

铁皮石斛品质影响因素快速无损检测及光谱特性分析

陈丰农¹, 桑佳茂¹, 姚睿¹, 孙宏伟¹, 张垚¹, 张竞成¹, 黄赞², 徐俊锋³

1. 杭州电子科技大学自动化学院, 浙江 杭州 310018
2. 金华市农业科学研究院, 浙江 金华 321017
3. 杭州师范大学遥感与地球学院, 浙江 杭州 311121

摘要 随着人民生活水平的提高, 中草药的保健功能越来越得到大家的重视, 铁皮石斛是我国名贵中药材, 素有“救命仙草”之称。尝试用叶绿素、糖度和 pH 值作为铁皮石斛的品质指标, 选择安徽霍山、浙江雁荡山和云南 3 个不同产地的铁皮石斛作为研究对象, 提取不同铁皮石斛的光谱数据和理化参数, 然后进行各品质指标的反演, 最终建立品质指标与光谱之间的相关模型, 并对模型的有效性进行分析。实验中的研究对象是铁皮石斛的茎, 用 ASD 光谱仪得到三种铁皮石斛茎的光谱数据, 再把同一批样本研磨碎, 放入离心管中加入甲醇溶液密封, 并用锡箔纸包装处理制成相应的溶液, 采用分光光度计、糖度计和 pH 计测量叶绿素含量、糖度和 pH 值, 每个样本分别选取离心试管中的上层, 中层, 下层溶液检测糖度, 测量 3 次并取平均值, 以此结果作为对照组。原始光谱数据通过小波变换去除噪声和降维, 将得到的能量系数(包括波段与尺度), 与铁皮石斛对照组的理化参数进行相关性分析, 选取决定系数中较高的能量系数作为小波特征, 用最小化二乘法对小波特征拟合。用全部实验样本作为测试集, 随机选取 70% 作为验证集, 对于浙江雁荡山、安徽霍山和云南三种不同品种铁皮石斛: 叶绿素含量反演模型的 R^2 分别为 0.819, 0.820 和 0.865, 均方根误差(RMSE)分别为 0.035, 0.013 和 0.017; 糖度反演模型的 R^2 分别为 0.756, 0.764 和 0.823, 均方根误差(RMSE)分别为 0.025, 0.030 和 0.0368; pH 值的反演模型 R^2 分别为 0.819, 0.820 和 0.865, 均方根误差(RMSE)分别为 0.0345, 0.013 和 0.017。从中可以发现, 三种不同铁皮石斛的品质反演模型和 R^2 均大于 0.80, 均方根误差(RMSE)小于 0.10。实验证明了铁皮石斛中叶绿素、糖度和 pH 值的光谱特性对其进行品质评估的可行性。

关键词 铁皮石斛; 品质; 光谱特性; 小波变换; 快速无损检测

中图分类号: S237 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)10-3276-05

引言

随着人民生活水平的提高, 中草药等天然药物的医疗和保健作用日益受到重视。中药质量是中药产业的生命线, 临床疗效是中药品质评价的最主要目的, 中药的疗效确切和质量稳定, 是医生辨别药效准确的保障, 否则出现“病准方对药不灵”的情况^[1]。铁皮石斛作为重要的中药材, 其品质好坏对疗效影响较大, 因此对其品质影响因素进行定量分析具有重要意义。

目前中草药的品质鉴定方法主要包括: (1) 化学检验法^[2]。该方法得到的结果较为准确, 但繁琐且有损。随着中

草药需求量的增大, 化学检验渐渐不能满足品质检测的要求。(2) 经验判别法^[3]。从李时珍编写本草纲目时就使用该方法。例如根据植物的外观、药材的形态和生境描述判断中药品质。但现代环境的剧烈变化已经制约了“看产地确定品质”。(3) DNA 测序法^[4]。直接在基因序列层面, 采用 DNA 测序进行中草药检测。该方法非常精准, 但不能同时兼顾快速和无损两个要求。(4) 光谱检测法。用光谱的吸收特性来判别某种影响品质的关键因素, 以此来判断中草药的品质好坏。通过光谱系统搭建, 建立检测模型, 实现中草药品质的快速与无损检测。但需对光谱特征进行精准筛选, 否则会影响反演方法的有效性。

根据文献, 可知叶绿素含量、糖度和 pH 值对铁皮石斛

收稿日期: 2020-10-12, 修订日期: 2021-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(41671415), 浙江省基础公益研究计划项目(LGN18F030002), 浙江省自然科学基金项目(LY16D010007)资助

作者简介: 陈丰农, 1978 年生, 杭州电子科技大学自动化学院副教授 e-mail: fnchen@hdu.edu.cn

品质有重要影响。针对三种不同地域(浙江、安徽和云南)的铁皮石斛,先用化学方法测量叶绿素含量、糖度和 pH 值作为对照组,再通过特征光谱建立与各品质指标的相关性。尝试以此三种因素作为新的检测指标。

1 实验部分

1.1 品质参数选取

依据《中华人民共和国药典》^[5],铁皮石斛以多糖和甘露糖为质量标准。唐丽^[6]认为铁皮石斛中的多糖、石斛碱和黄酮是其主要药效成分,其含量与铁皮石斛的品质直接相关,不同地域、不同生长龄乃至同一地域不同种植者种出的产品的主要成份差别很大。多糖成分与铁皮石斛的药效,如增强机体免疫机能、抗肿瘤、抗衰老、抗疲劳、降血糖等方面有着密切联系。王丽霞^[7]对铁皮石斛的多糖提取和抗氧化活性研究。石斛碱的药理作用主要表现为对心血管、胃肠道作用及退热止痛等。葛颖华^[8]测定了铁皮石斛中石斛碱、多糖的含量。于萌萌^[9]为了揭示铁皮石斛内生菌与功效成分的关系,测定 21 种铁皮石斛内生真菌菌丝及发酵液提取物中糖类和黄酮类成分,并判断了菌种中是否含有糖类和黄酮成分。

本研究把糖度和 pH 值作为多糖和石斛碱的替代因素,与此同时由于叶绿素的养生保健特性,把叶绿素也作为铁皮石斛品质的主要指标。

叶绿素(chlorophyll):是各种高等植物进行光合作用的一种绿色色素^[10]。叶绿素从光中吸收能量,然后将二氧化碳转换为碳水化合物能量。叶绿素有很强的养生保健作用,世界医学权威证实叶绿素可以强化免疫功能,促进新陈代谢^[11]。叶绿素可以为人类的身体健康增强造血作用,提供维生素,抗病,解毒等作用。因此,用叶绿素含量作为铁皮石斛品质检测的指标之一。

糖度:铁皮石斛的多糖含量是衡量其品质优劣的一个重要指标,这在多个文献中得到了证实^[12]。同时,也有文献提到铁皮石斛的糖度与药用性的关系^[13]。由于茎是人们食用铁皮石斛的部位,因此针对不同种类铁皮石斛的茎进行糖度测量。

pH 值:铁皮石斛中石斛碱的含量也是衡量铁皮石斛品质的一个重要指标^[14]。石斛碱是一种生物碱,和酸反应生成盐。因此可用 pH 值对石斛碱进行度量。

1.2 仪器

选用 ASD (Analytical Spectral Device) 公司的 Field-Spect4 光谱仪采集铁皮石斛的光谱数据,检测范围 350~2 500 nm;分光光度计采用岛津 UV3600plus,该仪器在高分辨率(最大分辨率:0.1 nm)的同时仍能保持超低杂散光水平(340 nm 处为 0.000 05%)。185~3 300 nm 的宽波长量程覆盖紫外、可见及红外光区。用于测量铁皮石斛叶绿素含量中所需要的吸光度值;采用爱宕 PAL-1 迷你数显糖度-酸度一体机检测糖度。

1.3 方法

化学实验需要提取不同铁皮石斛的光谱数据和理化参数,然后进行品质含量反演,建立相关模型,再对模型的有

效性进行分析。本研究中涉及到的实验流程如下:

(1)选取实验样本。涉及不同地域的铁皮石斛。市面上最为著名的为安徽霍山铁皮石斛,浙江雁荡山铁皮石斛。除了以上两种,本研究又选用了一种在我国西南边陲的云南铁皮石斛,样本量共 60 株,为了得到足够的光谱,每株选择多个光谱采集点。

(2)数据预处理。将三种不同地域的铁皮石斛各取等量,去除石斛的叶、根和花,剩下待研究的茎。在预处理过程中,同时将样本编号,便于之后的数据记录和整理。

(3)采集光谱数据。采集光谱时曝光时间为 136 ms。为了减少采集数据环境因素的影响,每一个样本采集 10 次,取 10 次的均值为最终光谱数据。

(4)试样制备。每个样本选取 0.5 g 剪碎。将预处理的样本放入 15 mL 离心管中,加入 5 mL 甲醇溶液并密封,为了避光用锡箔纸包装处理。将样本溶液在室温下静置 5 h 以上备用。

(5)获取样本的叶绿素含量。通过分光光度法测量样本中的叶绿素含量^[15]。前一步的备用溶液为待测样本溶液。提取液(甲醇溶液)为空白溶液,调零点,池空白处理^[16]。之后换样本溶液,分别测量在 470, 653 和 666 nm 处的吸光度值。计算上述 470 nm(A_{470}), 653 nm(A_{653})和 666 nm(A_{666})处的吸光度值^[17],计算方法如式(1)所示

$$\begin{aligned} c_a &= 15.65A_{666} - 7.34A_{653} \\ c_b &= 27.05A_{653} - 2.86A_{666} \end{aligned} \quad (1)$$

$$c_{a+b} = 1\,000A_{470} - 2.86c_a - 129.2c_b$$

式(1)中: c_a 和 c_b 分别为叶绿素 a、b 的浓度,单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; c_{a+b} 为总叶绿素浓度,单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

运用式(1)得出各个样本的叶绿素含量,按照标号记录数据。

(6)获取糖度值。取第四步得到的试样溶液,使用糖度计测量溶液的糖度。每个样本分别选取离心试管中的上层,中层,下层溶液检测糖度,记为 S1, S2 和 S3(%),取均值作为溶液的糖度。

(7)获取各个样本的 pH 值。取第四步得到的试样溶液,使用 pH 计测量溶液的 pH 值,每个样本分别取三次 P1, P2 和 P3,最终 pH 值取三次结果的均值。

将以上实验获取的叶绿素含量、糖度和 pH 值按照不同种类不同编号录入数据。

将光谱数据得到的能量系数(包括波段与尺度),与理化参数进行相关性分析,得到决定系数,选取决定系数中较高的能量系数作为小波特征。根据得到的小波特征,运用最小二乘法拟合数据,并且对模型进行有效性分析。

1.4 数据预处理

对多次采集的光谱数据进行均值化处理,将光谱数据进行小波变换,得到小波能量系数与每一个理化参数的相关性,小波能量系数包括波段(400~2 500 nm)和尺度(0~10,共 11 个尺度)。选取相关性系数中前 3%的小波作为理化参数对应的特征小波,用于建立品质影响因素模型。

将上述小波变换得到的特征小波作为最小二乘法的自变量,理化参数作为模型的因变量。将实验中的数据作为测试

集进行最小二乘法处理,得到因变量的系数,即品质影响因素模型,计算模型的相关系数以及均方根误差进行有效性分析。

2 结果与讨论

2.1 铁皮石斛光谱图

实验发现三种铁皮石斛的光谱形状具有一致的光谱特征属性,在 930 nm 附近有最大波峰,1 000 nm 附近有最小波谷,1 100 nm 附近有最小波峰;1 290 与 1 740 nm 附近有较大波峰,1 480 与 1 940 nm 附近有较小波谷;680 nm 附近有最小波谷,600 nm 附近有最小波峰。说明铁皮石斛不同品种所表现出来的主要理化特征有较好的一致性。

2.2 叶绿素含量光谱分析及品质反演

对于铁皮石斛叶绿素含量反演模型的有效性分析。其中,浙江雁荡山铁皮石斛的决定系数(R^2)为 0.819,均方根误差(RMSE)为 0.035。安徽霍山铁皮石斛决定系数(R^2)为 0.820,均方根误差(RMSE)为 0.013。云南铁皮石斛决定系

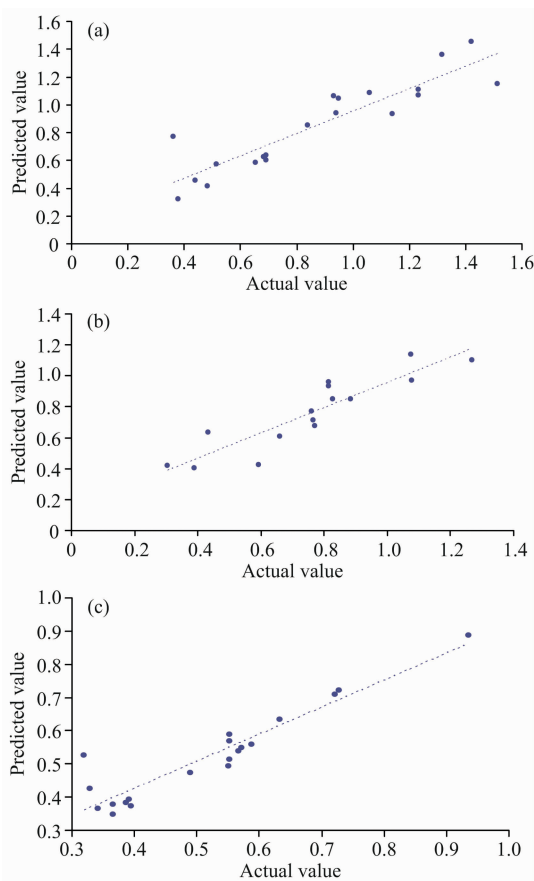


图 1 浙江雁荡山(a),安徽霍山(b),云南地区(c)铁皮石斛叶绿素含量反演结果

Fig. 1 Inversion results of chlorophyll contents in *Dendrobium candidum* from Yandang Mountain (a), Huoshan (b) and Yunnan (c)

数(R^2)为 0.865,均方根误差(RMSE)为 0.017。图 1 是 3 种不同铁皮石斛叶绿素含量反演结果的散点图。

铁皮石斛叶绿素含量反演模型的校正集有效性分析,相关系数 r 为 0.92。

2.3 糖度光谱分析及品质反演

铁皮石斛中的糖度是品质评定的重要指标。以下是三种铁皮石斛糖度品质模型散点图。对这三种铁皮石斛的糖度含量反演模型进行有效性分析,浙江雁荡山铁皮石斛决定系数(R^2)为 0.756,均方根误差(RMSE)为 0.025。安徽霍山铁皮石斛决定系数(R^2)为 0.840,均方根误差(RMSE)为 0.032。云南铁皮石斛决定系数(R^2)为 0.847,均方根误差(RMSE)为 0.0916。

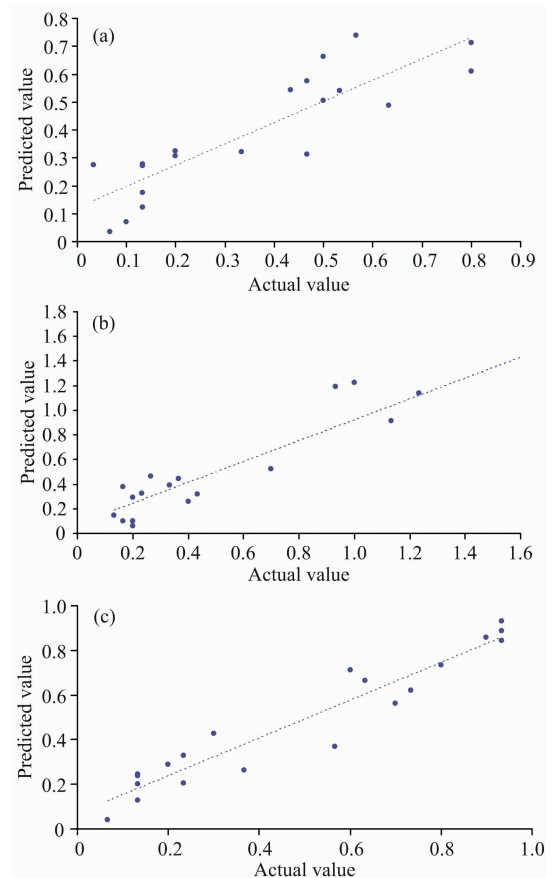


图 2 浙江雁荡山(a),安徽霍山(b),云南地区(c)铁皮石斛的糖度含量反演模型有效性分析

Fig. 2 Validity analysis of the inversion model for sugar contents in *Dendrobium candidum* from Yandang Mountain (a), Huoshan (b) and Yunnan (c)

铁皮石斛糖度反演模型校正集的有效性分析,相关系数 r 为 0.87。

2.4 pH 值光谱分析及品质反演

pH 值可以间接度量石斛碱的含量,是衡量铁皮石斛品质的一个重要指标。pH 值反演模型有效性分析,浙江雁荡山铁皮石斛决定系数(R^2)为 0.819,均方根误差(RMSE)为

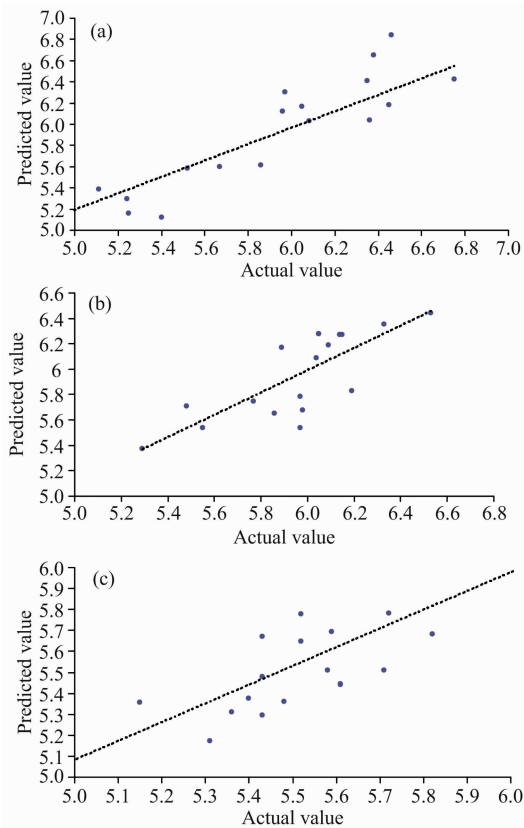


图 3 浙江雁荡山(a), 安徽霍山(b), 云南地区(c)铁皮石斛 pH 值模型反演及散点图

Fig. 3 Scatter plots of pH values in *Dendrobium candidum* from Yandang Mountain (a), Huoshan (b) and Yunnan (c)

References

- [1] BAI Gang, HOU Yuan-yuan, DING Guo-yu, et al(白 钢, 侯媛媛, 丁国钰, 等). *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学报), 2019, 54(2): 197.
- [2] JIANG Meng-yuan, HU Lin, YANG Qing-song, et al(蒋孟圆, 胡 琳, 杨青松, 等). *Environmental Chemistry*(环境化学), 2018, 37(10): 236.
- [3] MA Hong(马 红). *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*(中华中医药杂志), 2017, 32(9): 4056.
- [4] YANG Bin-bin, LI Ming-cheng, WANG Bin(严斌斌, 李明成, 王 彬). *General Journal of Stomatology*(全科口腔医学电子杂志), 2018, 5(28): 96.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Commission(中华人民共和国药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press(北京: 中国医药科技出版社), 2010. 245.
- [6] TANG Li, LI Jing, LONG Hua, et al(唐 丽, 李 菁, 龙 华, 等). *Guangdong Agricultural Sciences*(广东农业科学), 2015, 42(8): 17.
- [7] WANG Li-xia, LIU Meng-zong, WANG Fang, et al(王丽霞, 刘孟宗, 王 芳, 等). *China Food Additives*(中国食品添加剂), 2019, (2): 85.
- [8] GE Ying-hua, WANG Jie, ZHOU Cui, et al(葛颖华, 王 杰, 周 萃, 等). *Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology*(中国中医药科技), 2015, 22(5): 527, 602.
- [9] YU Meng-meng, WU Ling-shang, SI Jin-ping, et al(于萌萌, 吴令上, 斯金平, 等). *China Journal of Chinese Materia Medica*(中国中药杂志), 2016, 41(12): 2208.
- [10] Tang C L. *Agricultural Science & Technology*, 2014, (11): 1928.
- [11] YAN Zhen, NIE Ji-yun, CHENG Yang, et al(闫 震, 聂继云, 程 杨, 等). *China Fruits*(中国果树), 2018, (2): 59, 72.
- [12] ZHANG Yin-tao, GE Hong-li, SUN Zhen, et al(张银涛, 葛宏立, 孙 贞, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分

0.034 5。安徽霍山铁皮石斛决定系数(R^2)为 0.875, 均方根误差(RMSE)为 0.047。云南铁皮石斛决定系数(R^2)为 0.892, 均方根误差(RMSE)为 0.094。

铁皮石斛 pH 值反演模型校正集的有效性分析, 相关系数 r 为 0.85。

2.5 结果误差分析

影响数据准确性的有以下原因:

- (1) 光线、环境对铁皮石斛光谱数据采集有一定的影响, 以后考虑用辐照度计进行矫正。
- (2) 铁皮石斛的生长程度和杂质会影响理化参数测量。
- (3) 用分光光度法测量叶绿素含量时湿度会影响测量结果。
- (4) 测量仪器本身的误差和测量方式也会影响测量结果。

3 结 论

通过测量叶绿素含量、糖度和 pH 值作为衡量铁皮石斛品质的主要指标。通过光谱分析和对照组的对比发现, 这三种指标与铁皮石斛品质的相关性均大于 0.8, 均方根误差也都小于 0.1, 可以作为品质参数模型的衡量指标; 但是仅仅凭借这三个指标对铁皮石斛的性质和品质进行评价还是有欠缺的, 需要后续结合其他方法和指标进一步探究。

通过该研究可知, 叶绿素含量、糖度和 pH 值作为衡量铁皮石斛品质的指标, 与光谱特性有极高的相关性。同时也为其他中草药等天然药物快速无损检测提供一定的思路。

- 析), 2014, 34(6): 1645.
- [13] CHEN Zhen-xing, WANG Wan-jun(陈振兴, 王万军). *Biology Teaching*(生物学教育), 2020, 45(9): 2.
- [14] MA Xiao-shuang, LI Cheng-cheng(马小双, 李程程). *Heilongjiang Agricultural Sciences*(黑龙江农业科学), 2015, (9): 116.
- [15] HU Bing-feng, HUANG Hua-li, JI Yuan-zu, et al(胡秉芬, 黄华梨, 季元祖, 等). *Pratacultural Science*(草业科学), 2018, 35(8): 1965.
- [16] HE Li-si, SU Jia-le, LIU Xiao-qing, et al(何丽斯, 苏家乐, 刘晓青, 等). *Jiangsu Agricultural Sciences*(江苏农业科学), 2012, 40(11): 190.
- [17] WANG Xi-yao(汪希尧). *China Agricultural Information*(中国农业信息), 2014, (3): 211.

Rapid Nondestructive Detection and Spectral Characteristics Analysis of Factors Affecting the Quality of *Dendrobium officinale*

CHEN Feng-nong¹, SANG Jia-mao¹, YAO Rui¹, SUN Hong-wei¹, ZHANG Yao¹, ZHANG Jing-cheng¹, HUANG Yun², XU Jun-feng³

1. School of Automation, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, China

2. Jinhua Academy of Agricultural Sciences, Jinhua 321017, China

3. Institute of Remote Sensing and Earth Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China

Abstract With the improvement of people's living standards, people pay more and more attention to the health care function of Chinese herbal medicine. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (*Dendrobium officinale*) is a rare Chinese herbal medicine, known as "life-saving fairy grass". In this study, we tried to evaluate the quality of *Dendrobium officinale* by sugar content, pH value and other related physical and chemical characteristics. We selected three different habitats of *Dendrobium officinale* from Huoshan in Anhui, Yandang Mountain in Zhejiang and Yunnan Province as research objects, extracted the spectral data and physical and chemical parameters of different *Dendrobium officinale*, and then carried out the inversion of quality indicators. Finally, the correlation model between quality and spectrum was established. In the experiment, the leaves, roots and flowers of *Dendrobium* were removed first, and then the stems to be studied. The spectral data of three *Dendrobium officinale* with different quality grades were obtained by the ASD specter. The same samples was ground, put into a centrifugal tube, sealed with methanol solution, and packaged with tin foil paper to make corresponding solutions. The chlorophyll content, sugar content and pH value were measured by spectrophotometer, sugar meter and pH meter. The upper layer, middle layer and lower part of the centrifuge tube were selected for each sample. Each sample was measured 3 times, and the average value was taken as the control sample. The original spectral data were denoised and dimensionally reduced by wavelet transform. The correlation between the energy coefficients (including band and scale) and the physicochemical parameters of the *Dendrobium officinale* control group was analyzed. The higher energy coefficient in the determination coefficient was selected as the wavelet feature, and the wavelet feature was fitted by the least square method. Using all experimental samples as test set and 70% as verification set, the determination coefficient (R^2) of chlorophyll content inversion model was 0.819, 0.820 and 0.865, the root mean square error (RMSE) were 0.035, 0.013 and 0.017, respectively; the determination coefficient (R^2) of sugar content inversion model was 0.756, 0.764 and 0.823, respectively. The results showed that the root means square error (RMSE) was 0.025, 0.030 and 0.036 8; the determination coefficient (R^2) of the inversion model for pH value was 0.819, 0.820 and 0.865, and the root mean square error (RMSE) was 0.034 5, 0.013 and 0.017, respectively. It can be found that the quality inversion model and determination coefficient (R^2) of three kinds of *Dendrobium officinale* are all greater than 0.80, and the root means square error (RMSE) is less than 0.10. This study proved that the spectral characteristics of chlorophyll, sugar content and pH value in *Dendrobium officinale* were feasible for quality evaluation.

Keywords *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; Quality; Spectral characteristics; Wavelet transform; Fast and nondestructive detection

(Received Oct. 12, 2020; accepted Feb. 19, 2021)