

淫羊藿水分和灰分的近红外快速检测

陈 乐, 张华峰*, 郝 淼, 牛丽丽

陕西师范大学食品工程与营养科学学院 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西 西安 710062

摘 要: **目的** 建立基于近红外漫反射光谱的淫羊藿 *Epimedium Herba* 水分、灰分快速检测新方法, 调查我国市售淫羊藿药材的水分、灰分量。**方法** 采用标准正常化+去散射处理 (SNV+D) 进行散射校正, 采用主成分分析 (PCA) 进行聚类分析, 采用“2, 4, 4, 1”方式进行数学处理, 采用改进偏最小二乘法进行回归分析。**结果** 建立的淫羊藿药材水分与灰分近红外定标模型预测效果较好, 稳定性较高, 水分与灰分的定标决定系数分别为 0.884 3、0.938 7, 交叉验证相关系数分别为 0.800 9、0.851 9, 预测相关系数达到了 0.9, 剩余预测差超过了 3.0。采用近红外分析方法首次测得我国市售淫羊藿药材水分合格率为 100%, 灰分合格率为 82%。**结论** 近红外分析方法具有快捷、精确、无损等优点, 在淫羊藿药材质量控制中具有参考意义。

关键词: 近红外光谱; 淫羊藿; 水分; 灰分; 定标模型

中图分类号: R286.0

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)09-1368-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.020

Rapid detection of moisture and ash content in *Epimedium Herba* using near-infrared spectroscopy

CHEN Le, ZHANG Hua-feng, HAO Miao, NIU Li-li

Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Resources Development of Endangered Crude Drugs in Northwest China, College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: **Objective** To establish a novel method based on near-infrared reflectance spectroscopy for fast detection of water and ash in *Epimedium Herba*, and to investigate moisture and ash content in *Epimedium Herba* samples from the Chinese markets by near-infrared spectroscopy. **Methods** The best calibration model was under the following conditions: standard normal variant and detrending for scatter correction, principal components analysis for cluster analysis, “2, 4, 4, 1” approach for mathematic treatment, and modified partial least square for regression analysis. **Results** The proposed calibration model of water and ash based on near-infrared spectroscopy possessed satisfactory precision, accuracy, and stability. Coefficient of determination for calibration and 1 minus variance ratio of water and ash were 0.884 3, 0.800 9, and 0.938 7, 0.851 9, respectively. Correlation coefficient of prediction reached 0.9 and residual predictive deviation exceeded 3.0. The contents of water and ash in *Epimedium Herba* samples from the Chinese markets were measured by near-infrared spectroscopy for the first time. And 100% and 82% of *Epimedium Herba* samples meet the criterion in the *Chinese Pharmacopoeia*. **Conclusion** The developed quantitatively analytical method based upon near-infrared spectroscopy is proved to be a rapid, precise, accurate, and non-destructive alternative to the conventional technique. And it shows the great potential in quality control of *Epimedium Herba*.

Key words: near-infrared spectroscopy; *Epimedium Herba*; water; ash; calibration model

淫羊藿 *Epimedium Herba* 是我国著名的药用植物, 始载于《神农本草经》, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿等功效, 在食品、医药工业中具有广泛用途。

目前, 淫羊藿药材主要依靠野外采摘, 采摘时期与地点、品种与居群以及贮存方式等对市售淫羊藿药材品质的影响很大^[1-3]。淫羊藿质量控制方法研究是

收稿日期: 2014-08-24

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (GK201503002); 陕西省科技合作计划项目 (2014SJ-01); 大学生创新创业训练计划项目

作者简介: 陈 乐 (1989—), 女, 陕西铜川人, 硕士研究生, 研究方向为中药材质量控制。Tel: (029)85310517 E-mail: chenyeule@yeah.net

*通信作者 张华峰, 博士, 副教授, 硕士生导师, 教研室主任, 从事药用植物资源开发与利用研究。

Tel: (029)85310517 E-mail: isaacsau@sohu.com

中药现代化领域的重要课题之一^[4]。《中国药典》2010年版规定,淫羊藿药材水分不得超过12.0%,灰分量不得超过8.0%,水分、灰分测定分别采用烘干法、坩埚法^[5]。烘干法操作简单,无需使用昂贵仪器,但是耗时较长(约5 h),不适于在线快速检测;坩埚法也存在耗时较长(约6 h)等问题,并且检测过程需要消耗样品,存在高温烫伤等安全隐患。近红外光谱技术是近年发展起来的中药材质量控制新方法,具有快捷、精确、无损、环境友好等优点,已广泛用于中药材活性成分检测^[6]。本实验室建立了淫羊藿总黄酮与蛋白质的近红外定量分析方法^[7-8],于晓雪等^[9]建立了淫羊藿中淫羊藿苷与朝藿定C的测定方法。但是迄今未见采用近红外光谱技术检测淫羊藿药材水分和灰分的报道。本实验拟建立一种基于近红外漫反射光谱技术的淫羊藿药材水分和灰分快速检测新方法,并运用该方法首次测定我国27个省份药材市场上淫羊藿中水分和灰分的量,以期为淫羊藿药材质量控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 药材与仪器

从全国27个省、自治区、直辖市采摘、购买了168个淫羊藿药材样品,经陕西师范大学张华峰副教授鉴定均为淫羊藿属 *Epimedium* L. 植物淫羊藿 *Epimedium sagittatum* L.。药材粉碎后过80目筛,密封备用。

InfraXact 型多功能近红外分析仪(瑞典 FOSS 公司),BS224S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),GZX-9146MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司),SX2-4-10 箱式电阻马弗炉(天津市中环实验电炉有限公司),KSW-5-12 电炉温度控制器(天津市中环实验电炉有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 水分测定方法 采用《中国药典》2010年版(一部)附录 IX H 第一种方法(烘干法)测定淫羊藿药材的含水量^[5]。

1.2.2 灰分量测定方法 采用《中国药典》2010年(一部)附录 IX K 方法(坩埚法)测定淫羊藿药材的灰分量^[5]。

1.3 近红外分析方法

1.3.1 光谱采集 利用多功能近红外分析仪对淫羊藿样品进行光谱扫描,使用硅(570~1 100 nm)和铟镓砷(1 100~1 850 nm)检测器,扫描谱区范围为570~1 848 nm。扫描前先预热仪器1 h,自检通

过后开始使用。扫描过程中保持室温25℃左右,并严格控制室内湿度。将淫羊藿粉末样品置于固体杯中进行光谱扫描,数据采集频率为3 s/次,光谱数据间隔为2 nm,每个样品重复扫描3次,取平均值。通过多功能近红外分析仪自带的 ISIscan 软件获取淫羊藿光谱数据,利用 WinISI III 软件分析光谱数据。

1.3.2 异常样本剔除与样本集划分 采用主成分分析(principal components analysis, PCA)法对淫羊藿样品光谱进行聚类分析,即利用光谱文件扫描数据计算打分,统计各样品间的差异。采用马氏距离方法剔除异常样本,马氏距离大于3.0的样本判定为异常。剩余样本按比例分成定标集和验证集。

1.3.3 定标模型建立与验证 首先采用标准正常化+去散射处理(standard normal variant and detrending, SNV+D)方法对原始光谱进行预处理。然后进行数学处理,数学处理方式包括导数处理、导数处理数据间隔点数、平滑处理间隔点数、二次平滑处理间隔点数4个方面。而后进行回归分析,回归分析方法包括主成分回归法(principle component regression, PCR)、偏最小二乘法(partial least square, PLS)、改进偏最小二乘法(modified partial least square, MPLS)与多元线性回归法(multi-linear regression, MLR)。最后,采用标准差(S.D.)、定标标准差(standard error of calibration, SEC)、交互验证标准差(standard error of cross-validation, SECV)、定标决定系数(coefficient of determination for calibration, RSQ)和交互验证相关系数(1 minus variance ratio, 1-VR)等评价定标模型的优劣。

模型建好后,用未参与定标的验证样本对其进行检验,通过预测相关系数(R^2)、偏差(bias)、剩余预测差(residual predictive deviation, RPD)和预测标准差(standard error of prediction, SEP)等参数进一步考察模型预测的准确性和稳定性。

1.3.4 样品测定 使用多功能近红外分析仪扫描淫羊藿样品的近红外光谱,利用软件将光谱数据带入定标方程即可计算出水分、灰分量。每个样品设2~3个重复。

2 结果与分析

2.1 近红外光谱的采集与预处理

光谱扫描发现,淫羊藿近红外原始光谱的基线严重漂移,难以找到理想的特征吸收峰(图1)。经

过 SNV+D、二阶导数处理、平滑处理和二次平滑处理后,基线漂移明显减弱,光谱分辨率也明显提高(图 2)。当波长在 600~650、1 205~1 215、1 720~1 830 nm 时,光谱值与水分、灰分量的相关性较高(图 3),因此选择全光谱进行建模。

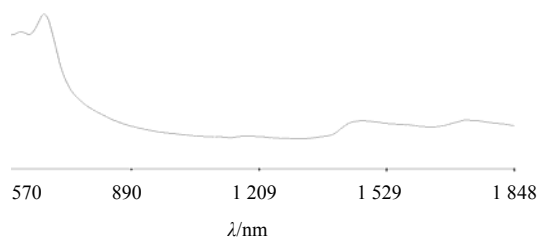


图 1 淫羊藿典型近红外原始光谱图

Fig. 1 Typical near-infrared spectrogram of *Epimedii Herba*

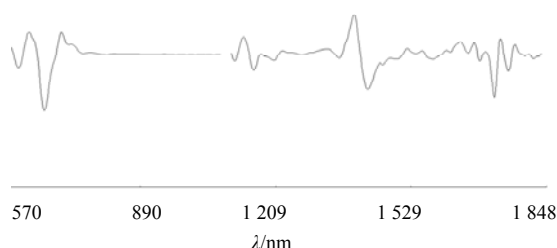


图 2 淫羊藿典型预处理后近红外光谱图

Fig. 2 Typical near-infrared spectrogram of *Epimedii Herba* after pretreatment

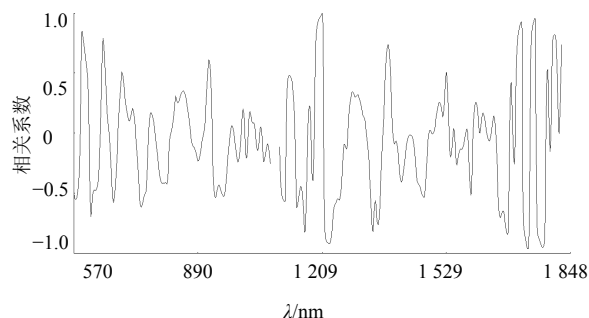


图 3 淫羊藿样品水分、灰分量与光谱值的相关性

Fig. 3 Correlation coefficient between contents of water and ash and spectra values for the second derivative transformation

2.2 样品集的筛选与划分

运用药典分析方法测定了 130 个淫羊藿样本的水分、灰分量(表 1),并进行了近红外漫反射光谱扫描。经过 PCA 聚类分析后,按照马氏距离为 3.0 的要求剔除了 5 个异常样本,余下的 125 个样本按一定比例划分成定标集和验证集(表 1)。由表 1 可以看出,定标集、验证集数据分散程度较高、代表性较强,验证集样本水分、灰分量的平均值、标准差与定标集也很接近,说明验证集设置较为合理,能够用于定标方程的验证。

2.3 近红外定标模型的建立

2.3.1 数学处理方式的确定 通常 RSQ 和 1-VR 被看作是评价近红外定标模型优劣的重要参数^[7,10]。其中,RSQ 表示定标模型对定标集变异所能描述的百分率,RSQ 越高说明定标集样品量变化被解释的百分率越高;1-VR 表示交叉验证过程中定标模型对定标集变异所能描述的百分率,1-VR 越高说明交叉验证过程中定标集样品量变化被解释的百分率越高。由表 2 可知,当数学处理方式为“2, 4, 4, 1”时,淫羊藿药材水分和灰分定标模型的 RSQ、1-VR 最大,分别为 0.884 3、0.800 9 和 0.938 7、0.851 9,同时 SEC、SECV 较小,因此将数学处理方式确定为“2, 4, 4, 1”,即导数处理采用二阶导数处理,导数处理数据间隔为 4,平滑处理间隔为 4,二次平滑处理间隔为 1。

2.3.2 回归分析方法的确定 由表 3 可知,当回归分析方法为 MPLS 时,淫羊藿药材水分、灰分定标模型的 RSQ 和 1-VR 均分别高于回归分析方法为 PCR、PLS、MLR 的 RSQ 和 1-VR,因此选择 MPLS 作为最终的回归分析方法。

2.4 近红外定标模型的外部验证

当光谱散射处理方式为 SNV+D、聚类分析方式为 PCA、数学处理方式为“2, 4, 4, 1”、回归分析方法为 MPLS 时,淫羊藿药材水分、灰分定标模型的定标效果最好。为了进一步评价定标模型的预测能力和稳定性,利用验证集对定标模型进行了外部验证。

表 1 定标集和验证集中淫羊藿样品水分和灰分量

Table 1 Water and ash contents in *Epimedii Herba* in calibration and validation set

数据集	水分				灰分			
	样品数	范围/%	均值/%	标准差	样品数	范围/%	均值/%	标准差
全集	130	3.844 0~8.566 4	6.859 7	0.961 6	130	3.330 3~14.025 1	7.218 9	1.764 2
定标集	105	4.679 7~8.566 4	6.871 3	0.807 8	100	3.330 3~14.025 1	7.150 2	1.713 2
验证集	20	5.486 0~8.520 9	7.459 2	0.801 4	25	4.397 4~13.333 7	7.448 0	1.937 7

图 4 为淫羊藿样品水分、灰分药典分析值与近红外预测值的散点分布图,图 4 中红色虚线表示限制线,超出红色虚线以外的点属于超常样品,可以看出水分、灰分的预测值均在红色虚线范围内,说明不存在超常样品;黑色实线表示回归线,可以看出水分、灰分的预测值均在回归线附近,说明近红外预测值与药

表 2 不同数学处理方式对淫羊藿水分和灰分定标模型的影响

Table 2 Effects of mathematic treatments of spectra data on calibration model of ash and water in *Epimedii Herba*

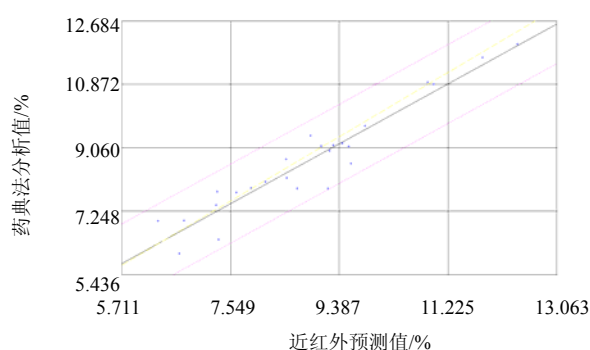
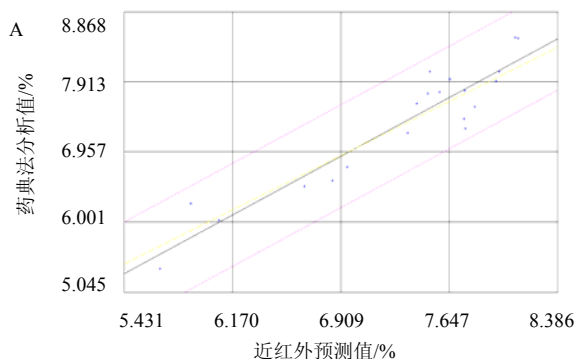
成分	数学处理方式	范围/%	S.D.	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RPD
灰分	0, 0, 1, 1	4.234 1~13.173 9	1.490 0	0.922 3	0.616 8	0.748 0	0.427 2	1.992 0
	1, 4, 4, 1	4.270 6~13.128 7	1.476 3	0.529 7	0.871 3	0.375 9	0.733 4	3.927 4
	1, 8, 8, 1	4.270 6~13.128 7	1.476 3	0.561 1	0.855 6	0.370 7	0.737 0	3.982 5
	2, 4, 4, 1	3.981 7~13.762 8	1.630 2	0.403 6	0.938 7	0.524 3	0.851 9	3.109 3
	2, 8, 8, 1	3.967 0~13.723 1	1.626 0	0.571 6	0.876 4	0.534 9	0.678 2	3.039 8
水分	0, 0, 1, 1	4.779 1~9.266 1	0.747 8	0.363 0	0.764 4	0.303 2	0.713 8	2.466 4
	1, 4, 4, 1	4.674 4~9.320 7	0.774 4	0.295 0	0.854 9	0.239 8	0.809 9	3.229 4
	1, 8, 8, 1	4.674 4~9.320 7	0.774 4	0.306 2	0.843 7	0.254 8	0.792 7	3.039 2
	2, 4, 4, 1	4.685 0~9.319 6	0.772 4	0.262 8	0.884 3	0.247 4	0.800 9	3.122 1
	2, 8, 8, 1	4.682 0~9.331 4	0.774 9	0.282 2	0.867 4	0.248 8	0.800 9	3.114 5

RPD = S.D./SECV

表 3 不同回归分析方法对淫羊藿水分和灰分定标模型的影响

Table 3 Effects of different regression methods on calibration model of ash and water in *Epimedii Herba*

成分	回归分析方法	范围/%	S.D.	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RPD
灰分	PCR	4.234 1~13.173 9	1.626 0	1.627 5	0.001 8	0.751 2	0.229 1	2.164 5
	PLS	4.270 6~12.128 7	1.726 0	0.825 7	0.771 1	0.774 3	0.655 3	2.229 1
	MPLS	3.981 7~13.762 8	1.630 2	0.403 6	0.938 7	0.524 3	0.851 9	3.109 3
	MLR	3.967 0~13.723 1	1.726 0	0.801 5	0.784 4	0.563 8	0.844 7	3.061 4
水分	PCR	4.687 9~9.308 0	0.770 0	0.493 9	0.588 6	0.408 8	0.569 7	1.883 6
	PLS	4.686 6~9.328 2	0.773 9	0.282 8	0.866 5	0.251 8	0.795 5	3.073 5
	MPLS	4.685 0~9.319 6	0.772 4	0.262 8	0.884 3	0.247 4	0.800 9	3.122 1
	MLR	4.687 9~9.308 0	0.770 0	0.337 4	0.808 0	0.253 6	0.787 1	3.036 3



黑色线、黄色线和红色线分别表示回归线、45°线和限制线
Black, yellow, and red lines represent regression curve, 45° line and limit line, respectively

图 4 淫羊藿水分 (A) 和灰分 (B) 近红外定标模型的外部验证散点图

Fig. 4 Scatter plots for water (A) and ash (B) in validation set of *Epimedii Herba*

典法分析值之间存在较好的线性关系。通常,当预测相关系数 $R^2 > 0.8$ 时,近红外定标方程即可满足实际样品检测的需求;当 $RPD > 3.0$ 时,定标模型的稳定性和实际预测能力较好^[11-12]。淫羊藿药材水分、灰分定标方程的 $R^2 = 0.9$, $RPD > 3.0$, 并且 SEP 较小,说明所建模型的预测精确度较高,稳定性较好。通常,灰分等无机成分在近红外区并没有特征光谱,不能运用近红外技术直接定量分析。但是,灰分常常与酶(如超氧化物歧化酶)等有机成分之间存在一定的相关性,利用这种相关性可以间接定量测定灰分的量^[13]。本研究建立的近红外分析方法适用于淫羊藿药材灰分、水分的快速检测。

2.5 样品测定

采用该方法测定了来自我国 27 个省、自治区、直辖市的 38 份淫羊藿样品中水分、灰分的量。由表 4 可知,我国市售淫羊藿药材中水分、灰分量的平均值分别为 6.645 7%、7.145 7%,均低于《中国药典》2010 年版规定的上限。不同地区淫羊藿样品水分、灰分量的差异较大,全距分别为 4.423 0%、8.838 0%,变异系数分别为 17.54%、27.50%。由图 5 可见,市售淫羊藿药材的水分合格率高达 100%,但灰分合格率为 82%,提示近 2 成淫羊藿药材中杂质较多,对药材质量造成一定影响。

表 4 不同地区市售淫羊藿样品水分和灰分的近红外检测

Table 4 Determination of contents of water and ash in *Epimedii Herba* from Chinese markets by near-infrared spectroscopy

地区	水分/%	灰分/%	地区	水分/%	灰分/%
江西赣州	6.382 0	7.532 0	山西太原	7.159 0	6.755 0
黑龙江哈尔滨	5.953 0	5.295 0	福建三明	7.221 0	6.611 0
新疆哈密	5.240 0	12.394 0	广东深圳	7.419 0	5.711 0
北京	5.463 0	6.313 0	山东枣庄	7.923 0	11.804 0
江苏南京	6.233 0	7.161 0	湖北武汉	6.846 0	7.240 0
四川成都	5.485 0	6.683 0	甘肃兰州	7.300 0	6.247 0
云南昆明	7.182 0	4.624 0	陕西宝鸡	5.374 0	5.498 0
浙江杭州	6.884 0	7.572 0	陕西汉中	6.609 0	7.919 0
广东东莞	7.257 0	6.684 0	陕西安康	4.382 0	6.305 0
山东滨州	7.216 0	10.223 0	陕西榆林	6.973 0	8.286 0
山西忻州	6.982 0	6.604 0	广西柳州	6.538 0	6.425 0
甘肃武威	3.950 0	11.132 0	安徽阜阳	7.845 0	3.556 0
内蒙古呼和浩特	6.422 0	4.037 0	上海	7.448 0	6.990 0
宁夏吴忠	4.482 0	8.181 0	河南安阳	7.727 0	5.427 0
江苏如皋	7.388 0	7.532 0	天津	4.670 0	6.949 0
辽宁丹东	4.653 0	6.178 0	陕西西安	7.334 0	7.345 0
湖南邵阳	7.474 0	5.789 0	海南海口	7.017 0	7.655 0
青海西宁	8.366 0	10.874 0	陕西渭南	8.373 0	5.377 0
河北新乐	7.215 0	7.898 0	陕西咸阳	8.153 0	6.730 0

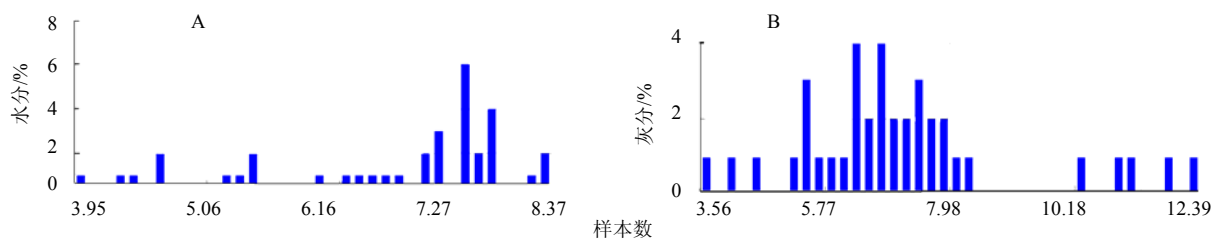


图 5 市售淫羊藿样品水分 (A) 和灰分 (B) 量分布

Fig. 5 Determination of contents of water and ash contents in *Epimedii Herba* from Chinese markets

3 讨论

本研究建立的近红外漫反射光谱分析新方法能够成功用于淫羊藿药材水分、灰分的快速检测。采

用近红外分析方法测得我国市售淫羊藿药材的水分合格率为 100%,灰分合格率为 82%。当光谱散射处理方式 SNV+D、聚类分析方式为 PCA、数学

处理方式“2, 4, 4, 1”、回归分析方法为 MPLS 时, 建立的定标模型效果最佳。定标模型建好后, 淫羊藿样品中水分、灰分的检测只需光谱扫描和软件分析 2 步即可完成, 耗时仅有 3~5 min, 比常规的《中国药典》方法(烘干法、坩埚法)测定效率提高了 60 多倍。此外, 近红外分析方法测定结果准确, 方法稳定性较高, 检测过程不会消耗淫羊藿样品, 在淫羊藿药材质量控制中具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] Zhang H F, Yang X H. Asian medicine: protect rare plants [J]. *Nature*, 2012, 482(7383): 35.
- [2] 张华峰, 杨晓华. 淫羊藿药材质量控制的问题与对策 [J]. *中草药*, 2009, 40(1): 160-163.
- [3] Zhang H F, Niu L L, Yang X H, *et al.* Analysis of water-soluble polysaccharides in an edible medicinal plant *Epimedium*: method development, validation and application [J]. *J Aoac Inter*, 2014, 97(3): 784-790.
- [4] Pei L K, Sun S Q, Guo B L, *et al.* Fast quality control of *Herba Epimedii* by using Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2008, 70(2): 258-264.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] Lu H Y, Wang S S, Cai R, *et al.* Rapid discrimination and quantification of alkaloids in *Corydalis Tuber* by near-infrared spectroscopy [J]. *J Pharm Biol Anal*, 2012, 59(2): 44-49.
- [7] 薛耀碧, 张华峰, 杨晓华, 等. 近红外漫反射光谱法快速测定药用植物淫羊藿总黄酮含量 [J]. *植物学报*, 2013, 48(1): 65-71.
- [8] 牛丽丽, 张华峰, 陈 乐, 等. 基于近红外漫反射光谱法快速测定淫羊藿蛋白质的含量 [J]. *植物学报*, 2014, 49(5): 11-14.
- [9] 于晓雪, 乙 引, 周 宁, 等. 近红外光谱法快速测定淫羊藿中淫羊藿苷和朝藿 C [J]. *光谱实验室*, 2012, 29(3): 1379-1383.
- [10] Zhang B, Rong Z Q, Shi Y, *et al.* Prediction of the amino acid composition in brown rice using different sample status by near-infrared reflectance spectroscopy [J]. *Food Chem*, 2011, 127(1): 275-281.
- [11] Williams P C, Sobering D C. Comparison of commercial near-infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds [J]. *J Near-infrared Spectrosc*, 1993, 1(1): 25-32.
- [12] Sirisomboon P, Tanaka M, Kojima T, *et al.* Nondestructive estimation of maturity and textural properties on tomato “Momotaro” by near infrared spectroscopy [J]. *J Food Engin*, 2012, 112(3): 218-226.
- [13] Milica P, Jasna M, Dragan P, *et al.* The development of near-infrared spectroscopy (NIRS) calibration for prediction of ash content in legumes on the basis of two different reference methods [J]. *Food Chem*, 2010, 123(3): 800-805.