

· 综述 ·

三维荧光技术在中药质量评价中应用的研究进展[△]

郭怡宁, 杨振清, 朱炳祺*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

[摘要] 三维荧光技术为中药质量评价提供了新的途径, 但其应用还不够广泛。三维荧光技术分析速度快、前处理简单、灵敏度高、专属性和选择性好, 能提供较为完整的指纹图谱特征信息。将三维荧光技术与化学计量学方法结合可在中药复杂体系中对多个组分同时进行准确的定性与定量分析, 三维荧光技术有望发展为中药质量评价的常规方法, 在中药研究领域具有巨大的发展潜力和广阔的应用前景。

[关键词] 三维荧光; 中药; 质量评价; 化学计量学

[中图分类号] R28 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)11-2025-06

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20200520003

**Application of Three-Dimensional Fluorescence Technique for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine:
A Review**

GUO Yi-ning, YANG Zhen-qing, ZHU Bing-qi*

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

[Abstract] Three-dimensional fluorescence technique provides a new way for quality evaluation of traditional Chinese medicine(TCM), but it is yet to be widely applied. The three-dimensional fluorescence technique, characterized by fast analysis, easy sample preparation, high sensitivity, and good specificity and selectivity, enables the collection of complete fingerprint characteristics. Its combination with chemometrics allows the accurately and simultaneously qualitative and quantitative analysis of multiple components in the complex system of TCM which is expected to be developed into a conventional method for the quality evaluation of TCM. The three-dimensional fluorescence technique has a great development potential and wide application prospect in the research of TCM.

[Keywords] three-dimensional fluorescence; traditional Chinese medicine; quality evaluation; chemometrics

在传统中医药不断为当今医疗事业做出贡献的同时, 劣质、掺假、不规范生产加工等中药质量问题层出不穷^[1]。中药的质量与其临床疗效有着密不可分的联系, 因此, 寻求快速准确的中药质量评价方法已是当务之急。

随着现代分析技术的发展, 中药的指纹图谱研究得到不断深入和完善^[2]。现行的中药质量评价是以1种或几种有效成分、活性成分或指标成分的含量作为某一中药的质量标准, 并依此评价中药及成药的质量^[3]。与其他现代分析技术(如色谱、质谱等)相比, 荧光光谱分析在化合物的定性鉴定中具有独特的优势^[4]。三维荧光技术具有灵敏度较高、选择性良好、能快速检测等优点, 且可以将荧光信

息描述得更为全面, 可提供比常规荧光光谱更加完整的指纹图谱特征信息, 较好地反映中药的全貌, 能够实现在中药复杂体系中对多个组分同时进行准确的定性与定量分析, 弥补了当前色谱法选择1种或几种成分进行测定的不足^[5], 在中药质量控制中具有潜在的重要价值, 为中药质量评价提供了新途径。

1 三维荧光技术的优点

荧光光谱是目前一种重要且有效的光谱分析手段(ATLD), 其具有操作简便、灵敏度高、选择性好、动态线性范围宽、重现性好等优点^[6], 可对荧光组分进行定性与定量分析。

[△] **[基金项目]** 浙江中医药大学校级科研基金项目(2019ZR21)

* **[通信作者]** 朱炳祺, 讲师, 研究方向: 中药质量分析; E-mail: bingqizhu@163.com

三维荧光技术是20世纪80年代在荧光光谱分析的基础上发展衍生出来的一种新分析技术^[7]。三维荧光图谱包含激发波长、发射波长和荧光强度3种信息,描述了荧光强度随激发波长和发射波长变化的关系,可以直观地表示荧光强度、荧光峰位置及荧光强度变化趋势,能提供比常规荧光图谱更为丰富的信息,更加完整地描述荧光物质的荧光特性。

三维荧光图谱在速度快、成本低、专属性强、前处理简单等优点的基础上,能够更加全面地反映一个复杂物质的光谱信息,并且具有较高的测量灵敏度,对分子的结构也具有较好的选择性^[8],这些优点都使其应用范围越来越广^[9]。

2 三维荧光技术结合化学计量学方法

三维荧光技术虽能获得丰富的化合物光谱信息,但要实现在复杂分析体系中的多组分同时定性定量分析和动力学实时解析等作用,则需将其与化学计量学相结合,通过解析测量数据最大限度地获取有效信息,提高对复杂体系的分析能力^[10],这也是目前一个重要的发展方向^[11]。

2.1 平行因子分析法(PARAFAC)

PARAFAC是基于三线性分解理论,采用交替最小二乘法实现的一种数学模型,结合三维荧光图谱进行分析可有效地对重叠的化合物光谱信息进行识别和分离^[12-13]。

杨莉等^[14]采用三维荧光并结合PARAFAC对绞股蓝中的槲皮素含量和回收率进行测定,实际质量浓度与相对质量浓度的相关系数为0.999 2,平均回收率达到96.3%。结果说明PARAFAC具有快速、简便、高效及成本低等特点,适用于复杂成分的定性及定量分析。杨莉等^[15]采用三维荧光并结合PARAFAC对蛇床子中蛇床子素进行定性及定量分析,测得蛇床子中蛇床子素的回收率为103.6%,所得蛇床子素解析光谱和真实光谱几乎完全重合。结果显示,三维荧光技术结合PARAFAC可以在有未知干扰组分共存的情况下对特定组分进行准确而有效的定性及定量分析。

2.2 交替三线性分解(ATLD)算法

ATLD算法是基于交替最小二乘原理提出的多维校正方法^[16]。ATLD算法在PARAFAC的基础上,引入切尾奇异值分解的Moore-Penrose广义逆计算,

弥补了PARAFAC对组分数敏感的缺陷^[17]。ATLD算法简便、高效,且可以在复杂体系中对多个特定组分同时进行快速且准确的定性与定量分析^[16]。

曹津津^[18]用ATLD算法解析白屈菜提取液的系列溶液与白屈菜红碱对照溶液的三维荧光数阵,得到的白屈菜红碱的相对光谱与真实光谱几乎完全吻合。结果表明,在中药提取液的复杂组分中,可通过ATLD算法得到目标组分准确的相对光谱及有效的数学分离。赵佳佳等^[19]采用三维荧光技术结合ATLD算法在有未知荧光干扰物存在的情况下,有效分辨出陈皮中辛弗林的发射光谱和激发光谱,并快速测定其含量,经高效液相色谱法验证后,2种方法测得结果较为一致,由此说明ATLD算法准确可靠。

2.3 其他算法

樊凤杰等^[20]采用局部线性嵌入(LLE)算法对补虚类中药三维荧光光谱数据进行特征提取,结果表明,采用LLE算法提取特征时,通过寻找高维数据中所隐藏的低维流形结构进行特征提取,能够使降维后的数据保持原有的拓扑结构,在选择合理的近邻点数和本征维数的基础上,可以得到较好的嵌入结果。

马帅^[21]采集不同产地纯葛根的三维荧光光谱数据,采用多维主成分分析(M-PCA)及N维偏最小二乘法-判别分析(N-PLS-DA)2种多维模式识别方法分别对数据进行分析处理。结果显示,M-PCA和N-PLS-DA能够较为准确地对不同产地纯葛根进行分类识别。

轩凤来^[22]采用总体平均经验模态分解(EEMD)算法对人参溶液的三维荧光光谱进行降噪处理,并将该方法与小波分解与重构、经验模态分解算法进行比较,验证了EEMD算法的优越性。

三维荧光技术结合化学计量学方法可以实现对复杂体系中多组分目标物的直接、快速、精准的定量分析,已取得了较大进展。2种方法的结合为中药质量评价领域提供了一种快速且“绿色”的方法,在今后的分析领域必将有重要的应用价值^[15]。

3 三维荧光技术在中药定性鉴定与定量分析中的应用

三维荧光技术为中药材质量评价检测提供了一种新的途径,在中药材定性定量分析中发挥了巨大

优势。魏永巨等^[23]采用三维荧光技术研究了一些中草药或中成药,通过比较中药粉末或提取液的三维荧光指纹图谱的形状、荧光强度、荧光峰位置等信息,可以鉴别中药中的不同组分。实验表明,三维荧光技术测定结果可靠,所得图谱可比性强、重现性好,适用于中药的真伪鉴别和质量评价。近年来,已有越来越多研究者开始重视三维荧光技术已在中药质量评价中的应用。

3.1 中药材的真伪品鉴定

不同的物质具有不同的三维荧光指纹特性,可对比待测中药材与对照药材的三维荧光图谱,区分中药材是否掺杂伪品。陈立弟等^[24]建立了 β -环糊精增敏三维荧光法鉴定五指毛桃的方法。在优化 β -环糊精敏化条件下,将三维荧光图谱特征、特征荧光峰位置、荧光强度作为五指毛桃指纹图谱鉴定的参考依据,发现某一品种没有五指毛桃的特征峰,表明是一种伪品,与生药学鉴定的结果一致。实验表明,三维荧光技术可应用于五指毛桃真伪品的快速鉴别。李雷等^[5]提出基于三维荧光技术的丹参及其伪品的鉴别方法。实验通过三维荧光技术对丹参溶液与含有1种或多种伪品的丹参溶液进行测定,所得三维荧光光谱图具有显著的区分度,充分说明三维荧光技术可以有效鉴定丹参粉是否掺杂伪品。实验表明,三维荧光技术适用于多组分复杂体系的检测与分析,能够为中药材的真伪品鉴定提供参考。白雪梅等^[25]采用三维荧光光谱结合ATLD算法测定了徐长卿药材中丹皮酚的含量,经过高效液相色谱法验证后,2种方法所得结果基本一致。实验结果表明,三维荧光结合化学计量学方法相对传统方法更为快速、简单,可用于复杂体系中特定组分的定性与定量分析。

3.2 中药材的商品等级鉴别

中药材的化学成分复杂,目前对不同商品等级中药材的区分还停留在“辨状论质”的阶段,但其性状差异并不大。利用三维荧光技术可对中药材不同商品等级进行定性鉴别。穆希琼等^[26]采用三维荧光技术对不同商品等级纹党参的固体粉末进行检测并对其进行定性鉴别。结果表明,不同商品等级的纹党参固体粉末三维荧光光谱图中只出现1个荧光峰,荧光峰的激发波长相似,发射波长均为550 nm,但荧光强度有明显区别,即荧光强度与商品等级呈

正相关,由此可利用三维荧光技术区分纹党参的不同商品等级数。

3.3 中成药的质量评价

中成药是以中药材为原料制成的一定剂型的中药制品,可利用三维荧光技术和结合聚类分析法建立中成药的三维荧光图谱,用于中成药的质量评价。朱丹丹等^[27]采用三维荧光技术对清热散结胶囊的荧光性质进行研究,并对实验条件进行优化,测定了不同厂家、不同批号的56个清热散结胶囊样本的三维荧光图谱,采用聚类分析法对其一致性进行分析。结果表明,56个清热散结胶囊样本的三维荧光图谱一致性良好,为清热散结胶囊的质量评价提供了良好的实验基础。乔淞汾^[28]对健脾和胃类、祛风湿类和清热类中成药的三维荧光图谱进行研究,结合聚类分析和主成分分析技术考察了各类中成药的一致性,并采用平均值法分别建立了各类中成药的三维荧光图谱,为中成药的质量评价提供一种方便、快捷、可靠的方法。

目前,三维荧光技术在中药研究中的应用仍不够广泛,但由上述研究看来,三维荧光技术有望发展为中药质量评价的常规方法。

4 三维荧光技术在中药质量评价中的局限性

三维荧光技术虽具有前处理简单、检测速度快、专属性强、灵敏度高、信息全面等优点,但也具有一定局限性:第一,三维荧光技术所检测的物质受到一定的限制,待测组分须具有荧光特性,其产生的荧光信息必须足以被仪器捕捉,即待测组分的分子必须具有较高的荧光效率。第二,被测组分的荧光强度在一定程度上受环境因素的影响,如温度、溶液pH、溶液中离子等。第三,对于化学结构十分相似的组分,单纯的三维荧光图谱难以分辨,无法实现其定量分析。

针对以上局限性,可以采用相应手段来弥补三维荧光技术的缺陷。

首先,熟悉目标组分的自身理化特性,对于产生荧光较弱的组分,可利用某些金属离子与其形成络合物,以达到增强荧光效率的效果。杨菲^[29]通过比较中药活性成分丹皮酚、原儿茶酸和没食子酸与硼砂或铝离子反应前后的荧光光谱,发现在一定条件下,这3种中药活性成分可以与硼砂或铝离子发生络合反应,使反应体系的荧光显著增强。

其次,通过实验探索中药材有效组分的最佳测定条件,可运用缓冲溶液调节溶液pH,以减小环境因素的影响。崔香等^[30]将青海大黄作为实验材料,在不同pH的乙酸-乙酸钠缓冲溶液中加入一定质量浓度的青海大黄水浸液后对其进行荧光扫描。结果表明,荧光强度随大黄水浸液质量浓度的减小而减小,荧光强度与其质量浓度具有良好的线性关系。当缓冲溶液的pH为2.6~4.2时,荧光强度随着pH的增大而增大;当缓冲溶液的pH为4.2~5.8时,荧光强度随着pH的增大而减小;当缓冲溶液的pH为4.8~5.2时,荧光强度几乎不变。该实验确定了大黄水浸液三维荧光图谱的测定条件,为其有效成分的定量分析提供了新方法。

第三,结合并改进化学计量学方法,提高对复杂物质的解析能力。三维荧光技术结合化学计量学方法避免了繁琐的物理分离步骤,有助于改善复杂体系中存在的干扰和组分光谱重叠引起的难以分辨和定量分析问题,在中药材的定性定量分析中具有广阔的前景。

5 三维荧光技术的前沿应用及对中药质量评价的指导

三维荧光技术检测快速、预处理简单、灵敏度较高、选择性良好,现已广泛应用于医药、能源、环境、食品等各个领域,在中药质量评价的应用中起指导作用。

5.1 能源利用

通过对油气和煤炭等重要能源物质进行光谱信息采集和分析,对能源勘探和利用提供了科学支持。沈海东等^[31]利用三维荧光技术对不同类型样品进行光谱分析,发现荧光光谱强度与芳烃含量成正比,对此可在钻井剖面连续进行三维荧光光谱分析,根据荧光强度的逐渐变强与变弱找出油气成熟度界面,展现了三维荧光光谱技术在油气勘探中具有良好的应用前景。范俊佳等^[32]通过三维荧光技术分析采自沁水盆地及淮北煤田的煤岩样品的光谱特征,研究了煤岩三维荧光光谱特征与镜质体反射率之间的关系。实验表明,三维荧光技术可以高效快速地评价煤岩成熟度,而且不受煤岩中镜质组分含量限制,在煤岩成熟度的确定方面有着广泛的应用前景。

5.2 环境监测

水体中由于不同有机污染物存在而产生特征荧光光谱,成为了判断水体污染情况的重要依据。王彦青^[33]引进三维荧光技术辅助水资源的污染检测工作,并采用三维荧光光谱法与传统方法针对同一污水进行检测,发现三维荧光光谱法针对污水的有害物质检测正确率平均值可达到86.3%,而传统检测正确率的平均值为78.0%,三维荧光光谱法检测正确率明显高于传统方法,因此,验证了该方法的有效性。左兆陆等^[34]基于三维荧光技术,以土壤中常见石油类制品为研究对象,分别提取不同土壤样本中石油类制品的三维荧光光谱,结合化学计量学方法,对土壤中石油制品进行分类,综合识别率达到95.6%。实验证明了基于三维荧光技术直接从油污土壤中识别污染油的可行性,为识别土壤中油类污染物提供了技术支持。

5.3 食品安全

荧光灵敏的响应和快速无损的测定过程,为食品安全快速监测提供了有效途径。丛琳^[35]研究了蜂蜜的三维荧光光谱特性,基于三维荧光光谱的蜂蜜掺假智能检测算法,构建了蜂蜜掺假智能检测网络平台,为实现蜂蜜掺假的快速、现场检测提供了有力的手段。刘雪茹等^[36]将三维荧光技术应用于黄瓜表面微生物数量的快速检测,有助于实现黄瓜贮藏过程中品质变化的快速监控,并为预判黄瓜腐败提供了依据。

三维荧光技术在其他领域的成功应用可为中药材质量评价提供借鉴,其在中药研究领域的巨大作用也得到不断的发掘和应用。

6 研究前景展望

三维荧光技术已经在中药质量评价方面得到了重视,这说明其在中药研究领域具有巨大发展潜力和广阔应用前景。目前来看,三维荧光技术在中药质量评价方面的发展主要体现在以下3个方面:1)三维荧光技术与其他分析技术联用,用于中药制品的检测。联用技术已成为检测的一种必然趋势,有文献报道三维荧光技术与红外光谱法、气相色谱法、高效液相色谱法等分析技术联合用于中药注射剂的检测,提高了结果的准确性,便于对复杂体系进行分析^[37]。2)利用三维荧光技术进行中药药性模式识

别。中药中大部分分子能够产生荧光,因此,针对中药三维荧光光谱特征,从中药药性的角度出发,可构建各类中药荧光光谱分类模型,对中药进行分类识别研究^[38]。先进仪器技术的引入将极大助力中药质量评价的研究,进一步促进中医药现代化发展。

3) 三维荧光技术硬件与软件的开发。在保证准确性和可靠性的前提下,研发新的化学仪器,以提高检测效率;构建中药三维荧光指纹图谱数据库,开发相应软件,集数据采集、数据拟合和处理于一体,更加简便、直观地获得并筛选所需信息,以便推广使用。

参考文献

- [1] 张鹏. 中药质量控制相关创新技术研究[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [2] 马梅芳,李洁. 对中药质量控制的思考[J]. 中医药导报,2007,13(12):15-17.
- [3] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药,2016,47(9):1443-1457.
- [4] 唐心亮,吴希军,李树军. 三维荧光光谱和主成分分析法在茶叶品质鉴别中的应用研究[J]. 河北科技大学学报,2009,30(4):305-309.
- [5] 李雷,韩彩琴,刘莹,等. 基于三维同步荧光光谱鉴定丹参及其伪品[J]. 光电子·激光,2019,30(11):1231-1238.
- [6] 田丽平. 几种中药及其有效成分的光谱性质研究[D]. 石家庄:河北师范大学,2008.
- [7] 陈银节,缪九军,张宗元. 三维荧光光谱的油气指示意义[J]. 天然气地球科学,2005,16(1):69-72.
- [8] 王雅娜,崔励,徐同宽,等. 三维荧光光谱的应用研究[J]. 分析试验室,2008,27(增1):59-62.
- [9] 刘小静,吴晓燕,齐彩亚,等. 三维荧光光谱分析技术的应用研究进展[J]. 河北工业科技,2012,29(6):422-425.
- [10] 盖云,鲍成满,叶树明,等. 化学计量学方法在三维荧光光谱分析中的应用[J]. 光谱学与光谱分析,2011,31(7):1828-1833.
- [11] GÓMEZ V, CALLAO M P. Analytical applications of second-order calibration methods[J]. Anal Chimica Acta, 2008,627(2):169-183.
- [12] RASMUS, BRO. PARAFAC. Tutorial and applications[J]. Chemom Intell Lab Syst, 1997,38(2):149-171.
- [13] BRO R, KIERS H A L. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models[J]. J Chemometrics, 2003,17(5):274-286.
- [14] 杨莉,刘德龙,魏永巨. 三维荧光结合二阶校正法测定绞股蓝中槲皮素含量[J]. 分析测试学报,2014,33(9):1038-1043.
- [15] 杨莉,刘德龙,魏永巨. 三维荧光结合二阶校正法测定蛇床子及人体血浆中蛇床子素的含量[J]. 分析试验室,2015,34(1):22-26.
- [16] 吴海龙,李勇,康超,等. 三维荧光化学多维校正方法研究新进展[J]. 分析化学,2015,43(11):1629-1637.
- [17] 苏志义,吴海龙,刘亚娟,等. HPLC-DAD结合交替三线法分解二阶校正方法进行中药葛根中主要有效成分同时测定[J]. 化学学报,2012,70(4):459-464.
- [18] 曹津津. 中药白屈菜、两面针药效成分的三维荧光二阶校正分析法研究[D]. 石家庄:河北师范大学,2015.
- [19] 赵佳佳,刘德龙,魏永巨. 三维荧光二阶校正法测定中药陈皮中辛弗林含量[J]. 时珍国医国药,2016,27(2):266-268.
- [20] 樊凤杰,轩凤来,白洋,等. 基于LLE-RF的中药三维荧光光谱分类识别[J]. 计量学报,2020,41(2):263-268.
- [21] 马帅. 多维模式识别用于中药产地溯源研究[D]. 郑州:河南工业大学,2019.
- [22] 轩凤来. 基于三维荧光光谱特征的中药可视化模式识别研究[D]. 秦皇岛:燕山大学,2019.
- [23] 魏永巨,刘翠格. 中药三维荧光指纹图谱及其分析应用研究[C]//山西省化学学会. 第八届全国发光分析暨动力学分析学术研讨会论文集. 太原:山西省化学学会,2005:122.
- [24] 陈立弟,文震,陈庆,等. β -环糊精增敏三维荧光法鉴别真伪五指毛桃[J]. 现代食品科技,2017,33(5):293-297.
- [25] 白雪梅,刘德龙,魏永巨. 三维荧光光谱结合交替三线法分解算法测定徐长卿药材中丹皮酚的含量[J]. 中国药房,2017,28(15):2089-2092.
- [26] 穆希琼,戴迪,远俊洋,等. 三维荧光光谱法鉴别不同商品等级党参固体粉末的研究[J]. 时珍国医国药,2019,30(4):888-891.
- [27] 朱丹丹,乔淑汾,李鑫,等. 清热散结胶囊三维荧光指纹图谱研究[J]. 河北省科学院学报,2020,37(1):55-60.
- [28] 乔淑汾. 三维荧光图谱在几种中成药鉴别中的应用[D]. 石家庄:河北师范大学,2020.
- [29] 杨菲. 硼、铝敏化荧光法测定中药成分丹皮酚、原儿茶酸和没食子酸[D]. 石家庄:河北师范大学,2008.
- [30] 崔香,李海青,邓晓梅. 中药大黄水浸液的三维荧光光谱分析[J]. 安徽农业科学,2009,37(22):10503-10504.
- [31] 沈海东,白玉洪,郑华. 三维荧光光谱分析技术和应用[J].

- 海洋石油,2017,37(2):61-65.
- [32] 范俊佳,柳少波,刘可禹,等. 利用三维荧光光谱技术确定煤岩成熟度的初步研究[J]. 科学技术与工程,2015,15(34):139-143.
- [33] 王彦青. 基于三维荧光光谱法的水污染检测方法研究[J]. 科技创新导报,2020,17(17):122-123.
- [34] 左兆陆,赵南京,孟德硕,等. 基于三维荧光光谱的土壤中石油类有机物分类识别[J]. 激光与光电子学进展,2019,56(22):188-194.
- [35] 丛琳. 基于三维荧光光谱的蜂蜜掺假智能检测技术研究[D]. 天津:天津工业大学,2019.
- [36] 刘雪茹,李欣,殷勇,于慧春,袁云霞,李孟丽. 黄瓜贮藏中微生物信息3D荧光判别及其数量监控模型构建[J/OL]. 食品科学:1-12[2020-09-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200601.1417.056.html>.
- [37] 陈光勇,陈旭冰,刘光明,等. 浅析中药注射剂的检测现状[J]. 大理学院学报,2011,10(8):17-20.
- [38] 樊凤杰,轩凤来,白洋,等. 基于三维荧光光谱特征的中药药性模式识别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2020,40(6):1763-1768.

(收稿日期:2020-05-20 编辑:王笑辉)