

硫磺熏蒸的葛根横纵截面快速判别分析

吴志生^{1,2,3}, 杜敏^{1,2,3}, 潘晓宁^{1,2,3}, 赵娜^{1,2,3}, 史新元^{1,2,3*}, 乔延江^{1,2,3*}

- (1. 北京中医药大学, 北京 100102;
2. 国家中医药管理局中药信息工程重点研究室, 北京 100102;
3. 北京市中药基础与新药研究重点实验室, 北京 100102)

[摘要] 采用近红外光谱分析技术, 对不同硫磺熏蒸的葛根进行鉴别研究。将葛根饮片及其硫磺熏饮片进行横截面与纵截面原始光谱的采集, 并对原始光谱进行主成分分析(PCA), 采用随机法划分样本集, 进而比较不同预处理方法, 通过对样品不同截面光谱建立判别模型, 计算每个模型外部验证的识别率。采用正交性检验和非参数检验对数据进行正态性检验。结果表明不同截面由于结构不同所以吸光度不同, 并且对原始光谱进行主成分分析, 发现当主成分数为3时累计贡献率达到99.2%, MSC+1D+Savitzky-Golay预处理方法所建模型最好, 判别模型中横截面的50个模型, 其识别率为(94.4±0.66)%, 纵截面的识别率为(95.6±0.75)%, 总截面为(95.3±0.65)%, 3组识别率的差异并不大。对各组模型的预测性能进行差异性分析, 认为横截面、纵截面及总截面建模结果没有明显差异, 说明近红外光谱分析技术可以应用于中药材硫磺与否的快速鉴别。

[关键词] 葛根; 近红外; 硫磺; 判别

Rapid discriminant analysis of sulfur fumigated *Puerariae Lobatae* Radix based on vertical and horizontal surfaces

WU Zhi-sheng^{1,2,3}, DU Min^{1,2,3}, PAN Xiao-ming^{1,2,3}, ZHAO Na^{1,2,3}, SHI Xin-yuan^{1,2,3*}, QIAO Yan-jiang^{1,2,3*}

- (1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine-information Engineering of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
3. Beijing Key Laboratory for Basic and Development Research on Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] Near-infrared (NIR) was used as rapid analysis method to identify the sulfur fumigated *Puerariae Lobatae* Radix. NIR spectra of the cross-sectional and longitudinal selection of samples were acquired. Principal component analysis was conducted. The samples were randomly selected. The different pretreatment methods were compared. Discriminant models were established for every type of spectra to calculate the recognition rate. The orthogonal test and nonparametric test were used to test data normality. The result showed that absorbance values of different sections were different due to the different structure, and the raw spectra were analyzed by PCA method. The result founded that the cumulative contribution rate was arrived at 99.2% while the PC numbers were arrived at 3. The pretreatment method based on the MSC+1D+Savitzky-Golay was the best to establish the model. For the 50 models constructed with cross-section and longitudinal spectra and total spectra, the recognition rate were (94.4±0.66)%, (94.4±0.66)%, (95.3±0.65)%, respectively, and no difference was observed. The NIR method could be used to identify the sulfur fumigated *Puerariae Lobatae* Radix.

[Key words] *Puerariae Lobatae* Radix; NIR; sulfur fumigated; discriminant analysis

doi:10.4268/cjcm20151214

[收稿日期] 2014-09-18

[通信作者] * 乔延江, 教授, 研究方向为中药质量控制, Tel: (010) 84738621, E-mail: yjqiao@263.net; * 史新元, 教授, 研究方向为中药质量控制, Tel: (010) 84738621, E-mail: shixinyuan01@163.com

[作者简介] 吴志生, 讲师, 研究方向为中药质量控制, Tel: (010) 84738650, E-mail: wzs@bucm.edu.cn

• 2336 •

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根,其饮片呈纵切的长方形厚片或小方块,切面黄白色,质韧,纤维性强。硫磺熏蒸为葛根的常用加工工艺,在 1995 年版和 2000 年版《中国药典》中,葛根均是被收录的需要硫磺熏蒸的中药材^[1]。然而在中药材粗加工过程中由于滥用或者过度使用硫磺熏蒸会使二氧化硫残留超标,不仅破坏中药材的疗效^[2-3],而且还会对人造成胃肠功能紊乱、肺功能降低^[4]、肝脏损伤^[5]及免疫功能下降等一系列毒害作用。近些年人们深切认识到硫磺的危害性,2005 年版《中国药典》删除了所有药材硫磺的内容,国家食品药品监督管理局也于 2011 年组织制订了中药材及其饮片二氧化硫残留限量标准。

保证中药质量和安全有效关系到人们的切身利益,因此加强对硫磺的监控具有重要现实意义。近红外光谱技术具有分析速度快、无破坏性、灵活性及无需或很少进行样品处理等优点而广泛应用于固体样品的质量分析,涉及制药、农业、烟草、食品和水果等诸多领域^[6-7]。在中药领域,近红外光谱法主要应用于中药原料药的质量控制、生产过程控制及最终制剂的质量控制^[8-9]。对流通环节中硫磺中药材的鉴别具有其独特优势。

因此,本文以硫磺熏蒸的葛根的判别为研究对象,考察样品表面近红外光谱应用到硫磺药材鉴别中的可靠性和有效性。

1 材料

光谱仪器为 Antaris I 傅里叶变换近红外漫反射光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司),配备 RESULT 3.0 光谱采集软件。葛根药材(购自河北安国);委托当地种植户对同一批葛根药材采用 2 种不同的干燥方法:将药材仔细挖出后,用清水洗净泥土,除去芦头、尾梢、细须,刮去粗皮,趁鲜切成小方块,然后自然晒干;首先用硫磺熏 2~3 夜,晒或烘到六成干,然后切成小方块。所有药材经北京中医药大学刘春生教授鉴定为豆科植物野葛 *P. lobata* 的干燥根。

2 方法

2.1 近红外漫反射光谱的采集方法 采集模式为积分球漫反射;累积扫描次数为 64 次;分辨率 8 cm^{-1} 。光谱范围 $1\text{ 万} \sim 4\text{ 000 cm}^{-1}$,共 1 557 个变量。从葛根饮片及其硫磺熏蒸片中各随机选取 30 个样本,按照上述条件进行近红外光谱的采集。每个饮片分别于其横截面和纵截面各采集一点,每点 3

条光谱。

2.2 数据处理与分析 数据预处理与建模采用 TQ Analyst 8.4(美国 Thermo Nicolet 公司)。采用判别分析法(discriminate Analysis, DA)建立定性判别模型,并以识别率为评价指标。

3 结果与讨论

3.1 不同硫磺熏蒸葛根的原始近红外光谱 不同硫磺熏蒸的葛根横截面与纵截面平均化(总截面)的原始光谱图见图 1。虽然硫磺熏蒸导致葛根化学成分发生了改变,但肉眼观察原始光谱图,未体现这种明显差异。同一葛根样品横截面与纵截面的光谱见图 2,横截面的吸光度略大于纵截面,这主要是由于不同截面的结构有所不同,因而近红外光与样品的相互作用有所差异,导致不同截面的吸光度不同。

3.2 不同硫磺熏蒸葛根的光谱主成分分析 首先对原始光谱进行主成分分析,观察各类样本在主成分空间的分布情况,见图 3。当主成分数为 3 时,累积贡献率达到 99.2%,即前 3 个主成分可表征原变量 99.2% 的信息。前 3 个主成分得分图见图 4,硫磺熏蒸葛根与未熏蒸葛根很明显的分为 2 类,这表明尽管不同饮片的厚度不同会带来光程差异,但是近红外光谱仍能提取出用以区分样本的有效的化学信息。

红色代表硫磺熏蒸的葛根原始光谱主成分得分;蓝色代表无硫磺熏蒸的葛根原始光谱主成分得分。

3.3 光谱预处理方法的选择 将每个样本横截面与纵截面的 6 条光谱求取平均,从硫磺样本和未熏样本中随机抽取 2/3(共 40 个样本)作为校正集,剩余样本作为验证集(共 20 个样本),采用判别分析法建立 DA 模型。预处理方法的考察结果见表 1,综合模型对校正集与预测集的预测结果表明,MSC + 1D + SG 为最佳的光谱预处理方法,并应用于后续建模。

3.4 不同光谱采集面的对比 由样品的原始光谱可知,样品不同截面的近红外光谱有较大差异,这可能会对模型性能有一定影响。因此为对比样品不同截面光谱的建模结果,本文将样本集多次重复划分进行多次建模与预测。从硫磺样本和未熏样本中随机抽取 2/3(共 40 个样本)作为校正集,剩余样本作为验证集(共 20 个样本),按照此法每个截面及总截面(横截面 + 纵截面的平均光谱)分别建立 50 个判别模型,计算每个模型外部验证的识别率,并利用箱式图对其进行描述性分析,见图 5。

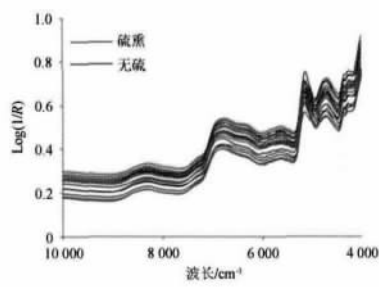


图1 不同硫磺熏蒸葛根总截面的原始光谱图
Fig. 1 The average NIR spectra of total selection of Puerariae Lobatae Radix

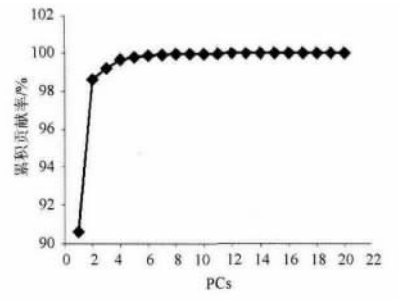


图3 光谱累计贡献率随主成分数变化图
Fig. 3 Cumulative contribution rate vs. PCs number

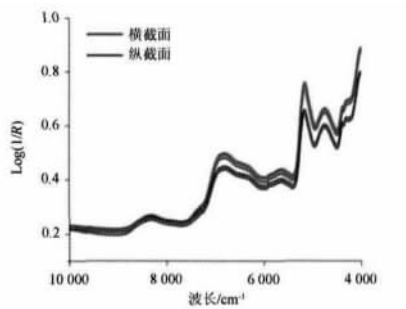


图2 葛根横截面与纵截面的近红外光谱图
Fig. 2 The NIR spectra of cross-sectional and longitudinal section of Puerariae Lobatae Radix

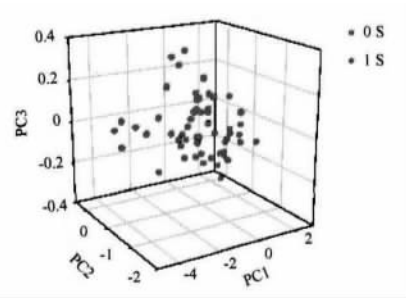


图4 不同硫磺熏蒸葛根原始光谱的主成分得分图
Fig. 4 PC score of NIR spectra of Puerariae Lobatae Radix

表1 不同光谱预处理方式下 DA 模型的判正率

Table 1 The recognition rate of DA models using different pretreatment methods

预处理方法	校正结果			验证结果		
	识别率/%	硫熏判错数	未熏判错数	识别率/%	硫熏判错数	未熏判错数
无处理	95	1	1	85	2	1
MSC	95	1	1	90	2	0
SNV	97.5	1	0	90	2	0
1D + SG	95	1	1	90	1	1
2D + SG	92.5	2	1	75	4	1
MSC + 1D + SG	95	1	1	95	0	1
MSC + 2D + SG	97.5	0	1	90	1	1

注:主成分数为6。

对于横截面的50个模型,其识别率为(94.4 ± 0.66)% 纵截面的识别率为(95.6 ± 0.75)% 总截面为(95.3 ± 0.65)%。3组识别率的差异并不大,本文进一步采用SPSS 16.0软件对各组模型的预测性能进行差异性分析。

首先检验每组数据的正态性见表2,结果显示各组的P = 0 < 0.05,不服从正态分布,因此采用非参数检验,这里选用Mann-Whitney U检验法。双侧P = 0.256 > 0.05,见表3,按α = 0.05水准认为各总

体分布相同,不能认为横截面、纵截面及总截面建模结果不同。结果表明,虽然横截面和纵截面的光谱差异,但是光谱预处理消除了横截面和纵截面的建模结果差异,可任意一个截面进行硫磺熏蒸的葛根快速判别分析。

4 结论

本研究分别采集了葛根饮片横截面和纵截面的光谱,采用判别分析法进行硫熏与否的鉴别。结果表明样品的原始光谱显示出横截面与纵截面的近红

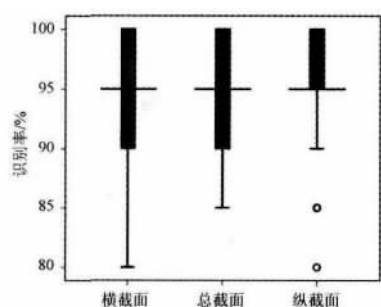


图5 不同截面葛根的建模结果

Fig. 5 The recognition rate of DA models using different selection of Puerariae Lobatae Radix

表2 横纵截面及总截面建模的正态性检验

Table 2 Normality test result of DA models using cross-section and longitudinal spectra and total spectra

组别	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
横截面	0.271	50	0.000	0.854	50	0.000
纵截面	0.276	50	0.000	0.791	50	0.000
总截面	0.228	50	0.000	0.834	50	0.000

表3 横纵截面及总截面建模的非参检验

Table 3 Nonparametric test result of DA models using cross-section and longitudinal spectra and total spectra

统计量	识别率
Chi-Square	2.726
df	2
Asymp. Sig.	0.256

外光谱有一定差异,进一步采用箱式图及非参数检

验对不同截面的判别模型及样品总光谱的判别模型进行了差异性分析。结果表明,虽然横截面和纵截面的光谱差异,但是光谱预处理消除了横截面和纵截面的建模结果差异,所建模型能实现硫熏药材准确鉴别,其中样品总光谱所建模型的识别率为 $(95.3 \pm 0.65)\%$ 。研究结果还表明采用样品表面近红外光谱进行硫熏药材的鉴别仍是可靠且有效的。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010.
- [2] 陆兔林,单鑫,李林,等. 中药材硫磺熏蒸及其现代加工技术研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15):2791.
- [3] 卢晓琳,马逾英,张福卓,等. 不同硫磺熏蒸程度白芷二氧化硫残留量与有效成分含量的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9):139.
- [4] 杨智海,宋莉,乔蓉霞,等. 中药外源性有害残留物二氧化硫的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(11): 2246.
- [5] 白剑英,孟紫强. 二氧化硫对肝脏组织学结构的影响[J]. 中华病理学杂志, 2004, 33(2): 155.
- [6] Luyckaert J, Massart D L, Vander Heyden Y. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis [J]. Talanta, 2007, 72(3): 865.
- [7] Stefke B, Windeisen E, Schwanninger M, et al. Determination of the weight percentage gain and of the acetyl group content of acetylated wood by means of different infrared spectroscopic methods [J]. Anal Chem, 2008, 80(4): 1272.
- [8] Wu Z, Xu B, Du M, et al. Validation of a NIR quantification method for the determination of chlorogenic acid in *Lonicera japonica* solution in ethanol precipitation process [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 62: 1.
- [9] Wu Z, Sui C, Xu B, et al. Multivariate detection limits of on-line NIR model for extraction process of chlorogenic acid from *Lonicera japonica* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 77: 16.

[责任编辑 马超一]