

近红外光谱技术在生物学研究中的应用

梁 亮^{1,2}, 刘志霄^{1*}, 杨敏华², 汪承华¹, 丁宇晶¹, 易浪波¹

(1. 吉首大学 生物资源与环境科学学院, 中国湖南 吉首 416000;

2. 中南大学 信息物理工程学院, 中国湖南 长沙 410083)

摘 要: 分析了利用近红外(NIR)光谱技术进行生物学研究的原理与优势, 概述了这一技术在生物体成分的定量分析、生物生理与病理信息的获取以及分类鉴定等领域中的应用, 并讨论了其在生物学研究中的局限性与前景.

关键词: 近红外; 生物; 定量分析; 分类鉴定

中图分类号: Q58

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2007)S1-0025-04

The Application of the Technique of Near-infrared Spectroscopy in Biology

LIANG Liang^{1,2}, LIU Zhi-xiao^{1*}, YANG Min-hua², WANG Cheng-hua¹,
DING Yu-jing¹, YI Lang-bo¹

(1. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, Hunan, China;

2.School of Info-Physics and Geomatics Engineering, Central South University, Changsha 410083, Hunan, China)

Abstract: The principle and predominance of the near-infrared (NIR) spectroscopy technology applying in biology were analyzed. The application of measuring the organism component, acquire the physiological and pathological information of the life-form, classifying and identifying the biology were summarized. Finally, the limitation and perspective of applying NIR technology in biology were discussed.

Key words: NIR; biology; qualitative analysis; classification

(Life Science Research, 2007, 11(4) S1:025~028)

近红外光谱技术系指利用近红外(NIR)光获取样品信息以进行分析的手段^[1], 近年来被广泛应用于矿物识别, 污染物跟踪监测, 土壤成分、石化产品、纺织品以及食品的分析与检测等多个领域, 成为当前国际上的研究热点^[2]. 并以其高效和无损伤的特点, 在生物学研究方面发挥越来越重要的作用, 被公认为“多能分析技术”与“绿色分析技术”. 但相关成果散见于农业、食品与医学等领域, 尚未有相关文献从生物学的角度进行论述. 本文就近红外光谱分析技术在生物学研究中的应用作一概述.

1 应用于生物学研究的理论基础与优势

近红外光谱(NIR, 780~2526 nm)记录的是分子中单个化学键基频振动的倍频与合频信息, 并受含氢基团倍频和合频的重叠所主导, 因此在近红外光谱范围内, 可获取样品中有机分子含氢基团的特征信息. 由于这一特性, 使几乎所有的有机物在近红外区都有特征吸收信号, 从而使近红外光谱技术在生物学研究的应用中具有巨大的潜力.

获得近红外光谱主要有透射、反射两种技术. 透射光谱技术是根据透射光与入射光强度的比例

收稿日期: 2007-08-01; 修回日期: 2007-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30570279); 吉首大学科研项目(05JDX049)

作者简介: 梁亮(1981-), 男, 湖南娄底人, 中南大学信息物理工程学院遥感生物量测专业博士研究生, E-mail: liangliang198119@163.com;

刘志霄(1965-), 男, 湖南蓝山县人, 吉首大学教授, 通讯作者, 主要从事生物学研究, E-mail: zlxj@jzu.edu.cn

以获取物质在近红外区的吸收光谱, 要求样品无混浊, 否则光在其中产生散射, 透射光强度与样品浓度之间的关系不符合 Beer 定律, 因此在液体样品(如血液中的氧浓度)的测量中应用较多. 而固体生物样品大多不透明, 形状也不规则, 因此常使用漫反射分析法, 即根据漫反射光与入射光强度的比例关系以获取样品在近红外区的吸收光谱而对样品进行分析^[9].

近红外光谱技术在生物学研究中存在以下优势: 1) 样品不需要进行预处理, 可实现无损伤检测; 2) 所获取的是样品的综合信息, 并可通过建立数学模型对样品成分含量进行定量预测; 3) 可同时获取样品中多种成分的含量, 且同一样本可以重复测量; 4) 可通过光纤实现远距离测量, 并可应用于各种形态的样品. 因此, 对生物这类成分复杂, 又经常要求非离体、无损伤测量的对象而言, 近红外光谱技术是一理想的方法^[4].

2 生物体营养成分的测定

2.1 基本技术流程

利用红外光谱技术进行生物体组分的定量测量主要经过以下 5 个步骤: 1) 选择校正样品集; 2) 获得校正集近红外分析信号, 并以标准方法测出相对应的成分含量; 3) 对信号进行数学处理, 建立样品光谱与各成分含量间的数学模型; 4) 检验、校正模型; 5) 获取待测样品的近红外光谱图, 利用模型计算出各成分的含量.

2.2 生物体水分含量的测定

由于水分子中含可被近红外光所吸收的特征基团(H=O 基团), 因此, 通过建立光谱信息与生物体组织水分含量的定量化关系模型, 可实现生物体水分的非离体测量, 从而了解生物是否处于缺水状态. Tucker 与 Penuelas 等人曾找出了叶片水分状况与光谱反射之间的特定关系, 提出了水分指数(R900/R970)可用于植株的水分监测^[5,6]. 目前, 此方法已成功应用于小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)、大丁草(*Gerbera anandria*)及大豆(*Glycine max*)等植物叶片水分含量的非损伤性测量^[7,8]. 而 Ceccato^[9]等人利用航空和卫星遥感技术, 在宏观尺度上对植被水分状况进行监测的研究也获得了初步的成功. 这一系列的研究成果表明, 在实际应用层面上, 利用近红外光谱技术测定生物体水分含量, 在近距离遥感与航天遥感中都是可行的.

2.3 生物体有机营养元素的测定

由于近红外光谱特征主要由含氢基团所决定, 某一特定营养成分含量常与近红外光谱的某些波段呈相关关系, 因此, 通过建立数学模型, 可利用生物近红外光谱信息定量测定有机营养成分的含量. 这一方法首先在农产品的分析中获得应用. Stephen^[10]等利用近红外光谱在完整颗粒小麦中蛋白质的测定获得了与凯氏法相近的结果, 并被认定为小麦中蛋白质测定的标准方法. 随后 Blakeney^[11]与 Vines^[12]等研究者将其成功地应用于谷物淀粉、蛋白质以及脂肪的定量分析.

目前, 这一技术已广泛应用于大豆(*Glycine max*)、油菜(*Brassica napus*)中脂肪与蛋白质等营养成分的测定以及茶叶(*Camellia japonica*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)等常规成分的分析^[13-16]. 而在水蜜桃(*Amygdalus persica*)等水果糖份与有效酸度的含量、新鲜甜瓜(*Cucumis melo*)糖分含量、西红柿(*Lycopersicon esculentum*)柠檬酸等物质含量的测定, 甘蔗(*Saccharum officinarum*)汁和糖蜜中果糖等品质成分的分析方面, 近红外光谱也获得了成功的应用^[17-20]. 近红外光谱分析技术在各种生物种类不同组分分析中的成功应用, 表明它不但具有快速无损的优点, 还有适应性广的特点, 可成为多种有机体营养成分常规测量的替代技术.

3 生物生理与病理信息的获取

3.1 动物生理与病理信息的获取

动物生理与病理信息的获取主要利用透射光谱技术. 由于在近红外波段内, 影响组织光吸收系数的主要是血红蛋白(hemoglobin)的含氧状态和浓度, 因此, 利用近红外光谱技术可获得与组织代谢活动密切相关的血液动力学信息, 从而判断组织内与血氧浓度密切相关的各种生化、生理以及病理状况^[21].

这一研究方法起始于 1977 年美国科学家 Jobsis^[22]用近红外光谱观测猫(*Felis silvestris*)头部的血氧变化, 之后在动物生理学与生物医学等领域获得了广泛的应用. 但由于光在动物体组织内的传播和分布具有随机性, 无法从所测得的光密度衰减光谱直接得到毛细血管内血液的吸收光谱, 因此早期的研究报道仅描述了组织内还原血红蛋白浓度和含氧血红蛋白浓度的随时间变化过程. 后续研究主要沿 3 种思路: 一种是从基本的朗伯-比尔定律出发, 直接由动物实验或人体实验数据确

定光衰减系数^[23];一种是对朗伯-比尔定律进行适当修正,通过实验方法事先测定光在生物组织中传播的平均光路长以确定演算式中的各项系数^[24];还有一种是利用光散射理论直接推算生物组织的吸收系数以求得组织血氧浓度的绝对值^[25]。

3.2 植物生理与病理信息的获取

植物一旦染病,不论是由外源物质的入侵还是内部的病变所引起,都会导致生物体化学成分含量的改变,从而使生物体近红外光谱发生改变。因此,可用近红外光谱获取植物的生理与病理信息。这一方法是在对农作物病害的遥感监测中发展起来的。在国外,这一技术已应用于对甜菜丛根水稻病、小麦营养缺乏症遥感监测以及对紫花苜蓿等牧草发病后引起的产量损失进行遥感评估^[26, 27]。而我国学者安虎、吴曙雯等也对以近红外光谱技术进行冬小麦条锈病与水稻叶瘟病监测的可行性进行了研究^[28, 29],结果表明以近红外光谱对农作物进行病理监测是可行的,但在野外如何实施则有待进一步探讨。

4 生物的分类鉴定

生物样本中所含的化学成分不同,表现在近红外光谱上就是峰位、峰数及峰强的特异性,从而使近红外光谱具有指纹性。虽然这些差异可能无法用肉眼观察到,但将光谱通过相关的数学方法处理后,这些隐藏的差异信息可由统计软件提取出来并进行分析解读,再借助计算机技术便可实现生物样本的分类鉴定。目前,研究者已将这一技术成功应用于丹参(*Salvia miltiorrhiza*)、白芷(*Angelica dahurica*)、蛇床子(*Cnidium monnieri*)、蝼蛄(*Gryllotalpa orientalis*)等中药材真伪与产地的鉴别^[30, 33]。而对阿魏亚族(*Ferulineae*)与前胡族(*Peucedaneae*)植物样本所进行的分类以及蓝桉(*Eucalyptus globulus*)和大叶桉(*Eucalyptus robusta*)果实所进行鉴别的研究,也获得了与传统方法接近的结果^[34, 36]。

从生物体成分组成的角度而言,生物地域、品系以及种属间的区别是由多种化学成分含量差异的综合所引起,这些差异单独而言可能是非常微小的,因此,如果用常规的分析方法,不但过程复杂,而且难以取得理想的结果。而采用近红外光谱技术,结合化学计量学中主成份分析等方法可提取这些光谱差异的综合信息,从而利用“暗箱”分析理论直接得出分类鉴定的结果。既避免了烦

琐的化学分析过程,又可取得较可靠的结果。

5 局限性与前景

近红外光谱信息量虽然丰富,但信息强度比中红外区低,属于从复杂、重叠、变动的背景中提取弱信息,检测限只能达到0.1%,不适于直接测定生物体中激素类等低浓度物质。其次,在定量分析中,近红外光谱是一种相关测定方法(二级测定方法),其准确度取决于用以进行关联的一级测定方法。且在定量分析中,样品扫描时仪器的分辨率、波长准确度、样品粒度的均匀性等扫描条件都会不同程度地影响光谱的质量,给所建立的数学模型的应用范围带来了一定的局限性。

但近来化学计量学的发展为解决这一问题奠定了数学基础,利用数学方法处理所获取的光谱信息,可提高信噪比,获取较精确的结果。而通过规范扫描条件,以最佳参数扫描建模样品,也可逐步实现近红外光谱信息的资源共享。目前,已有专家提出建立近红外光谱数据库以进行物质的鉴别,利用微生物的特征光谱实现其分类鉴定。同时,从动物粪便中获取近红外反射光谱以估测草食动物日粮组成与营养需求的研究已初步展开^[37, 38]。最近,我们通过采集高山麝粪便在可见-近红外波段的反射光谱,从而获取反映高山麝生理与病理信息的研究也已取得了初步的结果,有望为珍稀动物的非损伤性研究提供一条新的途径。随计算机科学与统计学的发展,光谱分析方法与化学计量学之间的结合日趋完善,近红外光谱技术也会获得更广泛的应用。

参考文献(References):

- [1] 陆婉珍,袁洪福,徐广通,等.现代近红外光谱分析技术[M].北京:中国石油化工出版社,2000.193.
- [2] 褚小立,袁洪福,陆婉珍.近年来我国近红外光谱分析技术的研究与应用进展[J].分析仪器,2006(2):1-10.
- [3] 高荣强,范世福.现代近红外光谱分析技术的原理及应用[J].分析仪器,2002(3):9-12.
- [4] 聂志东,韩建国,张录达,等.近红外光谱技术(NIRS)在草地生态学中的应用[J].光谱学与光谱分析,2007,27(4):691-696.
- [5] TUEKER C J. Remote sensing of leaf water content in the near infrared[J]. Remote Sensing of Environment, 1980, 10: 23-32.
- [6] PENUELAS J, PINOL J, OGAYA R. Estimation of plant water concentration by the reflectance water index WI (R900 / R970) [J]. International Journal of Remote Sensing, 1997, 18: 2869-2875.
- [7] 田庆久,宫鹏,赵春江,等.用光谱反射率诊断小麦水分状况

- 的可行性分析[J]. 科学通报, 2000, 45(24): 2645-2650.
- [8] 田永超, 曹卫星, 姜东, 等. 不同水氮条件下水稻冠层反射光谱与植株含水率的定量关系[J]. 植物生态学报, 2005, 29(2): 318-32.
- [9] CECCATO P, FLASSE S, TARANTOLA S. Detecting vegetation leaf water content using reflectance in the optical domain[J]. Remote Sensing of Environment, 2001, 77: 22-33.
- [10] STEPHEN R, DELWICHE C F. Protein contain measurement in hard red wheat by near infrared spectroscopy on whole grain: collaborative study[J]. Cereal Chemistry, 1995, (1): 42.
- [11] BLAKENEY A B, FLINN P C. Determination of non-starch polysaccharides in cereal grains with near-infrared reflectance spectroscopy[J]. Mol Nutr Food Res, 2005, 49(6): 546-550.
- [12] VINES L L, KAYS S E, KOEHLER P E. Near-infrared reflectance model for the rapid prediction of total fat in cereal foods[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53(5): 1550-1555.
- [13] 李宁, 闵顺耕, 覃方丽, 等. 近红外光谱法非破坏性测定黄豆籽粒中蛋白质、脂肪含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(1): 45-49.
- [14] 杨翠玲, 赵兴忠, 陈文杰, 等. 近红外(NIRS)技术分析小样品油菜籽芥酸和含油量的应用研究[J]. 分析测试学报, 2007, 26(1): 29-33.
- [15] 李晓丽, 何勇, 裴正军. 一种基于可见-近红外光谱快速鉴别茶叶品种的新方法[J]. 光谱与光谱分析, 2007, 27(2): 279-282.
- [16] 何智慧, 练文柳, 吴名剑, 等. 声光可调-近红外光谱技术分析烟草主要化学成分[J]. 分析化学, 2006, 34(5): 702-704.
- [17] 刘燕德, 应义斌. 水蜜桃糖度和有效酸度的近红外光谱测定法[J]. 营养学报, 2004, 26(5): 400-402.
- [18] SUGIGAMA J. Visualization of sugar content in the flesh of a melon by NIR taming[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(7): 2713-2715.
- [19] 金同铭. 非破坏评价西红柿的营养成分[J]. 仪器仪表与分析监测, 1997, (2): 32-36.
- [20] 曹干, 周学秋. 近红外光谱法快速测定甘蔗蔗汁蔗糖分的研究[J]. 甘蔗, 2001, 8(3): 20-25.
- [21] 相韶霞, 林凌, 王艳秋, 等. 近红外光谱组织血氧检测结果的量化方法[J]. 光学技术, 2001, 27(5): 451-454, 458.
- [22] JOBSIS F F. Noninvasive infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters[J]. Science, 1977, 168: 1264-1267.
- [23] HAZEKI AND TAMURA M. Quantitative Analysis of hemoglobin state of rat brain in vivo by near-infrared spectrophotometry[J]. J Biochem, 1988, 103: 796-802.
- [24] DELPY D T, COPE M. Estimation of optical path length through tissue from direct time of flight measurement[J]. Phys Med Biol, 1988, 33: 1433-1442.
- [25] FARRELL T J, PAUERSON M S. A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the non-invasive determination of tissue optical properties in vivo[J]. Med Phys, 1992, 19(4): 879-888.
- [26] STEDDOM K, HEIDEL G, JONES D, et al. Remote detection of rhizomania in sugar beets[J]. Phytopathology, 2003, 93: 720-726.
- [27] AYAL A-SILVA T, BEYL C A. Changes in spectral reflectance of wheat leaves in response to specific macronutrient deficiency[J]. Adv Space Res, 2005, 35(2): 305-317.
- [28] 安虎, 王海光, 刘荣英, 等. 小麦条锈病单片病叶特征光谱的初步研究[J]. 中国植保导刊, 2005, 25(11): 8-11.
- [29] 吴曙雯, 王人潮, 陈晓斌, 等. 稻叶瘟对水稻光谱特性的影响研究[J]. 上海交通大学学报, 2002, 20(1): 73-76, 84.
- [30] 刘沐华, 张学工, 孙素琴. 中药材产地的近红外光谱自动鉴别和特征谱段选择[J]. 科学通报, 2005, 50(4): 393-398.
- [31] 吴拥军, 李伟, 相秉仁, 等. 近红外光谱技术用于白芷类中药的鉴定研究[J]. 中药材, 2001, 24(1): 26-28.
- [32] 刘国林, 蔡金娜, 李伟, 等. 近红外光谱技术在中药蛇床子分类中的应用[J]. 计算机与应用化学, 2000, 17(2): 109-110
- [33] 魏道智, 郭澄, 吴秋业, 等. 蜈蚣的近红外光谱鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(7): 639-640.
- [34] 李睿, 李伟, 白云飞, 等. 近红外光谱分析在中国伞形科阿魏亚族植物分类中的应用[J]. 西北植物学报, 2000, 20(4): 666-670.
- [35] 吴拥军, 李伟, 相秉仁, 等. 光纤近红外漫反射光谱技术在前胡植物分类中的应用探讨[J]. 计算机与应用化学, 2000, 17(2): 111-112.
- [36] 刘玉明, 柴逸峰, 亓云鹏, 等. 近红外光谱和聚类分析法无损快速鉴别蓝莓果实[J]. 中成药, 2004, 26(12): 1049-1051.
- [37] LEITE E R, STUTH J W. Fecal NIRS equations to assess diet quality of free-ranging goats[J]. Small Rumin Res, 1995(15): 223-230.
- [38] 李宏, 莫放, 白可喻. 应用锦羊粪便的近红外光谱方程评定其日粮的粗蛋白[J]. 饲料研究, 2004(6): 1-3.