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Breeding Base of State

Key Laboratory of Resources System Research and Development Utilization of Chinese Herbal Medicines
Co-construction by Ministry of Science and Technology and Sichuan Province, Chengdu 611137, China

Abstract: In this study, near-infrared spectroscopy was used to collect the near-infrared spectra of different varieties Bletillae Rhizoma and mixed pseudo-powder samples. Then, the qualitative analysis models of Bletillae Rhizoma and mixed pseudo-powder samples were established by cluster analysis. Moreover, external and internal validation of the model were also experimented. *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f., *Bletilla ochracea* Schltr., *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. can be grouped in the wavelength range of 4 400~4 800, 5 400~6 600, 7 800~10 000 cm⁻¹. The internal and external verification accuracy reached 100% and 90% respectively. In the range of 5 000~10 000 cm⁻¹, mixed pseudo-powder samples and *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. can also be clustered into one group. The residuals of the spectral properties are both 0, and the internal and external verification accuracy are both 100%. This technology provides the basis for identification *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. F, same genus medicine and mixed pseudo-powder samples.

Key words: Rhizoma Bletillae powder;NIRS;qualitative identification;cluster analysis

近红外光谱(Near-infrared reflectance spectroscopy,NIRS)是指介于中红外光与可见光之间,波长范围为12 820~3 959 cm⁻¹(780~2 526 nm)的电磁波^[1],是世界各国广为关注的一种药品分析方法,在美、欧、日、韩、澳大利亚等国家欧美药典均已纳入附录内容^[2]。近年来NIRS技术分析方法在农业^[3]、食品工业^[4]、制药^[5]等行业被广泛应用。同

时NIRS以其非破坏性、快速、便捷、绿色等特点也被广泛用于中药鉴定中^[6,7],主要用于中药材真伪、掺伪、产地、同属中药品种及中成药的鉴别和含量测定方面^[8,9]。

白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎,具有收敛止血,消肿生肌的功效。用于咯血,吐血,外伤出血,疮疡肿毒,皮肤皲裂。白及属 *Bletilla* Reichb. f. 植物在中国主要有4个种^[10],分别为白及 *B. striata*、黄花白及 *Bletilla ochracea* Schltr.、华白及 *Bletilla sinensis* (Rolfe) Schltr.、小白及 *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. ,

而《中国药典》只收载白及为正品来源^[11]。近年来,同属植物黄花白及、小白及和华白及因亲缘关系较近被作为地方习用品或代用品在市场上出现^[12]。目前,白及鉴别方法主要是通过外观观察、理化鉴别、显微特征观察等传统方法。因白及属亲缘关系近,且粉碎后的白及粉原有外观性状特征消失,故传统的鉴别方法不能区分。本研究在前期课题组的白及DNA条形码鉴别技术的基础上^[13],采用近红外光谱技术建立白及粉末定性鉴别模型,为快速判别为白及同属药材及混伪粉提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

NIR Flex N-500型近红外光谱仪,石英玻璃样品池以及旋转器漫反射积分球,NIRcal5.4数据分析处理软件(Buchi Labortechnik AG公司)。

1.2 药材

收集或采集四川、贵州等地区白及样品共40批,经前期课题组采用DNA条形码ITS2序列鉴定出18批为白及*B. striata* (Thunb.) Reichb. f.样品、19批黄花白及*B. ochracea* Schltr.样品、3批小白及*B. formosana* (Hayata) Schltr.样品,同时收集白及伪品黄精、知母以及市售三七粉、丹参粉、葛根粉、黄芪粉共23批,样品具体信息见表1。

表1 40批样品信息表

Table 1 Information of 40 batches of samples

批号 Batch No.	名称 Name	来源 Source	规格 Standard
1~3	白及 <i>B. striata</i>	贵州贵钢花鸟市场	统货
4	白及 <i>B. striata</i>	贵州六盘水市海林药房	统货
5	白及 <i>B. striata</i>	四川太兴药业有限公司	自采
6~17	白及 <i>B. striata</i>	成都市荷花池中药材专业市场	统货
18	白及 <i>B. striata</i>	贵州六盘水市老百姓药业公司	饮片
19~24	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	成都市荷花池中药材专业市场	统货
25~27	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	成都市荷花池中药材专业市场	饮片
28~29	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	四川成都新都区	自采
30	黄芪白及 <i>B. ochracea</i>	四川成都龙泉驿区	自采
31	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	四川成都金牛区	自采
32~33	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	四川都江堰龙池镇	自采
34	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	四川阿坝水磨镇	自采
35	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	四川太星药业有限公司	自采
36	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	贵州贵钢花鸟市场	饮片
37	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	贵州六盘水市水城中医药	饮片
38	小白及 <i>B. formosana</i>	贵州六盘水市医药公司	统货
39	小白及 <i>B. formosana</i>	四川成都新都区	自采
40	小白及 <i>B. formosana</i>	四川彭州白鹿镇	自采
41~46	黄精粉 <i>Rhizoma polygoni</i> powder	成都市荷花池中药材专业市场	统货
47~49	知母粉 <i>Rhizoma Anemone rrhenae</i> powder	成都市荷花池中药材专业市场	统货
50	三七粉 <i>Radix notoginseng</i> powder	康美药业股份有限公司	市售
51	三七粉 <i>Radix notoginseng</i> powder	四川国强中药饮片有限公司	市售
52	三七粉 <i>Radix notoginseng</i> powder	成都吉安康药业有限公司	市售
53	三七粉 <i>Radix notoginseng</i> powder	腾冲市福德生物资源开发有限公司	市售
54	三七粉 <i>Radix notoginseng</i> powder	巴中科伦医药贸易有限公司	市售
55	三七粉 <i>Radix notoginseng</i> powder	四川德仁堂中药股份有限公司出品	市售

续表1(Continued Tab. 1)

批号 Batch No.	名称 Name	来源 Source	规格 Standard
56	三七粉 <i>Radix notoginseng</i> powder	太极集团四川绵阳制药有限公司	市售
57	三七粉 <i>Radix notoginseng</i> powder	文山市苗乡三七实业有限公司	市售
58	三七粉 <i>Radix notoginseng</i> powder	文山市苗乡三七实业有限公司	市售
59	三七粉 <i>Radix notoginseng</i> powder	四川回春堂中药科技有限公司	市售
60	丹参粉 <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge. powder	成都岷江源药业股份有限公司	市售
61	黄芪粉 <i>Mrkvetch root</i> powder	云南向辉药业有限公司	市售
62	黄芪粉 <i>Mrkvetch root</i> powder	成都岷江源药业股份有限公司	市售
63	葛根粉 <i>Kudznu</i> powder	云南七丹药业股份有限公司	市售

2 方法与结果

2.1 白及与同属植物定性鉴别模型的建立

2.1.1 图谱信息采集

将表1中1~40批药材干燥、粉碎,过100目

筛,取8 g左右样品粉末置于石英样品杯中,均匀平铺,采用积分球漫反射方法进行图谱采集,采集条件:分辨率8 cm⁻¹,扫描64次,光谱扫描范围4 000~10 000 cm⁻¹,每个样品重复装样并扫描3次。40批样品的NIRS光谱叠加图见图1。

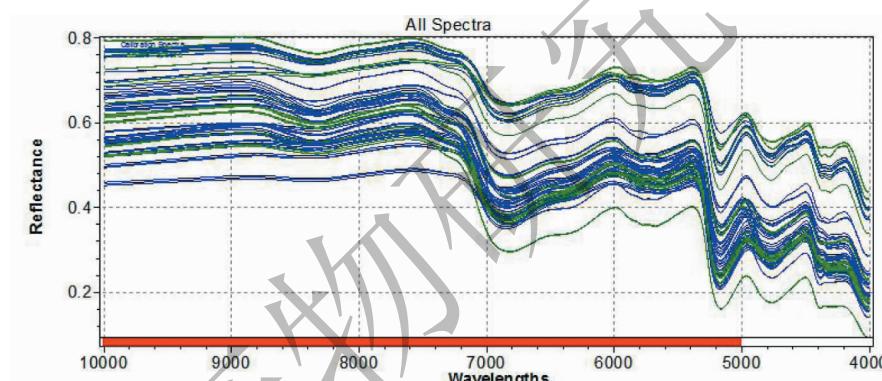


图1 40批样品NIRS的原始图谱
Fig. 1 Original spectra of 40 batches of sample

2.1.2 NIRS模型的建立

将已采集的40批样品光谱导入NIRcal中,按2:1的比例划分样品的定标集(C-set)和验证集(V-set),样品分配完成后,采用NIR Flex N-500型近红外光谱仪自带的NIRcal 5.4数据处理软件进行分析建模。

通过系统对建模波段、分析方法、光谱预处理方法及主成分数进行筛选及优化,去除对聚类分析图谱贡献小的因素,建立相应的数学模型,结果见表2,并用模型内部光谱进行验证,根据综合评价指标(Q值)、主成分二维得分图与主成分三维得分图(见图2、3),优选出最优模型。

由表2可知,最佳模型为选取4 400~4 800、5 400~6 600、7 800~10 000 cm⁻¹3个波段进行建

模,并采用聚类分析(Cluster)为计算方法,对原始光谱进行标准正态变量变换(SNV)结合9点卷积求导(dg2)光谱预处理。由白及与同属药材主成分二维及三维得分图(见图2、3)中可明显看出,通过上述方法处理,可将白及与同属黄花白及、小白及明显地聚类为相互独立的组分。图2、3中横坐标表示主成分1(PC1)的得分值,纵坐标表示主成分2(PC2)的得分值。证明白及与同属黄花白及、小白及在PC1和PC2上信息的载荷量有明显的差异,因此可以区分白及及其同属植物黄花白及、小白及。

2.1.3 模型的验证

为检测模型的预测性能,对建立的模型进行内部验证和外部验证,用验证集样品对所建模型进行评价验证即为内部验证。扫描的光谱进行预处理后

表 2 优选模型数据

Table 2 Optimization model of data

Q 值 Q value	主成分数 PLS Components	波长比例 Wavelength ratio (%)	选取波段 Select band (cm^{-1})	计算及预处理方法 Calculation and pretreatment method
0.503 7	2	63	4 400 ~ 4 800, 5 400 ~ 6 600, 7 800 ~ 10 000	Cluster, dg2, SNV
0.083 7	2	83	5 000 ~ 10 000	Cluster, dg2, SNV
0.083 3	2	79	5 000 ~ 7 144, 7 404 ~ 10 000	Cluster, dg2, SNV
0.011 9	2	63	4 400 ~ 4 800, 5 400 ~ 6 600, 7 800 ~ 10 000	Cluster, mf, db1, nle
0.011 9	2	63	4 400 ~ 4 800, 5 400 ~ 6 600, 7 800 ~ 10 000	Cluster, db1, nle
0.010 7	2	79	5 000 ~ 7 144, 7 404 ~ 10 000	Cluster, dg1, nle
0.010 3	2	83	5 000 ~ 10 000	Cluster, dg1, nle
0.010 0	2	79	5 000 ~ 7 144, 7 404 ~ 10 000	Cluster, mf, db1, nle
0.010 0	2	79	5 000 ~ 7 144, 7 404 ~ 10 000	Cluster, db1, nle
0.009 5	12	83	5 000 ~ 10 000	Cluster, ncl

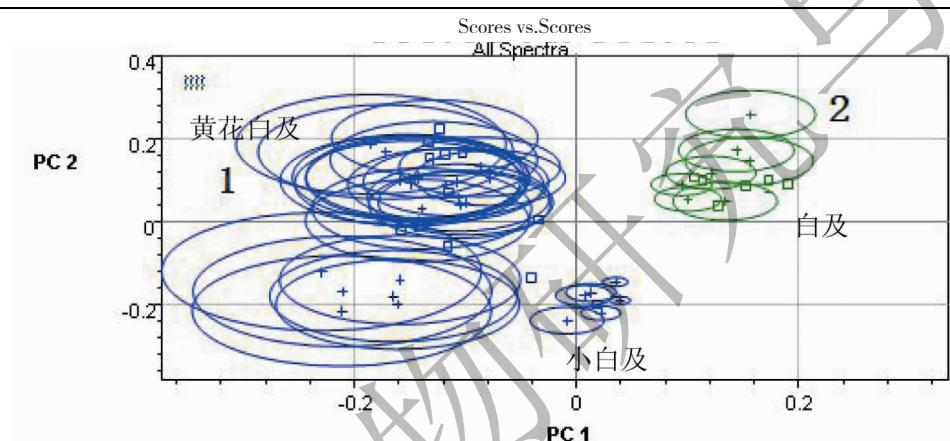


图 2 白及与同属药材主成分二维得分图(1. 同属白及 2. 白及)

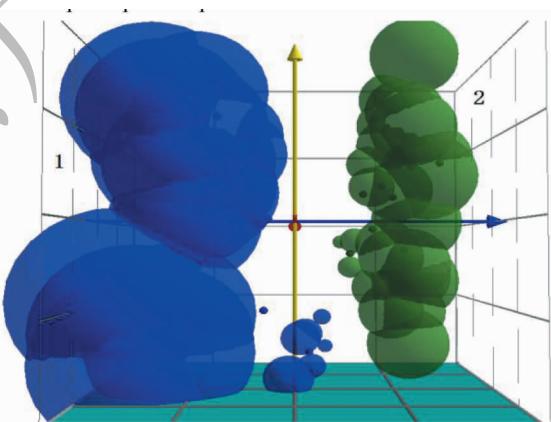
Fig. 2 Two-dimensional principal component scores chart of *Rhizoma Bletillae* and congener

图 3 白及与同属药材主成分三维得分图(1. 同属白及 2. 白及)

Fig. 3 Three-dimensional principal component scores chart of *Rhizoma Bletillae* and congener

可用属性残差来表示光谱的聚类效果,当属性残差为0时,证明所有光谱聚类正确,若属性残差为1,

证明有1条光谱聚类错误,属性残差为+1时证明有1条光谱离得较远,没有被模型识别。白及与同

属黄花白及、小白及的模型中,验证集和校正集光谱全部均被正确聚类,光谱属性残差都为0,内部验证的准确度为100%,说明模型的预测结果与实际结果一致。

外部验证时,采用模型外的10批白及与黄花白及、小白及样品进行外部验证。10批验证样品中只有1个被错判,准确率达90%,表明模型预测性能较好,可以作为白及品种来源的鉴定依据。

2.2 白及粉末与其混伪粉定性鉴别模型的建立

2.2.1 图谱信息采集

取8g左右表1中1~14和41~63批药材粉末装入石英样品杯中,均匀平铺,采用积分球漫反射方法进行图谱采集,采集条件:分辨率8 cm⁻¹,扫描64次,光谱扫描范围4 000~10 000 cm⁻¹,每个样品重复装样并扫描3次。36批样品的NIRS图谱叠加图见图4。

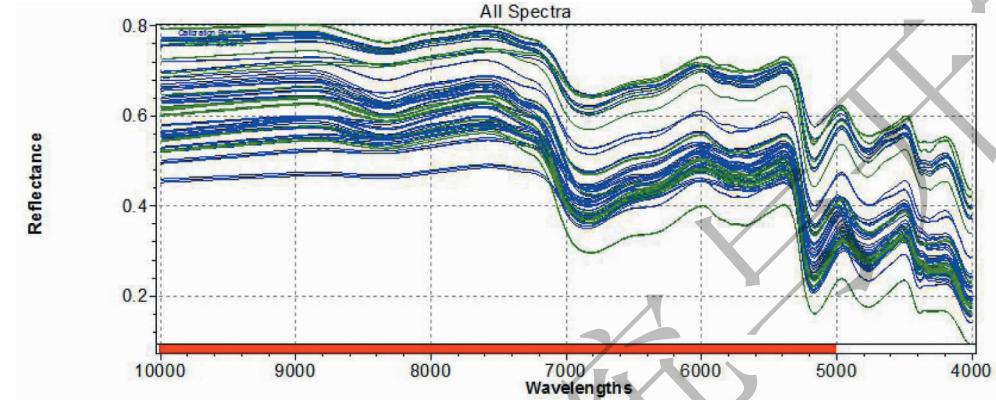


图4 36批样品NIRS的原始图谱

Fig. 4 Original spectra of 36 batches of *Citrus Reticulata Pericarpium*

2.2.2 NIRS 模型的建立

将已采集的36批样品光谱导入NIRcal中,按2:1的比例划分样品的定标集(C-set)和验证集(V-set),样品分配完成后,采用NIR Flex N-500型近红外光谱仪自带的NIRcal 5.4数据处理软件进行分析建模。

通过系统对建模波段、分析方法、光谱预处理方法及主成分数进行筛选及优化,去除对聚类分析图谱贡献小的因素,建立相应的数学模型,结果见表3,并用模型内部光谱进行验证,根据综合评价指标(Q 值)及主成分二维得分图与主成分三维得分图(见图5、6),优选出最优模型。

表3 优选模型数据

Table 3 Optimization model of data

Q 值 Q value	主成分数 PLS Components	波长比例 Wavelength ratio (%)	选取波段 Select band (cm ⁻¹)	计算及预处理方法 Calculation and pretreatment method
0.804 6	5	83	5 000~10 000	Cluster,dgl,nle
0.801 1	5	83	5 000~10 000	Cluster,mf,db1,nle
0.801 1	5	83	5 000~10 000	Cluster,db1,nle
0.801 1	5	79	5 000~7 144,7 404~10 000	Cluster,dg1,nle
0.796 6	5	79	5 000~7 144,7 404~10 000	Cluster,mf,db1,nle
0.796 6	5	79	5 000~7 144,7 404~10 000	Cluster,db1,nle
0.740 8	3	63	4 400~4 800,5 400~6 600,7 800~10 000	Cluster,dgl,nle
0.233 8	7	100	4 000~10 000	Cluster,dg1,nle
0.233 7	7	100	4 000~10 000	Cluster,mf,db1,nle
0.705 4	3	100	4 000~10 000	Cluster,ds2,SNV

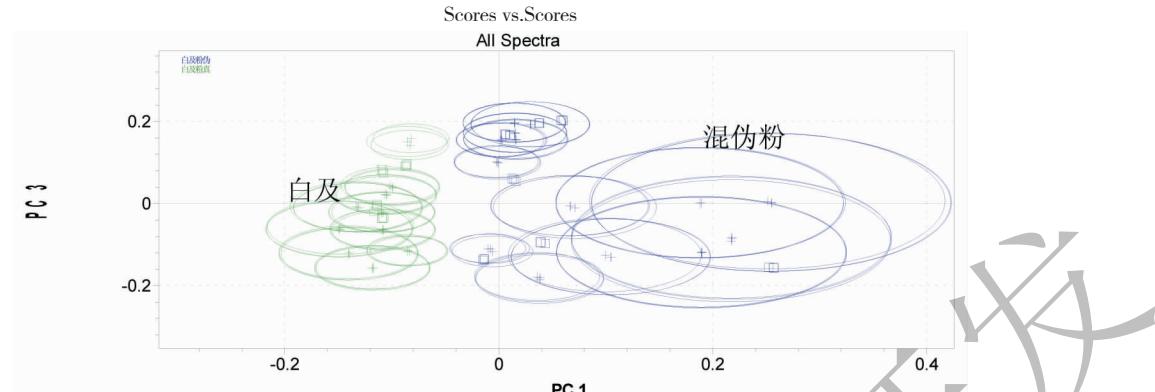


图 5 白及及混伪品粉末主成分二维得分图

Fig. 5 Two-dimensional principal component scores chart of Rhizoma Bletillae and mixed pseudo powder

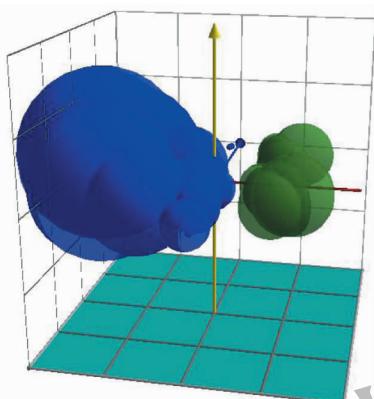


图 6 白及及混伪品粉末主成分三维得分图

Fig. 6 Two-dimensional principal component scores chart of Rhizoma Bletillae and mixed pseudo powder

由表 3 可知,最佳模型结果为选取 5 000 ~ 10 000 cm^{-1} 波段进行建模,采用聚类分析(Cluster)为计算方法,对原始光谱进行 9 点卷积一阶导数(dg1)与单位长度归一化(nle)光谱预处理。由白及与掺伪及混伪品粉末主成分二维及三维得分图(见图 5、6)可明显看出,可将白及与混伪品粉末明显地聚类为相互独立的 2 组。图 5、6 中横坐标表示主成分 1(PC1)的得分值,纵坐标表示主成分 2(PC2)的得分值。通过上述方法处理,证明白及与掺伪及混伪品粉末在 PC1 和 PC2 上信息的载荷量有明显的差异,因此可以区分。

2.2.3 模型验证

通过对建立的模型进行内部验证和外部验证来检测模型的预测性能。扫描的光谱进行预处理后可用属性残差来表示光谱的聚类效果,当属性残差为 0 时,证明所有光谱聚类正确,若属性残差为 1,证明有 1 条光谱聚类错误,属性残差为 +1 时证明有 1

条光谱离得较远,没有被模型识别。白及与混伪品粉末的模型中,验证集和校正集光谱全部均被正确聚类,光谱属性残差都为 0,内部验证的准确度为 100%。

外部验证时,采用模型外的 10 批白及与掺伪粉末进行外部验证。10 批验证样品中没有 1 个被错判,准确率高达 100%,表明模型预测性能良好。

3 讨论与结论

近红外光谱技术作为一种绿色的分析手段,该光谱属分子振动光谱,是基频分子振动的倍频和组合频,主要反映了含氢基团(如-OH、-NH、-CH 和-SH 等)的特征信息,近红外光谱定性分析中,通过对光谱进行主成分分解,选取特征值较大的几个主成分得分作为特征变量,在尽量保留原有特征的前提下,不仅对原始光谱进行了压缩,还可将特征信息提取;随后采用聚类分析方法,将多维空间中彼此距离小的相似样品“聚”在一起,并以 Q 值作为综合评价指标^[1]。本文中采用聚类分析方法对不同品种来源的白及和白及混伪粉建立定性鉴别模型,以不同品种白及与其混伪品的光谱信息为变量,由不同主成分得分向量作二维和三维图显示,得到了良好的分类。

白及为我国传统中药,近年来随着白及市场需求量的逐渐上升,商品药材价格迅速增长,野生资源遭到掠夺式采挖,黄花白及和小白及作为代替品以及混伪现象逐渐在市场上出现,但两者为非药典收载品种,且相关报道少;而黄精常被加工后仿冒白及使用^[14]。白及打粉后失去原有性质,更是难以辨别,本文选取了市场上部分颜色相近的知母、葛根、黄芪、丹参、三七粉末药材作为混伪品,在 DNA 条形码鉴别技术的基础上,通过近红外光谱技术建立白

及粉及其混伪品定性鉴别模型,实验选取了4 400~4 800、5 400~6 600、7 800~10 000 cm⁻¹三个波段进行白及与同属植物定性鉴别模型的建立,5 000~10 000 cm⁻¹波段建立白及与混伪品定性鉴别模型,经内部验证及外部验证模型的预测性能均良好,可为快速判别白及粉品种来源和真伪的鉴别提供参考。

本研究在建立白及与同属植物定性鉴别模型及其混伪品定性鉴别模型中白及、小白及和混伪药材少,并且未能收集到华白及,不能反映白及所有药材信息,还不能达到100%的准确,因此还需全面收集不同产地具代表性的白及、小白及、华白及和更多易混伪药材参与模型的建立,以便于快速、准确地鉴别白及。

参考文献

- 1 Lu WZ(陆婉珍), Yuan HF(袁洪福), Xu GT(徐广通), et al. Modern near infrared spectroscopy analytical technology (现代近红外光谱分析技术) [M]. Beijing: China Petrochemical Press, 2000:1.
- 2 Hu YC(胡咏川), Tian XX(田晓鑫), Liu L(刘蕾), et al. Advances in identification of Chinese medicines by NIRS [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 1066-1071.
- 3 Chen ZG(陈争光), Li X(李鑫), Fan XJ(范学佳). Method for the discrimination of the variety of potatoes with Vis/NIR spectroscopy [J]. *Spectrosc Spectral Anal* (光谱学与光谱分析), 2016, 36: 2474-2478.
- 4 Sun YX(孙玉侠). Application of near infrared spectroscopy technology in food industry [J]. *Sci Technol Cereals Oils Foods* (粮油食品科技), 2017, 25(1): 58-60.
- 5 Li TT(李彤彤), Hu T(胡甜), Nie L(聂磊), et al. Rapid monitoring five components of ethanol precipitation process of Shenzhiling oral solution using near infrared spectroscopy [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2016, 41: 3543-3550.
- 6 Lucio-Gutiérrez JR, Coello J, MasPOCH S. Application of near infrared spectral fingerprinting and pattern recognition techniques for fast identification of *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Food Res Int*, 2011, 44: 557-565.
- 7 Chan CO, Chu CC, Mok DK, et al. Analysis of berberine and total alkaloid content in cortex phellodendri by near infrared spectroscopy (NIRS) compared with high-performance liquid chromatography coupled with ultra-visible spectrometric detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 592: 121-131.
- 8 Li Z(李真), Zhou LH(周立红), Ye ZL(叶正良), et al. Research progress on application of near-infrared reflectance spectroscopy in pharmaceutical analysis [J]. *Drug Eval Res* (药物评价研究), 2016, 39: 686-692.
- 9 Zhan H(战皓), Liu MT(柳梦婷), Fang J(方婧), et al. Application of near infrared analytical technique in identification and content determination of traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21(12): 231-234.
- 10 Xiao PG(肖培根). *Modern Chinese materia medica*: Vol I (新编中药志) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001: 321.
- 11 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*: Vol I (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 103.
- 12 Ren FM(任风鸣), Liu Y(刘艳), Li Y(李灌), et al. Resource distribution and breeding of medicinal plants in genus *Bletilla* Reichb. f. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 47: 4478-4487.
- 13 Chen MJ(陈美君), Li FQ(李锋庆), Lv M(吕蒙), et al. Comparison and identification of secondary structure of ITS2 sequence in *Bletillae Rhizoma* and its counterfeits [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(15): 46-52.
- 14 Xu YY(徐玉英). The identification research of Chinese traditional medicine *Rhizoma Bletillae* and its common forgery. *China Health Care Nutr* (中国保健营养), 2016, 26: 267-268.