

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 200325037

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

甘草药材指纹图谱的模式识别分类研究

Application of Pattern Recognition Technology into
Classification of Chromatographic Fingerprinting of *Radix
et Rhizoma Glycyrrhizae*

卓 林

指导教师姓名: 朱尔一 副教授

王小如 教授

专 业 名 称: 分析化学

论文提交日期: 2006 年 6 月

论文答辩时间: 2006 年 7 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2006 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘要

本论文以中药甘草为研究对象,采用模式识别技术结合高效液相色谱对不同产地、不同植物种、不同种植方式、不同生态型以及不同等级的甘草药材进行了分类探讨,为中药甘草的质量评价和深度开发提供有价值的参考依据,并尝试采用 EXCEL 中的 VBA 设计中药指纹图谱模式识别软件,为中药指纹图谱的数据处理提供了一种有效可行的途径。

第一章通过大量的文献调研,概述了中药指纹图谱技术、模式识别技术以及模式识别技术在中药指纹图谱研究中的应用,在此基础上,结合中药甘草的研究现状,归纳了本论文研究课题的立题依据、研究目的、意义及主要内容。

第二章通过 HPLC 获得 19 个不同来源甘草药材样品的色谱指纹图谱,色谱条件固定相为 Kromasil KR100-5C₁₈(150×4.6 mm),流动相为乙腈-0.05%三氟乙酸溶液,梯度洗脱为乙腈 20% (0 min) — 40% (5 min) — 50% (10 min),流速为 0.8mL·min⁻¹,检测波长为 254 nm,从每个色谱指纹图中挖掘出 325 个特征变量,采用聚类分析对甘草药材样品进行相似性评价,并应用 PLS 方法建立起不同植物种、不同种植方式甘草的 2 个分类回归模型,采用分类模型对不同植物种、不同种植方式甘草进行判别分析,结果与实际一致。

第三章采用第二章所述的色谱条件建立来自三种生态类型(梁地、沙地、滩地)及各自的五个等级(特级、甲级、乙级、丙级和丁级)共 15 个梁外甘草的色谱指纹图谱数据库,同法从每个色谱指纹图中挖掘出 325 个特征变量,采用主成分分析对 15 个梁外甘草样品进行分类探讨,并应用 PLS 回归分析方法建立不同生态型、不同等级梁外甘草的分类模型,结果表明,不同生态型、不同等级梁外甘草均得到分类较为清晰的 PLS 二维判别图,采用分类模型对数据库中不同生态型、不同等级甘草进行判别分析,准确率为 100%。

第四章介绍了第二、第三章中中药甘草指纹图谱数据的处理方法,即通过 EXCEL 中的 VBA 设计模式识别软件来完成,对软件的界面、功能以及特点做了简要介绍,并给出了自定义菜单和特征变量提取的部分程序代码。

另外,第五章介绍了近红外光谱图结合模式识别技术对海面溢油鉴别的探

讨,自行配制了 0#柴油、90#汽油以及 93#汽油的模拟海水样品,用有机溶剂萃取出海水中的溢油后记录其近红外光谱,采用 $5800\sim 6200\text{cm}^{-1}$ 区段范围内的吸光度为特征变量进行 PLS 回归分析,建立起不同种类海面溢油的预报模型,得到令人满意的分类结果,近红外光谱技术结合 PLS 回归分析可作为溢油鉴别的一种辅助方法。

关键词: 甘草; 指纹图谱; HPLC; 模式识别; EXCEL 中的 VBA; 溢油鉴别

Abstract

The HPLC coupled with pattern recognition technology was used to the classification study on *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae* of different sources, different species, different cultivation modes, different living conditions, and different grades in this thesis. The pattern recognition software designed by VBA (Visual Basic for application) in EXCEL was used to deal with the chromatographic fingerprinting data of *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*, providing an effective method to deal with the fingerprinting data of the TCM.

A review of the TCM chromatographic fingerprinting technology, pattern recognition technology and the application of pattern recognition technology into the studies of the TCM chromatographic fingerprinting was given in chapter 1. On this basis, coupled with the research status of *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*, the purpose, significance and main contents of the dissertation were also summarized in this chapter 1.

In chapter 2, HPLC system was applied to obtain the chromatograms of the 19 *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae* samples of different sources. The chromatographic column was Kromasil KR100-5C₁₈ (150×4.6 mm). A mixture of acetonitrile – water (including 0.05% trifluoroacetic acid) was used as the mobile phase with a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ and the gradient mode is acetonitrile 20% (0 min)—40% (5 min)—50% (10 min). The detection wavelength was 254 nm. Then the 325 characteristic variables were obtained from each chromatogram. The clustering analysis was applied to evaluate the similarity of the chromatograms. Then partial least-squares regression method was applied to build the prediction models which were used to distinguish *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae* of different species and cultivation modes. The results show that the fingerprints of *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae* of different sources are different. The classification accuracy of the two prediction models is 100%. The developed technique could be further applied to the

classification of different traditional Chinese medicine(TCM).

In chapter 3,HPLC system was applied to obtain the chromatograms of the 15 *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae* samples from Liangwei. The chromatographic condition was the same as mentioned in chapter 2. Then the 325 characteristic variables were also obtained from each chromatogram by the same method. The PCA was applied to classify the chromatograms.Then partial least-squares regression method was applied to build the prediction models which were used to distinguish the *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae* of different living conditions and grades. The results shows that *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae* of different living conditions and grades both have a good classification in the discrimination plane figure by PLS method. The classification accuracy of each prediction is 100%.

The TCM pattern recognition software designed by VBA (Visual Basic for application) in EXCEL was introduced in chapter 4. The interface,functions,and characteristics of the software were simply described. Some of the program codes of the variables extracting of the chromatogram were displayed,too.

Additionally,in chapter 5, a rapid oil spill identification method by near infrared spectroscopy coupled with PLS pattern recognition techniques was proposed . 36 stimulation spilled oil of 0#diesel fuel, 90#gasoline, and 93#gasoline in marine are chosen to develop the method. Organic reagent of CCl_4 is used to extract the oil. The absorbances in the NIR spectra ranges of $5800\sim 6200\text{cm}^{-1}$ were obtained as characteristic variables. Then partial least-squares regression method was applied to build the prediction models which were used to distinguish the oil of different species. The result shows that oil spill sample with concentration above $0.4\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ can be successfully identified by the prediction models. The developed technique could be further applied to the identification of spilled oil in marine.

Key words: *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*; fingerprint; HPLC; Pattern recognition; VBA in EXCEL; oil spill identification

目 录	
第一章 文献综述 -----	1
1.1 中药指纹图谱技术-----	1
1.1.1 中药指纹图谱定义及特点-----	2
1.1.2 用于构建中药指纹图谱的主要技术手段-----	4
1.2 模式识别技术概述-----	7
1.2.1 聚类分析及相似度定义-----	7
1.2.2 主成分分析-----	10
1.2.3 偏最小二乘法-----	12
1.3 模式识别技术在中药指纹图谱研究中的应用-----	15
1.3.1 聚类分析在中药指纹图谱研究中的应用-----	15
1.3.2 主成分分析在中药指纹图谱研究中的应用-----	16
1.4 中药甘草研究进展-----	17
1.4.1 甘草的化学成分-----	17
1.4.2 甘草的药理作用-----	18
1.4.3 在其他方面的开发利用-----	19
1.4.4 甘草质量控制研究现状-----	19
1.5 本论文工作的研究目的、意义及主要内容-----	20
参考文献-----	22
第二章 不同来源甘草药材的模式识别分类研究 -----	26
2.1 前言-----	26
2.2 实验部分-----	26

2.2.1 材料和仪器	26
2.2.2 实验方法	28
2.3 甘草药材色谱图的特征变量提取	31
2.4 模式识别与结果讨论	33
2.4.1 聚类分析研究	33
2.4.2 PLS 分类模型研究	35
2.5 讨论	41
参考文献	42
第三章 不同生态型和不同等级梁外甘草的模式识别分类研究	43
3.1 前言	43
3.2 实验部分	43
3.2.1 材料和仪器	43
3.2.2 实验方法	45
3.3 甘草药材色谱图的特征变量提取	50
3.4 模式识别与结果讨论	51
3.4.1 主成分分析研究	51
3.4.2 PLS 分类模型研究	53
3.5 讨论	59
参考文献	59
第四章 EXCEL 中的 VBA 设计中药指纹图谱模式识别软件	60
4.1 前言	60
4.2 软件总体构思	60

4.3 软件界面与功能	61
4.4 部分相关程序源代码	63
4.4.1 自定义菜单的程序源代码	63
4.4.2 甘草色谱图特征变量提取的程序源代码	67
4.5 结语	69
参考文献	70
第五章 近红外光谱模式识别用于溢油鉴别的探讨	71
5.1 前言	71
5.2 实验部分	72
5.2.1 仪器与试剂	72
5.2.2 仪器条件	72
5.2.3 样品来源及基础数据的测定	72
5.3 结果与讨论	72
5.3.1 PLS 回归分析数据范围的选择	72
5.3.2 对三种石油产品的 PLS 模型分类	73
5.4 结语	75
参考文献	76
在学期间发表的论文	77
致谢	78

Contents

Chapter 1 Overview of current research -----	1
1.1 Chromatographic fingerprint technology of TCM-----	1
1.1.1 Definition -----	2
1.1.2 Introduction of some technology -----	4
1.2 Pattern recognition technology-----	7
1.2.1 Clustering analysis and similarity definition -----	7
1.2.2 PCA-----	10
1.2.3 PLS -----	12
1.3 Application of pattern recognition technology into the studies of the TCM chromatographic fingerprinting-----	15
1.3.1 Application of clustering analysis -----	15
1.3.2 Application of PCA -----	16
1.4 Research status quo of Radix et Rhizoma Glycyrrhizae -----	17
1.4.1 Chemical constituents -----	17
1.4.2 Pharmacology -----	18
1.4.3 Development and utilization -----	19
1.4.4 Research status quo of QC-----	19
1.5 Objective, significance and main contents of the paper-----	20
References -----	22
 Chapter 2 Application of pattern recognition technology into classification of Radix et Rhizoma Glycyrrhizae of different sources -----	 26
2. 1 Introduction -----	26
2. 2 Experimental-----	26
2. 2.1 Materials and instruments-----	26

2.2.2 Methods -----	28
2. 3 Extraction of characteristic variables from obtained chromatograms -----	31
2. 4 Pattern recognition and result discussion-----	33
2.4.1 Clustering analysis study -----	33
2.4.2 PLS model classification study -----	35
2.5 Discussion-----	41
References-----	42
Chapter 3 Application of pattern recognition technology into classification of Liangwei Radix et Rhizoma Glycyrrhizae of different different living conditions and grades -----	43
3.1 Introduction -----	43
3.2 Experimental-----	43
3.2.1 Materials and instruments -----	43
3. 2. 2 Methods-----	45
3. 3 Extraction of characteristic variables from obtained chromatograms -----	50
3.4 Pattern recognition and result discussion -----	51
3.4.1 PCA study-----	51
3.4.2 PLS model classification study -----	53
3.5 Discussion-----	59
References-----	59
Chapter 4 TCM pattern recognition software designed by VBA (Visual Basic for application) in EXCEL -----	60
4.1 Introduction -----	60
4.2 Software design -----	60
4.3 Interface and functions -----	61
4.4 Some program codes-----	63
4.4.1 Program codes for user-defined menu -----	63

4.4.2 Program codes for characteristic variables extraction of the chromatograms -----	67
4.5 Conclusion -----	69
References -----	70
Chapter 5 Oil spill identification by near infrared spectroscopy coupled with pattern recognition technology -----	71
5.1 Introduction -----	71
5.2 Experimental -----	72
5.2.1 Instruments and reagent -----	72
5.2.2 Instrument condition -----	72
5.2.3 Sample sources and measurement -----	72
5.3 Results and discussion -----	72
5.3.1 Selection of the data area for PLS analysis -----	72
5.3.2 PLS model classification for the three petroleum products -----	73
5.4 Conclusion -----	75
References -----	76
Publications during master study -----	77
Acknowledgements -----	78

第一章 文献综述

1.1 中药指纹图谱技术

我国作为一个传统医药大国，有着丰富的药物资源。在 21 世纪“回归自然”的世界潮流中，传统医药再次焕发出强大的生命力和显示出广阔的发展前景。目前西方医药界已改变了原有观点，对中医药发生兴趣，使中医药在德、美、日等西方发达国家被重视起来。

我国在中药指纹图谱方面的研究起步于六十年代。由于种种原因，其研究速度和成果相对发达国家有一定的差距。进入新世纪后，随着中药的现代化、国际化，如何科学地控制中药的质量是我们迫切需要解决的关键技术之一，而中药指纹图谱则是控制中药材、半成品、最终产品真实性、一致性和稳定性的可行而有效的手段。

但是考察目前我国中药现状，可以发现中药无论在研究方面或生产方面与西方先进药业相比还存在一定差距，这一部分固然是由于中药体系的复杂性，另一主要原因是我国在中药研究中引入现代化科学知识和技术含量偏低。中药要现代化、规范化、走向世界，其中一个重要的方面是中药分析技术要现代化，简化前处理，提高分离能力、检测和信息提取水平。同时需提高中药质量标准，完善检测项目，采用现代检测技术，以使中药质量稳定可控。

在中药现代化研究中，化学工作者所面临的主要难题是从数以百计的化学成分中，确定并分离提取有效成分，并获取其定性定量信息，凭借常规方法是难以奏效的，有时甚至是不可能的。必须在了解和掌握各种现代化学分离分析方法的基础上，有针对性地创建新方法。

近年来，我国中药质量标准趋于完善和规范，量化控制水平不断提高。行业内中药材种植生产的 GAP 管理规范意识不断加强，国家“九五”科技攻关课题“常用中药材质量标准规范化研究”完成了 71 种中药材有效成分对照品的制备研究及质量标准研究，取得了显著成绩；国家高技术产业司在 2000 年正式启动了“现代中药产业化”专项；科技部“十五”攻关项目中，也支持了中药生产过程关键技术的研究。并且随着中药行业效益水平的提高，一些先进可行的质量控制技术与

方法不断的引入到中药产品的质量控制中,使中药质量检测水平日益提高,基本达到国外同步水平。

尽管我国中药质量标准现代化发展已取得了上述进步,但整体上仍存在着许多不足或问题:多数中药材的药效成分不明确,缺乏量化指标;中药的多指标控制水平低,质与量相关性差;长期以来,中药制药企业缺乏生产过程工艺参数稳定性和严格一致性的质量监控手段,产品均一性差^[2]。中药现代化还有很长的路要走,还有很多的工作要做。

国际上,植物药由于毒性小、相对合成药物易于获得,越来越受到人们的重视,国际社会对植物药的需求日益扩大。目前,国际上有约 170 多家公司、40 多个研究团体从事中药的研究和开发工作。与此同时,国际上申请的中药及其它植物药专利数量迅速上升^[2]。此外,欧共体对草药进行了统一立法;在加拿大和澳大利亚等国家,草药地位已经合法化;美国政府也已起草了植物药管理办法,开始接受天然药物^[3]。这些为中药作为治疗药进入国际医药市场提供了良好的国际环境。

1.1.1 中药指纹图谱定义及特点^[4]

指纹图谱是法医学上的一个概念。由于指纹具有人各不同,终生不变,触物留痕,可以认定人身的特点,指纹鉴定结论在侦察和审判中起着重要作用,被称为“物证之首”、“证据之王”。借用这一概念,在系统研究中药成分的基础上,提出了“中药指纹图谱”的概念。中药材或中成药经过适当处理后,利用现代信息采集技术和质量分析手段得到的能够显现中药材或中成药性质的图像、图形、光谱的图谱及其数据,称为中药指纹图谱。它可以较全面地反映中药所含化学成分的种类与数量,进而反映中药的质量和中医用药所体现的整体疗效;现阶段中药的有效成分大多尚未明确,中药指纹图谱的整体性和模糊性正好符合中药质控的要求,较之单一成分或指标成分的质控方法,更具有科学性和全面性。著名的银杏叶标准制剂 EGB761 标准,就是运用中药指纹图谱技术进行质量控制的良好范例。

中药材多为植物的干燥器官,由于复杂的自然环境、社会状况以及我国历史

上科技发展不平衡等多种原因,造成了中药材在应用方面的复杂性。同一名称的中药材可能来自不同基源的植物。同一基源的中药材由于产地不同、采收季节和生长年限不同而存在差别。一些中药材,特别是名贵药材,常可见到伪品与正品相混淆。由于以上因素的存在,使得不同来源的同种中药材其化学组成有可能相同,也有可能不同,这就必然影响到中医的临床疗效和中药的实验研究,并影响以其为原料生产出的中成药的化学组成,从而影响其质量和疗效。此外,我国中成药品种繁多,中成药生产过程中各环节的稳定性等多种因素对产品的化学组成也具有重要的影响。从现有的中药内在质量控制现状来看,还存在很多问题需逐步解决。其中,最突出的问题之一就是中药整体化学特征的特征。因此建立中药指纹图谱对于更加客观地从整体上评价中药的内在质量具有重要意义。

中药指纹图谱具有以下几个特点^[5]:一是特征性和专属性,图谱应能体现出中药的种属、产地或采收季节的差异;二是可量化性,通过选取合适的定量函数解析方法,图谱应能对中药成分进行有效控制,确保产品质量的相对稳定一致;三是稳定性和重现性,这是由药材的标准化和图谱采集手段两方面决定的;四是有效性,这应与中药组效相联系,并且在统计学上其数据有鉴别意义;五是完整性,由于部分中药的有效成分未被阐明或未被全部阐明,因此,仅对某个有效成分或指标性成分进行定性、定量分析,不能有效控制中药的质量,所以图谱中应能相对全面、系统地体现中药已知和未知药理作用的物质成分;六是细节处理的模糊性,因为中药成分间协同、交互作用的复杂机制,故在解决实际问题时应采用模糊数学等分析手段。中药样本选取原则应体现中药材样品科、种、属间差异及道地药材、产地、采收期、炮制品的差异,并具有一定稳定性(应为法定标准品或符合GAP(规范化种植)),成药也要保证原料和工艺稳定性,抽样量应能保证代表该品种的样本总体。在建立中药指纹图谱时,要进行严格的样品提取方法、提取溶剂、纯化方法的方法学考察。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库