

红外光谱结合判别分析对滇重楼生长年限的鉴别

杨会云¹, 刘飞^{1*}, 杨春艳¹, 道永艳¹, 王元忠²

(1. 玉溪师范学院, 云南 玉溪 653100; 2. 云南省农业科学院 药用植物研究所, 昆明 650200)

[摘要] 目的:建立滇重楼生长年限的鉴别方法,为滇重楼的质量控制提供参考。方法:利用傅里叶变换红外光谱技术测试了同一产地7种不同生长年限的68株重楼主根木质部和表皮样品的红外光谱,利用Omnice.0软件计算样品的二阶导数光谱和四阶导数光谱,分别以主根木质部和表皮在1 800~900 cm⁻¹的红外光谱、二阶导数红外光谱和四阶导数红外光谱数据为样品特征,采用Mahalanbis距离逐步判别分析法,依据Fisher线性判别准则建立重楼生长年限的判别模型,对未知生长年限的样品进行鉴别比较。结果:四阶导数光谱比其他级别的光谱鉴别效果好,表皮光谱比木质部光谱的鉴别效果好;利用表皮的四阶导数光谱数据建立判别分析模型对重楼的生长年限进行鉴别时,训练样本回判正确率100%,测试样本预测正确率78.6%,总正确率95.6%。结论:傅里叶变换红外光谱结合逐步判别分析法可鉴别重楼的生长年限,为生产实践中预测重楼的生长年限提供了一种新思路。

[关键词] 红外光谱; 判别分析; 重楼; 生长年限; 木质部; 表皮

[中图分类号] R282.5; R282.71; R284.1; R931.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0035-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150035

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150610.0948.006.html>

[网络出版时间] 2015-06-10 9:48

Identification of Paridis Rhizoma with Different Growing Years by Infrared Spectroscopy Combined with Discriminant Analysis YANG Hui-yun¹, LIU Fei^{1*}, YANG Chun-yan¹, DAO Yong-yan¹, WANG Yuan-zhong²
(1. Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China; 2. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method to identify growing years of Paridis Rhizoma, in order to provide basis for quality control of this plant. **Method:** A total of 68 epidermises and xylems of taproot samples with seven different growing years of Paridis Rhizoma from the same origin was analyzed by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. The second derivative spectra and fourth derivative spectra of these tested samples were obtained by Omnice.0 software. With the infrared spectra, the second derivative spectra and the fourth derivative spectra of epidermises and xylems of taproot samples ranging between 1 800 and 900 cm⁻¹ as the sample characteristics, the discriminant model of growing years of Paridis Rhizoma was established by Mahalanbis distance gradual discriminant analysis method on the basis of Fisher linear discriminant criterion, in order to identify and compare these tested samples with unknown growing years. **Result:** The fourth derivative spectra had a better discrimination effect than other types of infrared spectra, while epidermises samples had a better discrimination effect than xylems samples. Moreover, the discriminant analysis model was established based on the fourth derivative spectra of epidermises to identify growing years of Paridis Rhizoma, with the return discriminant accuracy of training samples of 100%, the predicted accuracy of tested samples of 78.6% and a total accuracy of 95.6%. **Conclusion:** FTIR combined with gradual discriminant analysis can be utilized to identify growing years of Paridis Rhizoma and provide a new method for prediction of growing years of Paridis Rhizoma in the production practice.

[Key words] infrared spectroscopy; discriminant analysis; Paridis Rhizoma; growing years; xylem; epidermises

[收稿日期] 20150204(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460584);云南省大学生创新创业训练计划项目(201411390003)

[第一作者] 杨会云,从事生物红外光谱研究, Tel:14787775705, E-mail:779826468@qq.com

[通讯作者] *刘飞, 硕士, 副教授, 从事生物红外光谱研究, Tel:13987701535, E-mail:yxtelf@163.com

重楼为百合科植物云南重楼或七叶一枝花的干燥根茎^[1],主产于云南,生长在海拔 1 400~3 100 m 的松林、竹林、常绿阔叶林、灌木林背阴处及阴湿山谷中^[2],气微,味微苦、麻,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊等功效^[1]。重楼富含甾体皂苷、黄酮苷、脂肪酸酯、植物内生真菌等活性成分,其中甾体皂苷是主要活性成分,占总成分的 80% 以上^[3]。药理学研究发现重楼中活性成分具有抗癌、抗菌消炎、止血镇痛、驱虫、收缩子宫等作用,已被广泛应用于临床治疗中,是云南白药、宫血宁和季德胜蛇药片等中成药的主要药效成分^[3-7]。重楼的繁殖率低,其药用部位主根的自然生长速度十分缓慢,一般从种子发芽到生长成药约需 7 年^[4-5]。研究表明重楼药材的品质与生长年限和采收时间相关,生长年限越长,药用价值越高,因此该药材品质鉴定的一个基本问题就是生长年限鉴定^[5-7]。

关于中药材生长年限的鉴别,主要采用 DNA 分子技术、蛋白质标记技术、光谱技术、色谱技术^[8-9]。DNA 分子技术、蛋白质标记技术和色谱技术等需对药材进行分离提取,专业性强,技术难度大,不利于推广应用。光谱技术鉴定主要采用近红外光谱、中红外光谱、拉曼光谱、紫外光谱等。紫外光谱的测试需对药材进行提取分离处理,样品前处理过程复杂。近红外光谱和拉曼光谱可直接测试药材,但拉曼光谱受荧光背景的干扰,光谱特征性较差;近红外光谱受影响因素多、光谱信息范围窄,仪器专属性强,不利于推广。傅里叶变换中红外光谱能反映样品的整体化学信息,仪器通用,操作简单,可进行中药材定性鉴别及其主要成分的定量分析,样本数量及样本成分差异可大可小^[8]。

基于红外光谱信息的模式识别分析,可建立能够对中药材质量进行全面合理、有效评价而又快速鉴别的方法^[10]。判别分析是模式识别分析中判断个体所属类型的方法,基于傅里叶变换中红外光谱信息的判别分析对中药材品种、产地和生长年限进行鉴别的研究已有报道^[11-13],但对重楼生长年限进行鉴别的研究尚未见报道。本实验基于傅里叶变换中红外光谱技术,结合判别分析方法对重楼生长年限进行鉴别研究,测试同一产地 7 种不同生长年限的 68 株滇重楼主根木质部样品和表皮样品的红外光谱,利用 Omnic8.0 软件进行试验数据处理,通过 SPSS 19.0 软件中的逐步判别分析方法建立重楼生长年限的鉴别模型,为重楼药材市场的质量控制提供参考。

1 材料

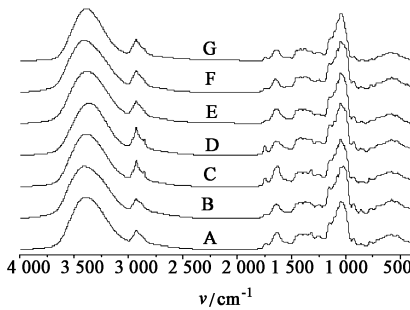
Frontier 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Perkin-Elmer 公司,含 DTGS 检测器,光谱分辨率 4 cm^{-1} ,扫描范围 $4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$,累加扫描数 16 次)。溴化钾(天津市福晨化学试剂厂)。68 株 7 种不同生长年限的滇重楼均为人工栽培,从种子开始种植,2014 年 7 月购自云南省丽江市七河乡五峰村五老山的种植户,整株采挖,经云南农业科学院药用植物研究所张金渝研究员鉴定为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*,生长年限为 2, 3, 4, 8, 9 年的各采集 10 株,生长年限为 5 年和 7 年的各采集 9 株,将滇重楼植株的主根洗净后于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温烘干至恒重,取各植株主根木质部和表皮制备样品。

2 方法与结果

2.1 鉴别分析 将样品放入玛瑙研钵磨为均匀粉末,过 200 目筛,按样品与溴化钾质量比 1:50 加入溴化钾,搅磨均匀,压片,测试光谱。测试中实时扣除背景的影响,将所有光谱在 Omnic8.0 软件中进行自动基线校正、九点平滑和归一化处理,并利用该软件中的求导数功能计算各样品光谱的二阶导数光谱和四阶导数光谱。以主根木质部和表皮的傅里叶变换红外光谱、二阶导数光谱和四阶导数光谱在 $1\ 800\sim 900\text{ cm}^{-1}$ 的光谱数据为样品特征指标,各生长年限样品任意选择 80% 的样品为训练样本,余下 20% 的样品为测试样本,在 SPSS 19.0 软件的判别分析模块中建立判别模型对滇重楼样品的生长年限进行鉴别分析。

2.2 滇重楼木质部和表皮的 FTIR 光谱特征 图 1 为不同生长年限滇重楼主根木质部第 1 个样品的傅里叶变换红外光谱图。各样品的傅里叶变换红外光谱共显示了 $3\ 400, 2\ 929, 2\ 859, 1\ 746, 1\ 648, 1\ 413, 1\ 378, 1\ 316, 1\ 240, 1\ 144, 1\ 101, 1\ 075, 1\ 048, 1\ 022, 997, 926, 862, 763, 709, 576, 527\text{ cm}^{-1}$ 附近等 20 多个明显的吸收峰。光谱在 $950\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 主要为皂苷类物质或糖环骨架振动的特征吸收峰,其中 $926, 859\text{ cm}^{-1}$ 附近显示的吸收峰为甾体皂苷的特征吸收与糖环中 C-C 伸缩振动的吸收^[14], $763, 705\text{ cm}^{-1}$ 附近的弱吸收峰主要为糖环骨架伸缩振动的吸收。在 $1\ 200\sim 950\text{ cm}^{-1}$ 是皂苷、淀粉等糖苷类物质的特征吸收区,各样品光谱在此区域均出现了比较多的强峰,且各光谱最强的峰均出现在此区域。 $1\ 144, 1\ 101, 1\ 075, 1\ 048, 1\ 022, 997\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰为阶梯增强后减弱的强峰,主要为淀粉、皂苷等多糖物

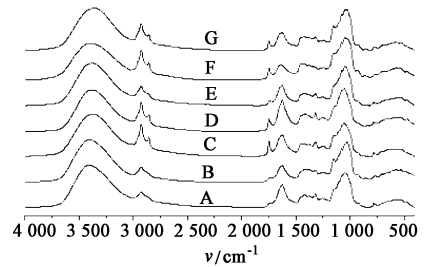
质 C-O 的伸缩振动吸收和甾体皂苷元中羰基 O-H 的弯曲振动吸收^[14]。在 1 500 ~ 1 200 cm^{-1} 显示的都是弱峰,其中 1 413, 1 378, 1 316 cm^{-1} 附近的吸收峰主要为甲基或亚甲基中 C-H 弯曲振动、变角振动等的吸收, 1 240 cm^{-1} 附近的弱吸收主要是苯环中 C-H 的弯曲振动与 C-OH 的伸缩振动。在 1 800 ~ 1 500 cm^{-1} 是羰基、酰胺和苯环等的吸收区; 1 737 cm^{-1} 附近主要是脂类羰基 C=O 伸缩振动吸收峰, 1 648 cm^{-1} 附近宽吸收峰主要为甾体皂苷中羰基 C=O 伸缩振动和多糖类物质中 O-H 弯曲振动的叠加峰^[14]。2 859, 2 929 cm^{-1} 附近中等偏弱的吸收峰主要来自亚甲基 C-H 的反对称伸缩振动和对称伸缩振动; 3 400 cm^{-1} 附近显示的强宽峰主要来自羟基中 C-H 伸缩振动的吸收。仔细观察光谱中 1 153, 1 077, 1 018, 926, 860, 768, 577 cm^{-1} 等吸收峰的峰形和峰位, 与淀粉红外光谱特征峰的峰形和峰位很相似, 说明滇重楼主根木质部中含有大量淀粉^[10]。综上分析, 滇重楼主根木质部的物质成分主要为淀粉、皂苷等糖苷类物质。光谱的差异主要为生长年限 4 年和 5 年的样品在 3 007, 2 960 cm^{-1} 附近还显示了较弱的吸收峰; 3 007 cm^{-1} 附近的吸收峰归属为 C-H 伸缩振动, 来自不饱和脂肪类物质^[15]; 2 960 cm^{-1} 附近的吸收峰归属为甲基 C-H 反对称伸缩振动; 同时在 2 929, 1 746 cm^{-1} 附近的吸收峰比其他生长年限样品的强。说明重楼主根木质部还含有少量脂肪酸类物质, 生长年限 4 年和 5 年的样品中脂肪酸类物质的含量比其他生长年限样品的多。



A. 2 年; B. 3 年; C. 4 年; D. 5 年; E. 7 年; F. 8 年; G. 9 年
图 1 不同生长年限滇重楼主根木质部第 1 个样品的红外光谱
Fig. 1 Infrared spectrum of the first sample of taproot xylems of *Paridis Rhizoma* with different growing years

图 2 为不同生长年限滇重楼主根表皮的傅里叶变换红外光谱图。与木质部的红外光谱相比, 光谱峰的形状基本一致, 但峰位和峰高有差异。主要表现在皂苷、淀粉等多糖类物质的特征吸收区, 表皮光

谱的吸收峰比木质部的弱, 显示的吸收峰数没有木质部的多或没有木质部的明显; 在 2 929, 1 737 cm^{-1} 附近的吸收峰, 表皮的比木质部的强, 同时表皮在 3 007, 2 960 cm^{-1} 附近的吸收峰比木质部的明显, 说明表皮和木质部的主要物质成分基本相同, 但木质部中皂苷、淀粉等糖苷类物质含量比表皮中高, 表皮中脂肪酸类物质含量比木质部高。不同生长年限滇重楼主根表皮的红外光谱明显的差异主要为随着生长年限增加, 反映脂肪酸类物质振动的 3 007, 2 960, 2 929, 2 854, 1 746 cm^{-1} 附近的吸收峰逐渐增强, 生长年限 4 年和 5 年的最强且 2 929 cm^{-1} 附近的吸收峰是光谱的最强峰, 然后又逐年减小, 说明滇重楼主根表皮中脂肪酸类物质的含量随生长年限变化的特征与木质部相同。



A. 2 年; B. 3 年; C. 4 年; D. 5 年; E. 7 年; F. 8 年; G. 9 年
图 2 不同生长年限滇重楼主根表皮第 1 个样品的红外光谱
Fig. 2 Infrared spectrum for the first sample of taproot epidermises of *Paridis Rhizoma* with different growing years

2.3 基于 FTIR 光谱的生长年限鉴别与分析

2.3.1 判别分析^[16] 逐步判别分析法是利用某种检验规则, 不断对样本变量信息进行逐步筛选和检验, 找出对样本分类影响显著的变量, 剔除不显著变量来建立判别模型进行分类鉴别的方法。在傅里叶变换红外光谱中, 对滇重楼生长年限的逐步判别分析, 以样品红外光谱数据为特征, 按挑选判别指标进入判别函数的某种算法, 依据 Fisher 线性判别准则建立判别模型, 对未知生长年限的样品进行生长年限鉴别。在 SPSS 19.0 的判别分析模块中, 挑选变量进入判别函数的方法共有 5 种 (Wilks' Lambda, Unexplained variance, Mahalanbis distance, Smallest Fratio, Rao's V), 其中 Mahalanbis distance 不受量纲的影响^[17], 故选择 Mahalanbis distance 法挑选变量建立判别模型。表 1 为分别以主根木质部和表皮的傅里叶变换红外光谱、二阶导数光谱和四阶导数光谱在 1 800 ~ 900 cm^{-1} 的光谱数据为样品特征, 按逐步判别分析法对滇重楼样品生长年限鉴别的情况。

由表 1 可知, 木质部和表皮样品不同级别光谱

数据建立的判别分析模型对滇重楼生长年限的鉴别结果差异明显,红外光谱的识别正确率低,四阶导数光谱的识别正确率相对较高。基于表皮的判别分析对滇重楼生长年限的鉴别明显优于木质部的。为检验表皮样品四阶导数光谱建立的判别分析模型对滇

重楼生长年限鉴别时的稳定性,利用五折交叉验证法进行检验^[16]。结果训练样本回判的平均正确率 97.6%,测试样本预测的平均正确率 77.1%,总平均判别正确率 87.4%。说明模型有一定的稳定性,可用此模型对不同生长年限滇重楼进行判别鉴别。

表 1 主根木质部和表皮的不同级别光谱对滇重楼生长年限的判别分析

Table 1 Discriminant analysis for growing years of *Paridis Rhizoma* based on different levels of spectra of epidermises and xylems of taproots

主根部位	数据类型	训练样本回判			测试样本预测			总正确率/%
		数目	误判数	正确率/%	数目	误判数	正确率/%	
木质部	红外光谱	54	23	57.4	14	9	35.7	52.9
	二阶导数光谱	54	7	87.0	14	8	42.9	77.9
	四阶导数光谱	54	8	85.2	14	5	64.3	80.9
表皮	红外光谱	54	16	70.4	14	4	71.4	70.6
	二阶导数光谱	54	3	94.4	14	5	64.3	88.2
	四阶导数光谱	54	0	100.0	14	3	78.6	95.6

2.3.2 鉴别分析 导数光谱能放大光谱差异,也会降低光谱的信噪比。二阶导数光谱和四阶导数光谱能将原红外光谱中掩盖的子峰分离出来,增强光谱特征;四阶导数光谱的光谱特征比二阶导数光谱强,但四阶导数光谱的信噪比低于二阶导数光谱,故在测试光谱时需适当增加样品含量,以提高红外光谱的信噪比。本文中滇重楼主根的物质成分积累非常缓慢,虽然所有滇重楼植株均采自同一种植点,但由于各植株生长发育情况的差异,导致同一生长年限内不同植株中物质成分含量差异较明显,故需要通过导数光谱来增强不同生长年限重楼样品的光谱特征。结果说明通过四阶导数光谱结合判别分析来鉴别滇重楼的生长年限比其他级别的光谱效果好。

样品信息进行判别分析,将所有木质部和表皮样品作为训练样本,各样品在所建判别模型下判别函数 1 和判别函数 2 中的得分分布见图 3。结果显示在判别分析模型下不同生长年限木质部样品的分布较混乱,表皮样品分布较集中,说明基于表皮四阶导数光谱的判别分析效果比木质部好;采用逐步判别分

木质部和表皮同为主根的组成部分,木质部是主根干物质积累的主要储存部位。随着生长年限的增加,主根本质部和表皮的物质组分发生了变化,表现出了一定的生长年限特征,红外光谱信息反映了这种变化和特征,但由于滇重楼主根干物质积累缓慢,各植株在生长发育上的差异,导致同一生长年限内不同植株主根干物质积累的差异有的大于不同生长年限的。故木质部的生长年限特征没有表皮的明显,基于表皮四阶导数光谱的判别分析效果比木质部的好。

逐步判别分析法对未知样品进行判别分类,根据已知分类情况的样本建立分类函数,各类样本在分类函数中的得分形成各类样本的类质心,未知分类样本通过在分类函数中的得分与各个类质心的距离来判断该样品分类情况。以四阶导数光谱数据为

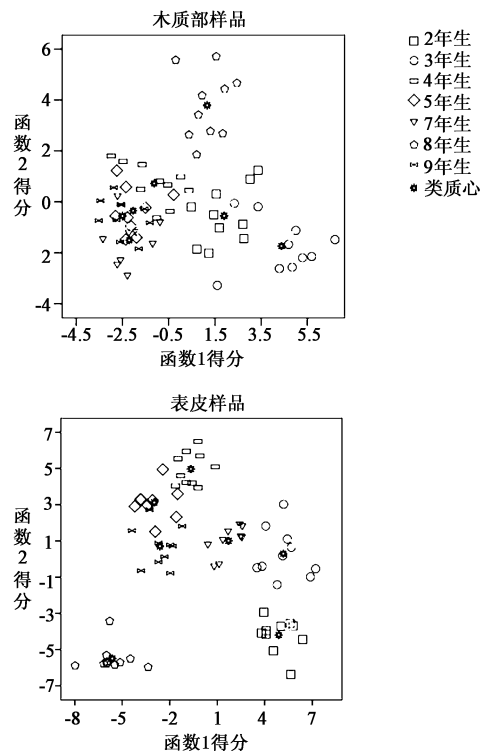


图 3 滇重楼木质部和表皮各样品在判别函数 1 和函数 2 中的得分分布
Fig.3 Score plots of epidermis and xylem samples from *Paridis Rhizoma* based on discriminant function 1 and function 2

析法进行分类判别时,训练样本的数量和覆盖面都多时,各个类别的类中心才会准确,对未知样品的分类判别效果才好。

3 讨论

利用傅里叶变换中红外光谱技术结合逐步判别分析法对滇重楼的生长年限进行鉴别,是一种以样品的光谱信息为特征指标、有监督模糊识别分类的方法。中红外光谱能测量分子官能团的振动模式,反映分子的精细结构——振转结构,具有指纹特性,能够从分子水平反映样品的特征。研究说明重楼主根有效成分的积累呈现随生长年限增加的趋势,红外光谱能全面反映样品的物质组成成分及含量信息,不同生长年限的重楼主根,红外光谱信息有一定差异,但由于影响有效成分积累的因素很多,且不同生长年限重楼主根的主要组成物质相同,含量差异不大,使得光谱信息中反映生长年限的信息被主要组成物质的光谱所淹没,因此通过样品的红外光谱来直接鉴别不同生长年限的重楼很困难。可是重楼主根的光谱信息中毕竟包含生长年限的信息,通过对一定数量已知生长年限重楼主根的光谱信息进行有监督的模式识别统计分析,能挖掘出生长年限的统计特征,建立生长年限的鉴别模型对未知样品进行鉴别。红外光谱技术具有仪器通用、操作简单、重复性好等优点,本文研究结果说明红外导数光谱结合有监督的模糊识别分类方法能够鉴别滇重楼的生长年限,为生产实践中预测滇重楼的生长年限提供了一种新思路。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:243.
[2] 李恒. 重楼属植物[M]. 北京:科学出版社,1998:1,36.
[3] 赵东兴,李春,赵国祥,等. 云南地道药材滇重楼的研究进展[J]. 热带农业科学,2014,34(1):42-47.

[4] 周浓,陈立师,邹亮. 影响滇重楼产量和品质诸因素的研究进展[J]. 亚太传统医药,2009,5(9):167-170.
[5] 赵庭周,王卜琼,马青,等. 滇重楼采收期研究[J]. 中国野生植物资源,2014,33(5):61-66.
[6] 夏从龙,周浓,陈立师,等. 滇重楼不同生长发育期有效成分的变化规律[J]. 时珍国医国药,2011,22(7):1624-1625.
[7] 张烨,赵倩,高科江,等. HPLC 测定不同生长年限滇重楼中薯蓣皂苷元含量[J]. 安徽农业科学,2011,39(6):3280-3281,3285.
[8] 陈士林,郭宝林,张贵君,等. 中药鉴定学新技术新方法研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(8):1043-1048.
[9] 程春松. 基于端粒研究的人参年限鉴定及其数学模型的构建[D]. 合肥:安徽中医药大学,2013.
[10] 孙素琴,周群,陈建波. 中药红外光谱分析与鉴定[M]. 北京:化学工业出版社,2010:74,135.
[11] 刘飞,王元忠,杨春艳,等. 基于红外光谱的石斛品种判别分析[J]. 光谱学与光谱分析,2014,34(11):2968-2972.
[12] 刘飞,王元忠,杨春艳,等. 红外光谱结合判别分析对三七道地性及产地的鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2015,35(1):108-112.
[13] 李四海,潘新波,任真,等. 不同生长期当归红外光谱的偏小二乘分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):132-135.
[14] 颜茜. 中药重楼及其伪品开口箭的 FTIR 分析与鉴别[J]. 光散射学报,2013,25(1):85-91.
[15] 徐荣,孙素琴,陈君,等. 肉苁蓉种子成分及活力的红外光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析,2009,29(1):97-101.
[16] 张新新,李雨,纪玉佳,等. 主成分-线性判别分析在中药药性识别中的应用[J]. 山东大学学报:医学版,2012,50(1):143-147.
[17] 高国朋,颜可珍. 基于距离判别分析法的边坡稳定性预测模型及应用[J]. 水利与建筑工程学报,2010,8(3):43-45.

[责任编辑 刘德文]