

# 红外光谱结合化学计量学快速检测熊胆粉真伪及掺伪问题

袁明昊<sup>1</sup>,周涛<sup>1</sup>,钟文潇<sup>1</sup>,周强<sup>1</sup>,雷苛露<sup>1</sup>,曾大富<sup>2</sup>,李建刚<sup>2</sup>,郭力<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学药学院西南特色中药资源国家重点实验室;<sup>2</sup>成都晶博生物科技有限责任公司,成都 611137

**摘要:**利用红外光谱技术对熊胆粉正品、伪品及掺伪品进行快速鉴别并预测掺伪比例,建立熊胆粉的快速质量评价方法。采集94批熊胆粉正品、70批伪品(猪胆粉、牛胆粉、羊胆粉、兔胆粉、鸡胆粉、鸭胆粉、鹅胆粉)及180批掺伪品(掺伪猪胆粉、掺伪牛胆粉)的红外光谱图,利用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)及偏最小二乘回归(PLSR)分别建立熊胆粉正品、伪品和掺伪品的定性校正模型及不同类别掺伪品掺伪比例的定量校正模型。熊胆粉正品、伪品及掺伪品的定性校正模型对样本的判别准确率分别为99.64%(校正集)和95.65%(验证集);通过进一步判别分析,可鉴别熊胆粉伪品及掺伪品种类,准确率均大于95%;在2个不同类别掺伪品定量校正模型中,验证集相关系数( $R_v^2$ )和预测均方根误差(RMSEP)分别为0.9874、2.6300%(熊胆粉掺伪猪胆粉)和0.9826、3.1887%(熊胆粉掺伪牛胆粉);3个定性模型及2个定量模型均表现出优秀的预测能力。本研究建立的红外光谱结合化学计量学方法可实现对熊胆粉正品、伪品和掺伪品的快速鉴别及掺伪比例确定,为熊胆粉的质量控制及评价提供参考。

**关键词:**红外光谱;熊胆粉;真伪;掺伪;正交偏最小二乘判别分析;偏最小二乘回归

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)5-0856-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.5.015

## Rapid detection of authenticity and adulteration of bear bile powder by FTIR spectroscopy combined with chemometrics

YUAN Ming-hao<sup>1</sup>, ZHOU Tao<sup>1</sup>, ZHONG Wen-xiao<sup>1</sup>,  
ZHOU Qiang<sup>1</sup>, LEI Ke-lu<sup>1</sup>, ZENG Da-fu<sup>2</sup>, LI Jian-gang<sup>2</sup>, GUO Li<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy,  
Chengdu University of Traditional Chinese Medicine;

<sup>2</sup>Chengdu Jingbo Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 611137, China

**Abstract:** To establish a rapid quality evaluation method of bear bile powder, infrared spectroscopy was introduced to distinguish bear bile powder from its counterfeits and adulterants. In addition, the adulterated proportion was predicted by infrared spectroscopy combined with chemometrics. Infrared spectra of 94 batches of bear bile powder, 70 batches of its counterfeits (pig bile powder, cow bile powder, goat bile powder, rabbit bile powder, chicken bile powder, duck bile powder and goose bile powder) and 180 batches of its adulterants (bear bile powder adulterated with pig bile powder, bear bile powder adulterated with cow bile powder) were collected. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) was used to establish the qualitative correction models of bear bile powder, its counterfeits and adulterants. Partial least squares regression (PLSR) was used to establish the quantitative correction models of adulterated proportions of different kinds of adulterants. The accuracy of the qualitative correction model for bear bile powder, its counterfeits and adulterants was 99.64% (calibration set) and 95.65% (verification set), respectively. According to further discriminant analysis, the category of the counterfeit and adulterated bear bile powder could be identified with an accuracy greater than 95%. In the two quantitative correction models, the correlation coefficients of the validation set ( $R_v^2$ ) and the root mean square error of prediction (RMSEP) were 0.9874, 2.6300% (bear bile powder adulterated with pig bile powder) and 0.9826, 3.1887% (bear bile powder adulterated with cow bile powder), respectively. The three qualitative models and two quantitative models all showed excellent pre-

收稿日期:2021-10-27 接受日期:2022-01-14

基金项目:四川省科技基础条件平台项目(2019JDPT0032);“杏林学者”学科人才科研提升计划(CXTD2018012)

\*通信作者 Tel:86-013881721081, E-mail:gli64@sina.com

dictive ability. The method of infrared spectroscopy combined with chemometrics established in this study can realize the rapid identification of bear bile powder, its counterfeits and adulterants as well as the determination of adulterated proportion. It also provides a meaningful reference for quality control and evaluation of bear bile powder.

**Key words:** infrared spectroscopy; bear bile powder; authenticity; adulteration; orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA); partial least squares regression (PLSR)

熊胆粉为熊科动物黑熊 *Selenarctos thibetanus* Cuvies 经胆囊手术引流胆汁而得的干燥品,具有清热、平肝、明目的功效<sup>[1]</sup>,为我国四大名贵动物药材之一。由于熊胆粉来源特殊价格昂贵,市场上存在以其他动物胆粉冒充熊胆粉进行销售的情况。此外,本课题组前期市场调研发现由于猪胆粉和牛胆粉产量可观价格低廉,外观性状与熊胆粉较为相似,除作为伪品冒充熊胆粉外,还常掺入熊胆粉中出售,且与伪品相比,掺伪品的检测难度更高。此类现象导致市售熊胆粉质量参差不齐,严重影响临床疗效和消费者权益,因此,熊胆粉的真伪鉴别及掺伪比例预测对于熊胆粉的质量控制具有重要意义。

熊胆粉常用鉴别方法包括薄层色谱法<sup>[2]</sup>、高效液相色谱法<sup>[3]</sup>及特异性聚合酶链式反应(PCR)<sup>[4]</sup>,但此类方法存在耗时较长、操作复杂、对样本有破坏性等问题,且在样本量较大的情况下部分方法耗费大量有机试剂。近红外光谱具有分析速度快、对样本破坏性小、无需预处理等优点,现已广泛应用于中药的真伪和掺伪鉴别<sup>[5]</sup>。然而由于熊胆粉具有强烈的吸湿性,用于近红外光谱分析后易损失部分样品,因此该方法应用于胆类药材具有一定的局限性。与近红外光谱相比,红外光谱法同样具有分析快速、灵敏等特点,且所需样本量极少,更适用于贵重药材的质量控制。目前采用红外光谱法鉴别熊胆粉的报道较少,仅 Yan 等<sup>[6]</sup>对比了熊胆粉与其余 3 种动物胆粉的红外光谱,但其样本量较少,对掺伪行为缺乏关注且未结合化学计量学对结果可视化。本研究以熊胆粉与猪胆粉、牛胆粉制备了不同比例的掺伪样品,采集了正品、7 类伪品及 2 类掺伪品的红外光谱,采用基线校正、平滑、求导等预处理方法对所得光谱进行优化,结合正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)和偏最小二乘回归(PLSR)方法,探究红外光谱用于熊胆粉真伪鉴别及掺伪比例预测的可行性,为熊胆粉及其他贵重药材的质量控制提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

傅里叶变换红外光谱(PerkinElmer); YP-2 压片

机(上海山岳科学仪器有限公司)。

### 1.2 样品与试剂

#### 1.2.1 正品熊胆粉

供试熊胆粉共 94 批,由成都晶博生物科技有限公司提供,经成都中医药大学龙飞副教授鉴定为中药熊胆粉正品。样品研碎过 80 目筛后置干燥器中保存备用。

#### 1.2.2 伪品及掺伪品

猪胆粉、牛胆粉、羊胆粉、兔胆粉、鸡胆粉、鸭胆粉和鹅胆粉各 10 批由实验室自制,新鲜胆汁过滤后 50 °C 鼓风干燥,研碎过 80 目筛即得。将猪胆粉和牛胆粉分别按照不同的比例(W/W)掺入 10 批正品熊胆粉中,共得 180 批掺伪熊胆粉(猪胆粉掺伪、牛胆粉掺伪各 90 批),其中猪胆粉掺伪比例为 7.92% ~ 91.84%,牛胆粉掺伪比例为 8.08% ~ 94.24%。

#### 1.2.3 试剂

光谱级溴化钾购于成都市科隆化学品有限公司。

### 1.3 压片及样品测定

取供试品粉末约 1.0 mg,加入 150 mg 溴化钾粉末,置玛瑙研钵中研细并混合均匀,随后置压片模具中于压片机上压片 2 min,取出置透射测定架并采集其红外光谱。

以空白溴化钾为背景,光谱采集范围 4 000 ~ 400  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数为 32 次。

### 1.4 光谱预处理

采用 OMNIC 9.2 软件对光谱数据进行自动基线校正、平滑、标准正态变量变换(SNV)及求导后导出数据为 CSV 格式,采用 Origin 2021 软件绘制红外图谱,使用 SIMCA 14.1 软件建立 OPLS-DA 模型,使用 The Unscrambler X 10.4 软件建立 PLSR 模型。

### 1.5 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)

OPLS-DA 是在偏最小二乘判别(PLS-DA)基础上发展的一类有监督的学习方法,与 PLS-DA 相比,OPLS-DA 将 X 变量中的系统变异分解为同 Y 变量线性相关和同 Y 变量正交的部分,随着正交变异组分增加将提供更多的解释性<sup>[7]</sup>。OPLS-DA 模型的

优劣通过内部验证、置换验证及外部验证进行评价。一般情况下,内部验证中模型对变量解释度  $R^2$  和预测度  $Q^2$  越接近 1,且  $R^2$  和  $Q^2$  差距不大于 0.2 ~ 0.3,则模型越可靠。置换验证中所有样品对应  $R^2$  和  $Q^2$  计算值所组成的拟合直线在 Y 坐标轴的截距应分别小于 0.3 和 0.05。外部验证中预测准确率越高则模型越可靠<sup>[8]</sup>。

### 1.6 偏最小二乘回归(PLSR)

PLSR 是光谱中最常用的线性回归算法,能够同时提取 X 变量和 Y 变量成分并使二者协方差达到最大,且无需选择所有的提取成分用于回归模型的建立,一般只需选择前 k 个成分即可<sup>[9]</sup>。常用的 PLSR 模型评级指标包括校正集、验证集的相关系数 ( $R_c^2$ 、 $R_v^2$ ),校正集、交叉验证、验证集均方根误差 (RMSEC、RMSECV、RMSEP) 及验证集标准偏差与预测集标准偏差之比 (RPD)<sup>[10]</sup>。一般认为  $R_c^2$  和  $R_v^2$  值越接近于 1, RMSE 值越小,且 RPD 值大于 2.5 该模型性能越好<sup>[11,12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 红外光谱分析

8 种动物胆粉的红外光谱图经自动基线校正及平滑预处理后如图 1 所示,熊胆粉的主要吸收峰位于 3 430、2 925、2 860、1 650、1 550、1 200、1 050  $\text{cm}^{-1}$  等处,其中 3 430  $\text{cm}^{-1}$  处宽峰为-OH 和-NH 基团的伸缩振动;2 925 和 2 860  $\text{cm}^{-1}$  处为烷烃 C-H 的伸缩振动;1 650 和 1 550  $\text{cm}^{-1}$  处分别为-CO 伸缩振动以及 N-H 的弯曲振动,二者为酰胺基特征吸收峰;1 200 和 1 050  $\text{cm}^{-1}$  处的双强峰为- $\text{SO}_3\text{H}$  的特征吸收峰<sup>[13]</sup>。大部分伪品吸收峰波段与熊胆粉较为相似但吸收强度不同,其中磺酸基的吸收峰强度差异最为显著。此外,仅牛胆粉和羊胆粉红外光谱图中 1 000 ~ 900  $\text{cm}^{-1}$  波段表现出胆酸吸收峰<sup>[14]</sup>。动物胆粉中主要化学成分为胆汁酸且以结合型胆汁酸为主,红外光谱反映了此类化合物酰胺基和磺酸基等多种化学键信息,为利用红外光谱鉴别熊胆粉真伪及预测掺伪比例提供了理论依据。

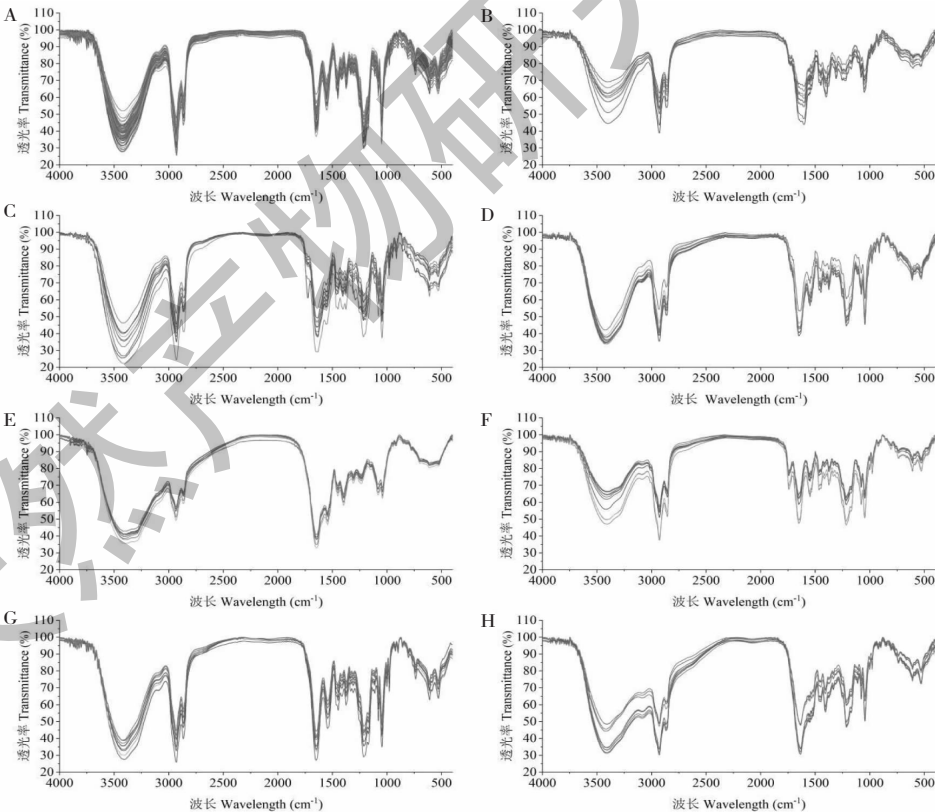


图 1 熊胆粉及其伪品红外图谱

Fig. 1 Infrared spectra of bear bile powder and its counterfeits

注:A. 熊胆粉;B. 猪胆粉;C. 牛胆粉;D. 羊胆粉;E. 兔胆粉;F. 鸡胆粉;G. 鸭胆粉;H. 鹅胆粉。Note: A. Bear bile powder; B. Pig bile powder; C. Cattle bile powder; D. Goat bile powder. E. Rabbit bile powder; F. Chicken bile powder; G. Duck bile powder; H. Goose bile powder.

## 2.2 熊胆粉正品、伪品及掺伪品的鉴别分析

### 2.2.1 样本集划分

采用 SPSS 25 将正品、伪品及掺伪品按 4:1 比例进行随机样本集划分,其中正品、伪品及掺伪品校正集样本分别为 75、56 和 144 份,验证集样本分别为 19、14 和 36 份。累计获得校正集 275 份,验证集 69 份。

### 2.2.2 预处理方法选择

在红外光谱采集过程中,样品制备过程及外界环境均会对光谱数据产生一定的影响,因此,在建立红外模型之前需对红外光谱进行预处理。本课题组前期研究发现样本的红外光谱基线漂移严重,在不对其进行基线校正的情况下观察到明显的组内差

异,后续无论何种预处理方法均无法改善此类情况。因此,所有原始光谱均经自动基线校正(Baseline)及平滑(SG-Smoothing)之后进行后续预处理。红外光谱常用的预处理方法包括标准正态变量变换(SNV)、一阶求导(1st D)和二阶求导(2nd D)等。SNV 可消除样本颗粒分布不均匀对光谱的散射影响,而求导可提高光谱分辨率和灵敏度<sup>[15]</sup>。不同光谱预处理方法建立的熊胆粉正品、伪品及掺伪品的 OPLS-DA 模型参数见表 1。结果表明,经 SNV + 2nd D 预处理后模型性能最佳,校正集和验证集预测准确率均高于 95%。该模型最佳主成分个数为 2,累计解释了 86.26% 的总方差。

表 1 不同光谱预处理方法建立的熊胆粉-掺伪品-伪品样本判别模型性能

Table 1 Performance of OPLS-DA model of bear bile powder, adulterated bear bile powder and its counterfeits samples established by different spectral pretreatment methods

预处理方法 Pretreatment method	内部验证 Internal validation		校正集 Calibration set		验证集 Validation set	
	$R^2$	$Q^2$	比例 Proportion	准确率 Accuracy (%)	比例 Proportion	准确率 Accuracy (%)
None	0.783	0.763	270/275	98.18	60/69	86.96
SNV	0.784	0.770	268/275	97.45	59/69	85.50
1st D	0.792	0.760	270/275	98.18	63/69	91.30
SNV + 1st D	0.782	0.745	268/275	97.45	60/69	86.96
2nd D	0.852	0.802	272/275	98.91	65/69	94.20
SNV + 2nd D	0.863	0.812	274/275	99.64	66/69	95.65

注:None:原始光谱经自动基线校正及平滑预处理。

Note:None means that the original spectra only pretreated with baseline and SG-Smoothing.

### 2.2.3 熊胆粉正品、伪品及掺伪品判别分析模型的建立与验证

如图 2 所示,熊胆粉正品、伪品和掺伪品具有各自的空间分布,由于伪品中包含多种其他动物胆粉,因此该分组中部分样本分布较为离散。校正集中仅有 1 个猪胆粉样本被误判为掺伪品,验证集中有一个熊胆粉正品样本和牛胆粉样本被误判为掺伪品。对模型进行置换验证结果模型中所有样品对应  $R^2$  和  $Q^2$  计算值所组成的拟合直线在 Y 坐标轴的截距分别为 0.162 和 -0.267,表明该模型没有过拟合。

为验证模型的预测能力,使用模型外的 5 批熊胆粉、10 批掺伪熊胆粉(不同比例掺伪猪胆粉及牛胆粉各 5 批)和 25 批伪品(猪胆粉和牛胆粉各 5 批,其余动物胆粉各 3 批)进行外部验证。将以上外部验证样本代入已建立的 OPLS-DA 模型,模型判别准

确率为 100%,表明该模型具有良好的预测能力,可用于鉴别熊胆粉真伪及掺伪行为。

### 2.2.4 伪品来源判别模型的建立与验证

同“2.2.1”项下样本集划分方法,所有伪品胆粉红外光谱经预处理后建立了 OPLS-DA 模型用以区分伪品胆粉来源,最佳预处理方法为 SNV + 2nd D。该模型最佳主成分个数为 6,  $R^2 = 0.970$ ,  $Q^2 = 0.957$ ,校正集和验证集预测准确率均为 100%,基于前 2 个主成分的 2D 得分图如图 3 所示。置换验证中所有样品对应  $R^2$  和  $Q^2$  计算值所组成的拟合直线在 Y 坐标轴的截距分别为 0.136 和 -0.384,证明该模型没有过拟合。所有外验证样本均被正确判别,表明该方法可在区分熊胆粉真伪的基础上进一步鉴别伪品来源。

### 2.2.5 不同类别掺伪熊胆粉判别模型的建立及验证

同“2.2.1”项下样本集划分方法,将所有掺伪熊胆粉样本划分为训练集与验证集。掺伪品类别鉴定的 OPLS-DA 模型最佳光谱预处理方法为 SNV + 1st D,该模型最佳主成分个数为 8,  $R^2 = 0.923$ ,  $Q^2 = 0.868$ ,校正集和预测集准确率分别为 100% 和 97.22%,其 2D 得分图如图 4 所示。置换验证中中

所有样品对应  $R^2$  和  $Q^2$  计算值所组成的拟合直线在 Y 坐标轴的截距分别为 0.205 和 -0.410,表明该模型没有过拟合。将 10 批未参与建模的掺伪熊胆粉样本代入模型进行外部验证,结果准确率为 100%。上述结果表明,红外光谱结合化学计量学可鉴别熊胆粉正品、伪品及掺伪品并可进一步区分掺伪品类别。

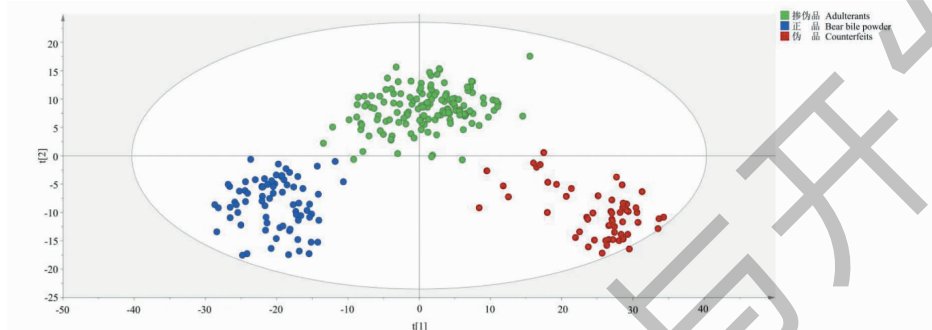


图 2 正品、伪品和掺伪品得分图

Fig. 2 OPLS-DA score plots of bear bile powder, counterfeits and adulterants

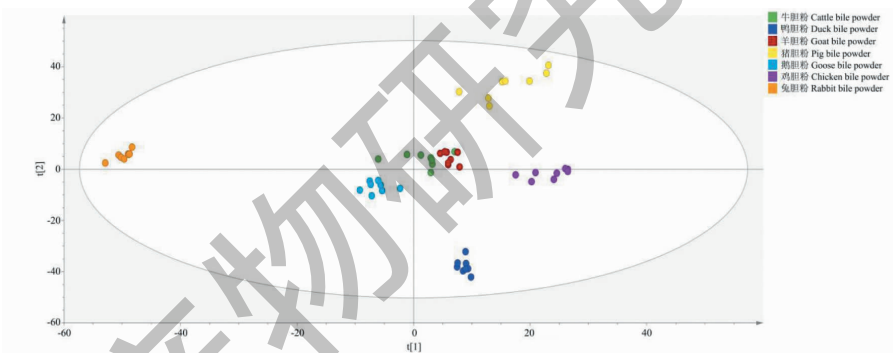


图 3 不同伪品得分图

Fig. 3 OPLS-DA score plots of different kinds of counterfeits

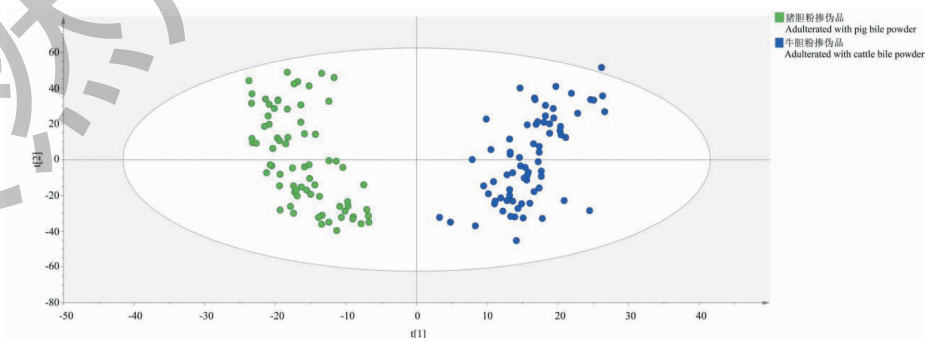


图 4 不同类型掺伪品的得分图

Fig. 4 OPLS-DA score plots of different kinds of adulterants

## 2.3 熊胆粉掺伪比例定量分析

### 2.3.1 样本集划分

同“2.2.1”项下样本集划分方法,将 2 种掺伪

熊胆粉样本分别进行样本集划分,各自得到 72 个校正集和 18 个验证集样本。

2.3.2 预处理方法选择

使用不同的光谱预处理方法分别建立 PLSR 定量校正模型,通过比较  $R_c^2$ 、 $R_v^2$ 、均方根误差 (RMSE) 等参数筛选出各自最佳的 PLSR 模型。基于不同预处理方法建立的猪胆粉掺伪和牛胆粉掺伪的 PLSR 定量模型参数见表 2,熊胆粉掺伪猪胆粉和掺伪牛

胆粉的最佳预处理方法分别为 SNV + 1st D 和 SNV + 2nd D,以最佳光谱预处理方法建立的 2 种掺伪熊胆粉定量模型的  $R_c^2$  和  $R_v^2$  均大于 0.95,表明红外光谱结合化学计量学用以熊胆粉中掺伪比例的确定具有较高的准确性。

表 2 不同光谱预处理对不同类别掺伪熊胆粉的定量分析模型校正和预测结果的影响

Table 2 Performance of PLSR model of different types of adulterated bear bile powder established by best spectral pretreatment method

掺伪类别 Adulteration category	预处理方法 Pretreatment method	因子个数 Factor number	$R_c^2$	RMSEC (%)	RMSECV (%)	$R_v^2$	RMSEP (%)	RPD
掺伪猪胆粉 Adulterated with pig bile powder	None	2	0.969 0	4.650 5	5.194 2	0.977 4	3.510 5	6.86
	SNV	1	0.967 1	4.792 8	5.090 5	0.982 5	3.090 5	7.79
	1st D	3	0.971 3	4.476 8	4.978 8	0.957 5	4.820 4	4.99
	SNV + 1st D	2	0.975 2	4.160 2	4.435 0	0.987 4	2.630 0	9.15
	2nd D	3	0.954 1	5.662 1	6.191 0	0.910 1	7.014 9	3.43
掺伪牛胆粉 Adulterated with cattle bile powder	SNV + 2nd D	3	0.966 4	4.845 9	5.396 9	0.975 3	3.678 0	6.54
	None	3	0.978 9	3.816 6	4.234 5	0.971 5	4.074 8	6.10
	SNV	2	0.974 1	4.231 0	4.652 9	0.966 3	4.431 9	5.61
	1st D	2	0.985 3	3.182 0	3.404 2	0.970 1	4.175 9	5.96
	SNV + 1st D	1	0.972 2	4.377 2	4.746 5	0.965 8	4.467 8	5.56
	2nd D	2	0.979 4	3.774 8	4.035 1	0.968 7	4.271 3	5.82
	SNV + 2nd D	2	0.985 4	3.169 5	3.334 7	0.982 6	3.188 7	7.80

注:None:原始光谱经自动基线校正及平滑预处理。

Note:None means that the original spectra only pretreated with baseline and SG-Smoothing.

2.3.3 最佳因子数的选择

最佳因子个数的选择对 PLSR 模型同样至关重要,虽然增加因子数可导致  $R^2$  的增大,但也有可能导致模型过拟合<sup>[16]</sup>。本研究通过预测残差平方和 (PRESS) 与  $R_v^2$  确定最佳因子个数<sup>[10]</sup>。如图 5 所

示,在 2 个因子数之前,2 种掺伪熊胆粉定量模型的 PRESS 明显减小而  $R_v^2$  值明显增大,2 因子之后 PRESS 和  $R_v^2$  值的变化可以忽略不计。因此,2 因子数为本研究中 2 个 PLSR 定量校正模型的最佳因子数。

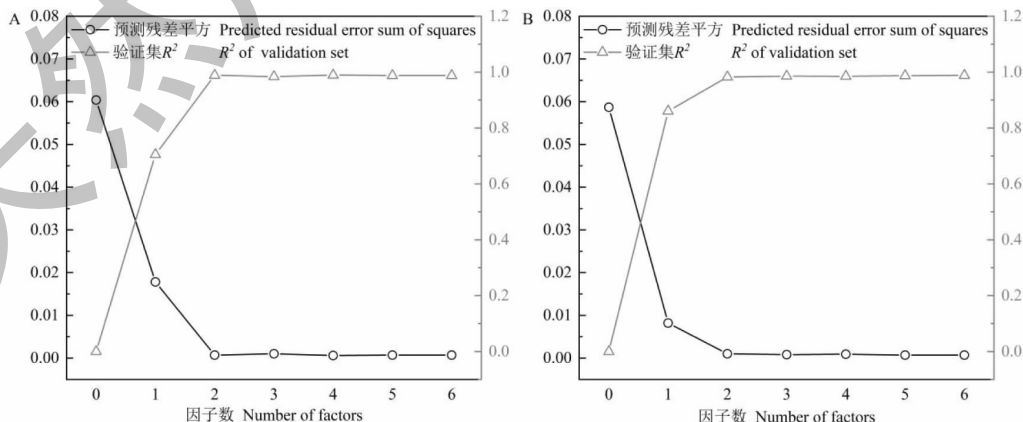


图 5 PLSR 模型中不同因子数的预测残差平方和与验证集  $R^2$

Fig. 5 Predicted residual error sum of squares and  $R^2$  of validation set in different factor numbers

注:A.熊胆粉掺伪猪胆粉;B.熊胆粉掺伪牛胆粉。Note:A. Bear bile powder adulterated with pig bile powder;B. Bear bile powder adulterated with cattle bile powder.

### 2.3.4 掺伪熊胆粉定量校正模型的建立与评价

通过上述预处理过程,建立了熊胆粉掺伪猪胆粉和牛胆粉的掺伪比例定量校正模型,其  $R_c^2$ 、RMSEEC、RMSECV 值分别为 0.975 2、4.160 2%、4.435 0% (熊胆粉掺伪猪胆粉) 和 0.985 4、3.169 5%、3.334 7% (熊胆粉掺伪牛胆粉)。在上述模型建立之后,将各自 18 批验证集样本带入对应 PLSR

模型中,其  $R_v^2$  和 RMSEP 分别为 0.987 4、2.630 0% (熊胆粉掺伪猪胆粉) 和 0.982 6、3.188 7% (熊胆粉掺伪牛胆粉),且各自 RPD 值远大于 2.5。校正集和预测集样本实际掺伪比例与预测值对比如图 6 所示,大部分样本的预测值与实际值较为接近,表明熊胆粉掺伪猪胆粉和牛胆粉的模型预测能力较为理想。

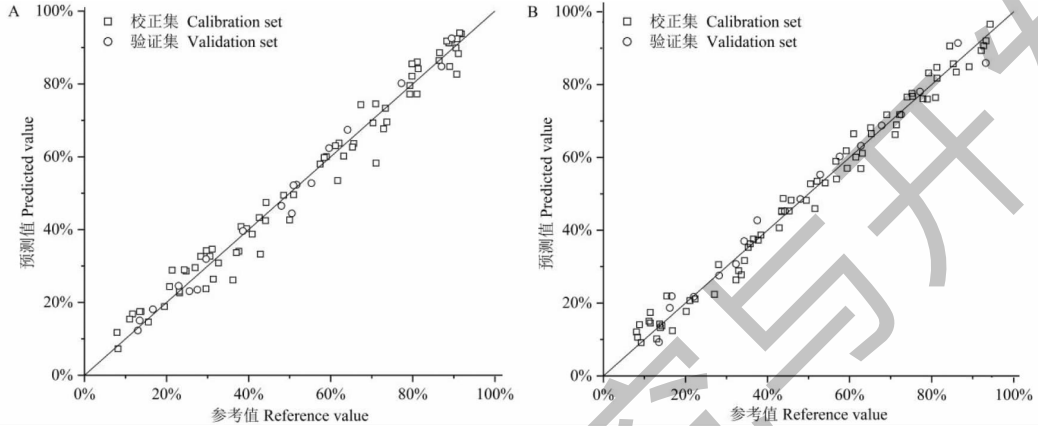


图 6 熊胆粉掺伪比例模型的预测值与实际值

Fig. 6 Predicted values and actual values of adulteration proportion prediction models of bear bile powder

注:A.熊胆粉掺伪猪胆粉;B.熊胆粉掺伪牛胆粉。Note:A. bear bile powder adulterated with pig bile powder;B. bear bile powder adulterated with cattle bile powder.

### 2.3.5 定量校正模型的外部验证

选择未参与建模的 5 批猪胆粉和牛胆粉样品与熊胆粉按不同比例混合,将采集的红外光谱输入已建立的 PLSR 模型进行外部验证。预测回收率为外部验证样本的模型预测值与实际值之比,结果见表 3。熊胆粉掺伪猪胆粉的模型预测值和真实值相对误差为 2.64% ~ 9.61%,平均回收率为 104.81% ;

熊胆粉掺伪牛胆粉的模型预测值和真实值相对误差为 2.51% ~ 8.87%,平均回收率为 100.11%。以 2 种掺伪样本的模型预测值与真实值分别进行配对  $t$  检验,结果  $P$  值均大于 0.05,表明模型预测值与实际值无显著性差异,通过红外光谱结合 PLSR 可实现对以上两种掺伪物掺伪比例的快速预测。

表 3 外部验证样本预测结果

Table 3 Prediction results of samples in external validation set

掺伪类别 Adulteration category	真实值 Actual value (%)	预测值 Predicted value (%)	绝对误差 Absolute value	相对误差 Relative value (%)	预测回收率 Predicted recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)
掺伪猪胆粉 Adulterated with pig bile powder	79.28	77.19	-2.09	2.64	97.36	104.81
	62.04	63.75	1.71	2.76	102.76	
	44.23	47.44	3.21	7.28	107.26	
	38.14	40.84	2.7	7.08	107.08	
	26.95	29.54	2.59	9.61	109.61	
掺伪牛胆粉 Adulterated with cattle bile powder	78.95	76.01	-2.94	3.72	96.28	100.11
	56.82	54.07	-2.75	4.84	95.16	
	49.48	48.24	-1.24	2.51	97.49	
	36.54	37.54	1	2.74	102.74	
	28.07	30.56	2.49	8.87	108.87	

### 3 讨论与结论

本研究首次采用红外光谱结合化学计量学建立了熊胆粉正品、不同类别伪品及掺伪品的 OPLS-DA 定性模型及 2 类掺伪熊胆粉掺伪比例的 PLSR 定量模型,通过不同光谱预处理方法,所建立的熊胆粉正品、伪品、掺伪品鉴别模型,伪品类别模型及掺伪品类别模型对校正集和验证集的识别正确率均超过 95%;此外,2 类掺伪熊胆粉的掺伪比例定量模型的  $R_C^2$  和  $R_V^2$  均大于 0.95。以上结果表明红外光谱技术可对熊胆粉进行快速质量检测且结果具有较好的准确性。

与目前动物胆类药材常规分析方法相比,红外光谱法在保证结果准确性的同时节省了时间与成本,以近乎无损的方式完成了对贵重药材的质量控制。根据目前本课题组收集样本所建立的熊胆粉定性及定量模型,红外光谱法展现出了优异的检测能力,但光谱模型建立在大量样本的基础上且需不断补充样本以提高模型准确性及稳定性,因此后续将进一步增加样本类别及数目,更为准确地评价熊胆粉质量。

随着化学计量学的发展,红外光谱在药材质量控制方面具有广泛的应用前景,本研究为贵重药材质量控制提供了一个简单快捷的新方法,也为熊胆粉的质量控制提供了参考依据。

### 参考文献

- 1 Drug Specifications Promulgated by Ministry of Public Health. The Specifications of New Drugs Becoming Official (卫生部药品标准-新药转正标准) [S]. WS309 (B-09)-96 (Z), 1996:44-45.
- 2 Deng MZ, Zhao CZ, Peng XF, et al. Study on qualification and quantitation method of Xiongdan pills [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2012, 32:127-131.
- 3 Xiong J, Zheng TJ, Shi Y, et al. Analysis of the fingerprint profile of bioactive constituents of traditional Chinese medicinal materials derived from animal bile using the HPLC-ELSD and chemometric methods: an application of a reference scaleplate [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 174:50-56.
- 4 He YS, Lian XC, Gao LH, et al. Identification of bear bile powder based on fluorescence PCR technology [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2018, 41:2534-2536.
- 5 Wu XY, Hou XL, Su Y, et al. Determination of water-soluble extracts and gentiopicoside in Gentianae Radix et Rhizoma by portable near-infrared spectrometers [J]. Nat Prod Res

Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32:1363-1369.

- 6 Yan HY, Zou CC. Characteristic analysis by FT-IR for bile powder from bear and three other animals and comparison of the pharmacological effects [J]. J Wannan Med Coll (皖南医学院学报), 2012, 31:109-111.
- 7 Zhou X, Zhang L, Mao C, et al. HPLC fingerprints research on decoction pieces of Citri Reticulatae Pericarpium based on chemometrics methods combined with orthogonal partial least square discriminate analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50:2194-2200.
- 8 A JY, He J, Sun RB. Multivariate statistical analysis for metabolomic data: the key points in principal component analysis [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2018, 53:929-937.
- 9 Hao JW, Chen ND, Chen CW, et al. Rapid quantification of polysaccharide and the main monosaccharides in *Dendrobium huoshanense* by near-infrared attenuated total reflectance spectroscopy [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 151:331-338.
- 10 Luo Y, Li WL, Qu HB. Research progress on method validation of near infrared spectroscopy in quantitative analysis [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2016, 41:3515-3519.
- 11 Tian W, Chen G, Zhang G, et al. Rapid determination of total phenolic content of whole wheat flour using near-infrared spectroscopy and chemometrics [J]. Food Chem, 2021, 344:128633.
- 12 Fan LH, Huang YL, Zhao R, et al. Geographical-origin discrimination and volatile oil quantitative analysis of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. with a portable near-infrared spectrometer [J]. Anal Methods, 2019, 11:5301-5310.
- 13 Xiong J, He L, Wei F, et al. Analysis and research of succession medicinal substances of cow-bezoar and cattle bile with infrared spectroscopy [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2021, 41:735-740.
- 14 Yuan D, Jin F, Yu SC, et al. FT-IR Spectroscopy in identification of bear biles and other animal biles [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2010, 12(1):30-32.
- 15 Sun H, Jin H, Hu Q, et al. Infrared spectroscopy combined with chemometrics for rapid determination of total flavonoids in *Dendrobium officinale* [J]. Spectrosc Spect Anal (光谱学与光谱分析), 2018, 38:1702-1707.
- 16 Faber NM, Rajkó R. How to avoid over-fitting in multivariate calibration--the conventional validation approach and an alternative [J]. Anal Chim Acta, 2007, 595(1-2):98-106.