

引用本文:钟红,骆勇,石志强,等.便携式近红外光谱仪的僵蚕快速检验应用研究[J].安徽医药,2022,26(12): 2399-2402.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.12.014.



◇ 药物分析 ◇

便携式近红外光谱仪的僵蚕快速检验应用研究

钟红,骆勇,石志强,钟家琼,王蛟龙,吴丙滔,欧家林,于娅,彭长恩

作者单位:成都市郫都区中医医院中药房,四川 成都611730

通信作者:彭长恩,男,副主任中医师,研究方向为中医皮肤病专业,Email:mikepen@qq.com

基金项目:四川省重大科技专项课题(2018TZDZX0007)

摘要: **目的** 通过便携式近红外光谱仪建立快速判别僵蚕产地以及快速鉴别僵蚕与麸炒僵蚕的方法。**方法** 2021年2—3月,搜集84批不同产地僵蚕及24批麸炒僵蚕样本,采用便携式近红外光谱仪采集样本光谱,在无监督的主成分分析(PCA)基础上,利用线性判别分析(LDA)模式识别方法并结合不同光谱预处理方法分别对僵蚕产地以及僵蚕、麸炒僵蚕建立定性分析模型。**结果** 对光谱进行平滑预处理后建立的模型可对僵蚕3个产地实现准确区分,校正集与验证集的判别准确率分别达到98.41%与90.48%;在建立的僵蚕及麸炒僵蚕鉴别模型中,所有光谱预处理方法建立的定性模型校正集与验证集判别准确率均达到了100.00%,可对僵蚕炮制与否正确识别。**结论** 便携式近红外光谱仪结合化学计量学方法能实时、准确鉴别僵蚕产地及其炮制品,对于僵蚕药材现场质量评价具有重要意义。

关键词: 蚕属; 主成分分析; 谱学,近红外线; 微量化学; 产地; 炮制品; 定性分析; 化学计量学

Application of portable near-infrared spectrometer in rapid detection of Bombyx Batryticatus

ZHONG Hong,LUO Yong,SHI Zhiqiang,ZHONG Jiaqiong,WANG Jiaolong,

WU Bingtao,OU Jialin,YU Ya,PENG Changen

Author Affiliation: Chengdu Pidou District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611730, China

Abstract: **Objective** To establish the method of fast identification of the origin of Bombyx Batryticatus and fast identification of the Bombyx Batryticatus and Bombyx Batryticatus Stir-fried with bran by portable near-infrared (NIR) spectrometer.**Methods** From February to March, 2021, 84 batches of Bombyx Batryticatus samples from different producing areas and 24 batches of Bombyx Batryticatus Stir-fried samples with Bran were collected, spectra of samples were collected by a portable NIR spectrometer. On the basis of unsupervised principal component analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA) pattern recognition method combined with different spectral pretreatment methods were used to establish qualitative analysis models for the origins, the Bombyx Batryticatus and the Bombyx Batryticatus Stir-fried with Bran.**Results** The model established after smoothing pretreatment of the spectrum can accurately distinguish the three origins of the Bombyx Batryticatus, the discriminant accuracy of calibration set and validation set reached 98.41% and 90.48%, respectively; In the model of Bombyx Batryticatus and Bombyx Batryticatus Stir-fried with Bran, the discriminant accuracy of calibration set and validation set in the qualitative model established by all spectral pretreatment methods reached 100.00%, which could correctly identify the processing of Bombyx Batryticatus.**Conclusion** The portable NIR spectrometer combined with stoichiometry can be used to identify the origin and processed products of Bombyx Batryticatus in real time and accurately, which is of practical significance for the quality evaluation of Bombyx Batryticatus medicinal materials.

Key words: Bombyx; Principal component analysis; Spectroscopy, near-infrared; Microchemistry; Origin; Processed products; Qualitative analysis; Stoichiometry

僵蚕为蚕蛾科昆虫家蚕4~5龄的幼虫感染(或人工接种)白僵菌而致死的干燥体,其主产于我国四川、江苏、浙江、广东、广西等地^[1]。僵蚕是中国、日本、韩国等国的传统动物药,临床上广泛用于治疗惊厥、癫痫、咳嗽、哮喘、头痛、皮肤瘙痒等多种病症^[2-3]。僵蚕生品气味、药性较强,临床用药多选用僵蚕炮制品麸炒僵蚕,其具有祛风解痉、化痰散结的功效^[4]。僵蚕作为常用动物药之一,有研究对

部分中医院饮片使用量进行了调查,其中僵蚕的用药量在动物类饮片中名列前茅^[5]。由于其市场需求量逐年增加,市场上药材正伪品混杂,生品与制品共存,不同产地药材质量与疗效也具有一定差异。其中,僵蚕养殖的环境饰变作为其品质影响要素之一显得尤为重要,其中的气候因素、生物因子均对药材品种具有较强影响作用^[6]。此外,僵蚕的麸炒炮制方法也经现代研究证实了其科学性与合理性,

经过麸炒后的僵蚕蛋白质含量下降,黄曲霉素已被去除,达到了缓和药性,增加用药安全性的目的^[7]。目前常用现代分析技术如高效液相色谱法(HPLC)等方法测定僵蚕中草酸铵、白僵菌素以及醇溶性浸出物等成分含量,以此完成僵蚕药材品质评价,上述方法虽然检测准确度高,但耗时长,预处理复杂,不适用于药材的现场快速分析^[8-9]。

目前,近红外光谱分析技术作为一种新兴的快速检测方法,因其无须样本预处理、操作简便、适用于大批量样本实时检测等优点,被广泛应用于中药分析领域^[10]。在动物类中药材分析领域中,已有近红外技术成功应用于阿胶^[11]、地龙^[12]、金银花^[13]等药材质量评价的文献报道。相比于台式近红外光谱仪,便携式近红外技术作为一种新型的定性及定量分析近红外技术,具有现场、实时分析的优势,弥补了近红外技术在现场分析领域的空白,经过多年来化学计量学方法以及硬件性能的提升,便携式近红外光谱仪也已在中药分析领域初步崭露头角^[14-18]。目前尚未有近红外技术应用于僵蚕的研究报道,本研究于2021年2—3月采用便携式近红外光谱仪对僵蚕的产地以及僵蚕炮制前后的差异进行近红外分析,建立一种实时鉴别不同产地僵蚕与炮制品的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器 便携式近红外光谱仪(PV500R-I,中国长虹科技有限公司);FA224型精密电子天平(上海一科科学仪器有限公司);SF-130C型高速中药粉碎机(湖南中诚制药机械厂);DB-206SC型电热鼓风恒温干燥箱(成都天宇试验设备有限责任公司);Unscrambler® X10.4软件(CAMO software, Oslo, Norway)。

1.2 材料 僵蚕经成都中医药大学吴纯洁研究员鉴定为蚕蛾科昆虫家蚕4~5龄的幼虫感染白僵菌致死的干燥体及其炮制品。50℃低温烘干至恒重,粉碎,过三号筛。僵蚕及其炮制品麸炒僵蚕来源和数量信息,见表1。

1.3 样本近红外光谱采集 将每批样本称取20.0 g后平铺放置于直径为10 cm、高为5 cm的不透光圆柱形铁盒中,采用PV500R-I便携式近红外光谱仪采

集样本光谱,其光斑大小为10 mm,光谱分辨率为6 nm,重复性2 nm,扫描次数36次,波长范围为1 551~2 150 nm。将便携式近红外光谱仪平贴于样本表面,同一样本以多个采样点进行采样,每采集一次后更换仪器放置区域继续采集样本光谱,每个样本采集3次光谱后求平均光谱用于后续建模分析。

1.4 不同光谱预处理方法 通过对样本近红外光谱数据采取适宜的预处理方法,可以有效去除光谱中包含的噪声信息,保留特征信息,提高所建模型的性能。目前常用的光谱预处理方法主要有平滑、一阶与二阶求导、多元散射校正(MSC)与标准正态变量校正(SNV)等,平滑预处理光谱后可减少光谱的背景噪声^[19];对光谱数据一阶与二阶求导后可提升光谱分辨率和灵敏度,其工作原理为消除基线和其他背景的干扰^[20];而MSC与SNV作用相同,可消除样本颗粒对光谱数据产生的影响^[21-22]。在Unscrambler软件中选择上述方法分别对僵蚕样本原始光谱进行预处理。

1.5 化学计量学方法

1.5.1 主成分分析(PCA) 是一种无监督的模式识别方法,利用其降维能力从多个变量中得到可代表样本最大限度特征的几个主成分,从而对样本的分布及聚类特征进行描绘^[23]。本研究利用Unscrambler软件对不同产地僵蚕及麸炒僵蚕建立PCA模型,以发掘不同产地样本及其炮制品之间的联系与区别。

1.5.2 线性判别分析(LDA) 在PCA的基础上,采用有监督的LDA方法对僵蚕产地进行区分。LDA在已知样本类别标签的情况下寻求样本分类的最优解,可达到更好的分类效果^[24]。在Unscrambler软件中采用LDA建立不同产地僵蚕的近红外定性分析模型,以准确率为模型指标以评估模型预测性能。

2 结果

2.1 样本的近红外光谱 84批不同产地僵蚕及24批麸炒僵蚕样本的近红外原始光谱以及采用不同光谱预处理方法得到的样本光谱如图1所示。

2.2 不同类别僵蚕样品的PCA模型 根据比较不同光谱预处理方法分析结果,选择利用一阶导数处理后的光谱建立PCA模型,前7个主成分的累计解释了样本变量信息97.82%的方差,其中第1主成分方差贡献率为69.53%,第2主成分方差贡献率为17.43%,第3主成分方差贡献率为5.95%,前3个主成分累计方差贡献率为92.91%,代表其可很好地解释样品光谱信息。不同产地僵蚕样本及麸炒僵蚕的近红外原始光谱数据PCA模型结果如图2所示。

表1 僵蚕及其炮制品麸炒僵蚕来源和数量信息

样本	数量/批	产地
僵蚕	10	四川宜宾
僵蚕	13	四川西昌
僵蚕	18	广西南宁
僵蚕	15	广西玉林
僵蚕	28	江苏
麸炒僵蚕	24	四川宜宾

从图2中可以看出,僵蚕的炮制品与其生品之间具有明确区分,可明显分为两类。此外,3个产地的僵蚕样本各自聚为一类,虽然3个产地样本之间具有部分重叠,但通过对主成分聚类图的可视化分析也可实现不同产地僵蚕样本的明确区分。

2.3 LDA模型区分僵蚕产地 采用Kennard-Stone(K-S)算法^[25]对样本进行划分,84批不同产地僵蚕样本按照3:1比例,划分为含有63批样本的校正集,用于建立校正模型;剩余的21批样本作为验证集用于评估模型预测性能。

2.3.1 不同光谱预处理方法 采用不同光谱预处理方法分别建立不同产地僵蚕的近红外定性分析模型,不同光谱预处理方法所建模型的结果如表2所示。根据结果可知,采用平滑预处理方法对光谱进行预处理后,模型的校正集与验证集结果更优,因此选择平滑后的光谱建模。其中校正集样本的判别准确率为98.41%,验证集样本的判别准确率为90.48%;校正集中只有江苏一类样本有一个判别错误,其余的四川、广西两类产地的判别正确率均为100%;验证集中江苏与四川两个产地各有一个样本预测错误,产自广西的样本的预测正确率依然为100%。

表2 不同光谱预处理方法僵蚕产地建模结果/%

预处理方法	校正集		验证集	
	比例	准确率	比例	准确率
原始光谱	61/63	96.83	19/21	90.48
一阶导数(5点平滑)	57/63	90.48	16/21	76.19
二阶导数(7点平滑)	53/63	84.13	15/21	71.43
SNV	42/63	66.67	18/21	85.71
MSC	42/63	66.67	18/21	85.71
平滑(5点平滑)	62/63	98.41	19/21	90.48

注:SNV为标准正态变量校正,MSC为多元散射校正。

2.3.2 不同产地僵蚕LDA模型 平滑预处理后光谱建立的不同产地僵蚕LDA模型聚类图如图3所示,三个产地的僵蚕具有明显的聚类与分离趋势,大致分为三类。其中产自江苏的一类样本聚集趋势最强,而产自四川的一类样本中有少数样本较为分散,可能与样本批次以及更细致的产地分布有关。通过LDA聚类图的可视化分析,可对不同产地僵蚕进行明确的区分,表明建立的不同产地僵蚕定性分析模型可对僵蚕产地进行准确区分。

2.4 LDA模型鉴别僵蚕及其炮制品 利用LDA方法建立僵蚕生品与炮制品的近红外定性分析模型,同样利用K-S算法对僵蚕24批麸炒僵蚕进行样本集划分,其中校正集18批,验证集6批;其余僵蚕生品按照2.3项下样本集划分;共得到校正集样本81份,验证集样本27份。

2.4.1 不同光谱预处理方法 评估上述多种光谱预处理方法多所建僵蚕生品与炮制品的近红外定性分析模型性能的影响,不同光谱预处理方法所建模型的结果如表3所示。从表3结果可看出,多种光谱预处理方法所建的僵蚕生品与炮制品近红外定性分析模型的性能相同,校正集与验证集的判别准确率均达到100%,表明僵蚕生品与炮制品的区别较大,多种光谱预处理方法建立的模型均能对僵蚕与麸炒僵蚕进行准确区分。

表3 不同光谱预处理方法僵蚕生品与炮制品建模结果/%

预处理方法	校正集		验证集	
	比例	准确率	比例	准确率
原始光谱	81/81	100	27/27	100
一阶导数(5点平滑)	81/81	100	27/27	100
二阶导数(7点平滑)	81/81	100	27/27	100
SNV	81/81	100	27/27	100
MSC	81/81	100	27/27	100
平滑(5点平滑)	81/81	100	27/27	100

注:SNV为标准正态变量校正,MSC为多元散射校正。

2.4.2 僵蚕与麸炒僵蚕LDA模型 根据结果可知,原始光谱与其余预处理方法预处理光谱所建模型性能相当,本着最少处理原则,选择原始光谱建模。建立了僵蚕与麸炒僵蚕的近红外定性分析模型,模型的LDA聚类图如图4所示。从图中可看出,僵蚕与其炮制品麸炒僵蚕具有明显区别,在可视化分析中明确聚为两类,麸炒僵蚕位于LDA聚类图左上侧,僵蚕样本则位于聚类图右下侧,显示出了样本间的明确分离趋势以及样本内的聚集趋势,充分表明僵蚕经炮制后其内在成分具有显著变化,导致其以内成分为代表的近红外光谱数据的较大差异。通过便携式近红外光谱仪建立的僵蚕生品与炮制品麸炒僵蚕的近红外定性分析模型,可对两类僵蚕样本进行明确区分。

3 讨论

研究共采用84批僵蚕样本以及24批僵蚕的炮制品麸炒僵蚕样本,通过利用国产的新型便携式近红外光谱仪对僵蚕的产地,生品与炮制品分别进行近红外定性建模分析。在全波段、一阶预处理条件下,利用PCA模型可基本实现不同产地僵蚕以及麸炒僵蚕样本的区分,三个产地的僵蚕样本之间以及麸炒僵蚕具有明显不同。在建立的僵蚕产地近红外LDA模型中,结果显示,经平滑预处理后建立的模型效果最佳,校正集中三个产地僵蚕样本的判别准确率为98.41%,验证集的预测正确率也达到了90.48%,表明该模型可对不同产地样本进行准确区分;在建立的僵蚕生品与麸炒僵蚕的近红外分析模

型中,多种光谱预处理方法均达到校正集、验证集同为100%的判别、预测正确率,表明僵蚕生品与其炮制品具有较大差异,通过便携式近红外光谱仪可实现准确鉴别。与样本预处理及分析往往需1 h以上且步骤繁琐的传统检测方法相比,便携式近红外光谱仪可在5 min以内完成对无须预处理的僵蚕样本光谱数据的采集及实时分析,为僵蚕药材的现场快速评价提供了一种新的技术优势。

本研究首次利用便携式近红外技术对僵蚕产地、炮制品进行了实时分析。随着模型中样本数量的增多以及更多具有代表性的样本加入,模型的适用性、准确性以及应用范围将进一步增大。相比传统检测方法以及HPLC等现代分析技术,便携式近红外技术实时、低成本的分析优势为僵蚕药材的质量控制提供了新的思路,也为其他动物类中药材的近红外快速评价体系的构建提供了借鉴。尽管如此,近红外分析技术在中药领域中的应用还存在一些不足有待完善:(1)近红外模型的建立需要数量较多的具有代表性的样本,而中药内在成分复杂导致分析难度增大,模型的准确度对样本数量的依赖严重。(2)近红外光吸收强度弱,提取信息的有效利用率低,因此其仪器检测的灵敏度、精确度还有待提升。综上所述,近红外技术在中药分析领域虽存在一定的局限性,但随着相关软硬件、化学计量学、中药分析技术的逐渐深入,近红外技术在中药分析领域将具有更广阔的应用前景。

(本文图1~4见插图12-4)

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2020年版 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:392.
- [2] 莫雪林,胡美变,肖禾,等. 僵蚕的本草考证[J]. 中药与临床, 2016,7(5):47-50.
- [3] HU M, YU ZJ, WANG JL, et al. Traditional uses, origins, chemistry and pharmacology of bombyx batryticatus: a review [J]. *Molecules*, 2017,22(10):1779.
- [4] 权浩浩,张晓凤,高凯,等. 基于网络药理学的僵蚕主要药效作用研究[J]. 西部中医药, 2021,34(3):92-96.
- [5] 胡美变,刘玉杰,肖禾,等. 僵蚕的人工养殖研究进展及思考[J]. 中药材, 2016,39(4):930-933.
- [6] 万德光,杨文宇. 基于“品种-质量-药效”相关性的中药动物药品质观[J]. 中国现代中药, 2019,21(9):1127-1136.
- [7] 胡美变. 麸炒僵蚕的炮制工艺规范化及质量相关研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2017.
- [8] 但彩云,崔诗遥,李聪慧,等. 白僵蚕活性成分及其药用功效的研究概况[J]. 蚕桑通报, 2021,52(1):1-5.
- [9] 陈文文,胡美变,彭伟,等. 僵蚕中有效成分白僵菌素的研究进展[J]. 中国药房, 2019,30(24):3452-3456.
- [10] 范林宏,范文翔,韦志强,等. 近红外光谱技术结合化学计量学在中药分析中的应用现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019,25(24):205-210.
- [11] 高凤伟,张东京,武以敏,等. 基于近红外光谱技术结合判别分析快速识别阿胶产品[J]. 廊坊师范学院学报(自然科学版), 2017,17(3):23-25.
- [12] 吴怡青,赵崇军,张文婷,等. 近红外判别结合COI序列基因分析鉴定地龙物种基源[J]. 世界中医药, 2020,15(13):1879-1885.
- [13] 刘征辉,魏静娜,赵琳琳,等. 近红外光谱技术在金银花和山银花判别中的应用研究[J]. 中国现代中药, 2020,22(1):58-64.
- [14] 刘晓慧,孙巧凤,胡甜,等. 微型近红外光谱技术在白芍快速检测方面的应用[J]. 食品与药品, 2018,20(2):110-113.
- [15] 李庆,闫晓剑,赵魁,等. 基于云端-互联便携式近红外技术现场快检西红花真伪[J]. 光谱学与光谱分析, 2020,40(10):3029-3037.
- [16] 吴晓燕,侯晓琳,宿莹,等. 便携式近红外测定龙胆中水溶性浸出物及龙胆苦苷含量[J]. 天然产物研究与开发, 2020,32(8):1363-1369.
- [17] 张湘东,马晋芳,罗娟敏,等. 微型近红外光谱仪快速测定桔梗有效成分研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018,20(5):637-643.
- [18] 江明珠,韩邦兴,颜辉,等. 便携式近红外光谱仪快速无损鉴别霍山石斛枫斗和河南石斛枫斗[J]. 林产化学与工业, 2017,37(5):101-106.
- [19] 赖长江生,周融融,余意,等. 基于近红外分析和化学计量学方法对不同产地灵芝快速鉴别及多糖含量测定的研究[J]. 中国中药杂志, 2018,43(16):3243-3248.
- [20] 王小亮,黄萍. 基于近红外光谱技术和神经网络算法的佐匹克隆片定量分析[J]. 安徽医药, 2019,23(1):50-54,216.
- [21] 崔蕴涵,许金钗,方智毅,等. 莲子含水率近红外光谱检测模型构建[J]. 食品研究与开发, 2021,42(18):130-135.
- [22] 战皓,吴宏伟,张东,等. 近红外光谱法测定不同产地黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2017,37(5):1391-1396.
- [23] 陆静金,夏泉. 气相色谱-质谱联用技术分析制痲酊中挥发性成分[J]. 安徽医药, 2021,25(5):868-869.
- [24] 余梅,李尚科,戴雪婧,等. 一种基于近红外光谱技术的不同品种及掺假三七的无损鉴别分析研究[J]. 分析测试学报, 2021,40(9):1374-1379.
- [25] 岑忠用,雷顺新,雷蕾,等. 近红外光谱法鉴别6种根茎类中药材[J]. 华中农业大学学报, 2021,40(3):271-277.

(收稿日期:2021-09-14,修回日期:2021-10-18)