

近红外光谱技术快速鉴别重楼及其混伪品

郑加梅^{1,2}, 廖彬彬¹, 杨萍¹, 杨丽武³, 杨晓菊^{1*}, 段宝忠^{1,2*}

1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000

2. 云南省中药资源开发利用国际联合实验室, 云南 保山 678000

3. 大理为民中草药种植有限公司, 云南 大理 671000

摘要: 目的 建立重楼及其混伪品的近红外光谱 (near-infrared spectroscopy, NIRS) 快速鉴别方法。方法 采用 NIRS 仪获取样品光谱数据, 结合主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)、线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA)、人工神经网络机器学习算法 (artificial neural network, ANN) 和二维红外光谱 (2D-IR), 探讨 NIRS 技术在重楼及其混伪品快速鉴别的可行性。结果 重楼及其混伪品的 NIRS 光谱吸收峰的峰形整体相似, 但在峰数和峰强方面均存在一定差异。PCA 和 OPLS-DA 判别模型可将重楼及其混伪品区分, 但模型预测能力差 ($Q^2 < 0.5$); LDA 模型可将滇重楼与其他物种进行区分, 但无法区分七叶一枝花的部分样本; ANN 模型识别准确率达 100.0%, 不同物种的 2D-IR 图谱在 $5\ 897\sim 5\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 和 $4\ 497\sim 4\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 差异显著。结论 重楼及其混伪品的化学信息差异明显, 不可混用。NIRS 结合 ANN 模型或 2D-IR 方法可用于重楼及其混伪品的快速鉴别。

关键词: 重楼; 鉴别; 滇重楼; 七叶一枝花; 混伪品; 近红外光谱; 二维红外光谱

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4545-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.026

Rapid identification of *Paridis Rhizoma* and its adulterants by near-infrared spectroscopy

ZHENG Jiamei^{1,2}, LIAO Binbin¹, YANG Ping¹, YANG Liwu³, YANG Xiaoju¹, DUAN Baozhong^{1,2}

1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China

2. International Joint Laboratory for the Development and Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources in Yunnan Province, Baoshan 678000, China

3. Dali Weimin Traditional Chinese Medicine Planting Co., Ltd., Dali 671000, China

Abstract: Objective To establish a rapid identification method for *Paridis Rhizoma* using near-infrared spectroscopy (NIRS). **Methods** The spectral data of the sample were obtained by NIRS instrument. Subsequently, the feasibility of NIRS in identifying *Paridis Rhizoma* and its adulterants was explored by using principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), linear discriminant analysis (LDA), artificial neural network (ANN), and two-dimensional infrared spectroscopy (2D-IR). **Results** The original spectral images of *Paridis Rhizoma* and its adulterants exhibited similar shapes overall, but differences were observed in the number and intensity of peaks. Although the PCA and OPLS-DA discrimination model successfully separated *Paridis Rhizoma* from its adulterants, it displayed poor predictive ability ($Q^2 < 0.5$); The LDA model could differentiate *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* from other species, but face challenges in distinguishing certain samples of *P. polyphylla* var. *chinensis*; In contrast, ANN model demonstrated a clear advantage in identifying *Paridis Rhizoma* and its adulterants with a recognition accuracy of 100.0%. Additionally, the 2D-IR spectra of different species were significant differences between $5\ 897\sim 5\ 600\ \text{cm}^{-1}$ and $4\ 497\sim 4\ 200\ \text{cm}^{-1}$ regions. **Conclusion** There are notable chemical distinctions between *Paridis Rhizoma* and its

收稿日期: 2024-01-20

基金项目: 云南省院士专家工作站 (202205AF150026); 国家自然科学基金项目资助 (31860080)

作者简介: 郑加梅 (1997—), 硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: zjmeijm@126.com

*通信作者: 杨晓菊, 讲师, 研究方向为康复药理学。E-mail: 364347374@qq.com

段宝忠, 教授, 研究方向为中药资源。E-mail: bzduan@126.com

adulterants that necessitate differentiation for proper use. NIRS, combined with the ANN model or the 2D-IR method, can be effectively employed for the rapid identification of *Paridis Rhizoma* and its adulterants.

Key words: *Paridis Rhizoma*; identification; *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz.; *Paris polyphylla* var. *chinensis* (Franch.) Hara; adulterants; near infrared spectroscopy; two-dimensional infrared spectroscopy

重楼为百合科重楼属多年生草本植物，其来源于滇重楼 *Paris polyphylla* Smith. var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. 或七叶一枝花 *P. polyphylla* var. *chinensis* (Franch.) Hara^[1]，其根茎可用于治蛇咬伤、骨折、肿瘤和创伤性出血^[2]，为云南白药和宫血宁等中成药的重要原料^[3]。然而，由于滇重楼和七叶一枝花生长缓慢，野生资源的过度采挖导致其资源大幅减少，均已被列为国家二级保护的濒危植物^[4]。此外，由于重楼属植物的根茎外形相似，市售药材存在混乱，掺杂，以次充好等现象。一些混伪品，如毛重楼 *P. mairei* H. Lév.、吉林延龄草 *Trillium camschatcense* Ker Gawl. 和万年青 *Rohdea japonica* (Thunb.) Roth 等常被混淆为重楼药材使用，但这些药材通常质量较差，尤其是万年青含有毒的生物碱成分，可能导致心律失常、恶心、呕吐、腹痛等不适症状^[5]，威胁消费者安全。迄今为止，气相色谱、傅里叶变换红外光谱 (FT-IR)、液相色谱/质谱和高效液相色谱 (HPLC) 等技术已被用于重楼及其混伪品的鉴别^[6-8]，然而，这些方法受温度、湿度以及样品制备方法等的影响，且前处理过程操作繁琐，亟须建立快速准确的鉴别方法。

近红外光谱 (near-infrared spectroscopy, NIRS) 因其检测速度快、检测过程简单、对样品破坏性小的特点，与化学计量学方法结合能够有效克服分子在红外吸收谱带严重重叠和复杂的缺点，在中药材和农产品的品种识别、产地鉴别以及真伪鉴定等领域被广泛应用^[9-10]。鉴于化学计量学方法在样品差异识别方面的优势，尤其是主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)、线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA) 和人工神经网络 (artificial neural network, ANN) 等主流方法的应用，以及二维红外光谱 (two-dimensional infrared spectroscopy, 2D-IR) 的高分辨特性，可直观显现样品一维光谱中隐藏的识别信息^[11]，这些方法极大提升了光谱数据的分类效率和准确性^[12]。如利用 NIRS 高光谱成像技术对单籽粒小麦品种进行分类

鉴别，品种的识别准确率达 93.18%^[13]；NIRS 结合化学计量学方法还成功用于西红花的真伪和掺伪检测^[14]；结合 2D-IR 方法，通过特征峰的差异可有效区分掺假大米^[15]。这些研究为 NIRS 技术在食品和中药材的分类鉴别领域提供了借鉴。目前已有采用 NIRS 结合化学计量学对重楼产地进行识别的研究^[16-17]，尚未见用于重楼及其混伪品鉴别的报道。

鉴于此，本研究收集了重楼及其混伪品，采用 NIRS 技术结合 PCA、OPLS-DA、LDA、ANN 以及 2D-IR 对样品数据进行分析，旨在为重楼及其混伪品的快速鉴别提供科学参考。

1 仪器与材料

Bruker MATRIX-F 型近红外光谱仪 (布鲁克公司，德国)，800A 型中草药粉碎机 (浙江省永康市红太阳机电有限公司)，DHG-9140A 型鼓风干燥箱 (上海-恒科学仪器有限公司)，尼龙筛 (80 目，浙江省上虞市五四纱厂)，称量瓶 (25 mm×25 mm，北京万晶博美玻璃制品有限公司)。

重楼及其混伪品的样品收集于云南、四川、湖北等省，经大理大学段宝忠教授鉴定为矮秆滇重楼 *P. polyphylla* var. *yunnanensis*、高秆滇重楼 *P. liiana* Y. H. Ji、七叶一枝花 *P. polyphylla* var. *chinensis* Franch. Hara、毛重楼 *P. mairei* H. Lév.、吉林延龄草 *T. camschatcense* Ker Gawl. 和万年青 *R. japonica* (Thunb.) Roth 的根茎。样品经粉碎后过 80 目筛，称取粉末 5 g 转入称量瓶中，备用。样品凭证标本存放于大理大学中药标本馆，信息见表 1。

2 方法

2.1 光谱采集

基于 NIRS 仪漫反射模式获取样品光谱数据。为减小误差，采集空气为背景光谱。波长采集范围为 12 000~4 000 cm⁻¹，扫描次数 32 次，分辨率 8 cm⁻¹。光谱仪配置、控制和数据采集使用 OPUS 7.8 软件。每批样品重复检测 3 次，取平均值用于分析。

2.2 数据处理

光谱数据采用 OPUS 7.8 软件进行矢量归一化 (standard normal variate, SNV) 预处理；在建立鉴别模型前，采用 Origin 2021 软件对数据进行一阶导

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

样品编号	植物名	样品来源	生长方式	生长年限/年
S1~S13	滇重楼(矮秆)	云南省永平县	栽培	5
S14~S30	滇重楼(高秆)	云南省永平县	栽培	5
S31	七叶一枝花	四川省泸定县	栽培	7
S32	七叶一枝花	四川省彭州市	栽培	7
S33	七叶一枝花	四川省石棉县	栽培	5
S34	七叶一枝花	四川省乐山市	栽培	5
S35~S36	七叶一枝花	湖北省宜昌市	栽培	5
S37	七叶一枝花	四川省绵阳市	栽培	5
S38~S39	七叶一枝花	云南省永平县	栽培	5
S40	毛重楼	云南省玉龙县	栽培	6
S41~S42	毛重楼	云南省香格里拉市	栽培	5
S43	毛重楼	云南省大理市	栽培	7
S44	毛重楼	云南省云龙县	栽培	6
S45	吉林延龄草	云南省洱源县市场收集	野生	—
S46~S50	吉林延龄草	云南省大理市市场收集	野生	—
S51	万年青	安徽省亳州市	—	—
S52	万年青	湖北省	野生	—
S53	万年青	云南省	野生	—
S54	万年青	湖南省	野生	—
S55	万年青	江西省	野生	—

数(first derivative, 1st derive)预处理,以提高谱图的分辨率^[18]; PCA 和 OPLS-DA 使用 SIMCA 14.1; ANN 和 LDA 使用 IBM SPSS Statistics 26 软件; 2D-IR 采用 2D Shige 软件。

3 结果与分析

3.1 NIRS 光谱特征分析

原始叠加 NIRS 如图 1-A 所示, 55 批样品的光谱图轮廓相似。SNV 和 1st derive 预处理平均光谱图如图 1-B 所示, 矮秆滇重楼与吉林延龄草的光谱图峰形存在显著差异, 提示两者的化学成分差异较大; 而矮秆滇重楼与毛重楼和万年青的光谱图峰形整体相似, 难以区分。此外, 重楼及其混伪品的光谱图主要吸收区域在 $7\ 200\sim 6\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 、 $6\ 000\sim 5\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 、 $5\ 000\sim 4\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 和 $4\ 400\sim 4\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 附近。先前的研究表明, $7\ 200\sim 6\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰与 O-H 键的二倍频伸缩振动有关, 可能为糖和黄酮类化合物的吸收峰^[19]; $6\ 000\sim 5\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 区域的显著吸收峰与 N-H 键、C-H 键、O-H 键和 C=O 键的倍频吸收有关, 可能为糖、黄酮类、皂苷或蛋白质等化合物的吸收峰^[20-22]。 $5\ 000\sim 4\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰与 C-H 键和 C=O 键的拉伸振动有关, 可能为

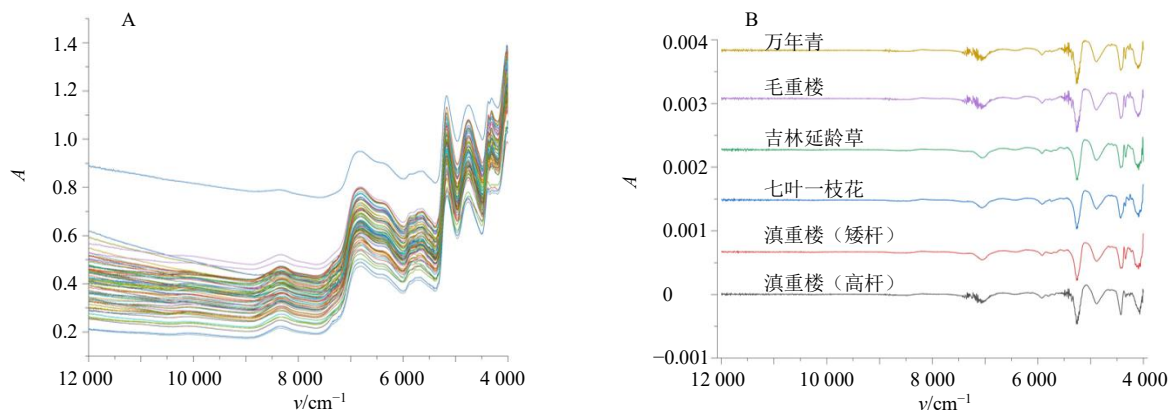


图 1 55 批样品原始 NIRS 图 (A) 和 SNV + 1st derive 预处理平均光谱图 (B)

Fig. 1 Original NIRS of 55 batches of samples (A) and average spectrogram pre-processed by SNV + 1st derive (B)

黄酮类的吸收峰^[23]。 $4\ 400\sim 4\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰与 C-H 键的伸缩振动, 以及 $-\text{CH}_2$ 的变形振动有关, 可能为多糖和皂苷的吸收峰^[21]。上述结果表明, 重楼及其混伪品化学成分的主要差异可能为多糖、皂苷、黄酮类等物质^[24-25]。

3.2 化学计量学分析

3.2.1 PCA PCA 是将具有相关性的多维数据压缩为相互独立数据的统计方法, 其在保留主要光谱信息的同时, 可消除共存和重叠的信息, 并揭示变量间

的关系^[26]。PCA 分析结果如图 2-A 所示, 样品被分为 2 组。组 I 包括 9 批正品重楼(七叶一枝花)及 15 批混伪品(毛重楼、万年青和吉林延龄草); 组 II 则包含 30 批正品滇重楼(包括矮秆和高秆滇重楼)样本, 以及 1 批万年青样本。此外, 前 2 个主成分(PC1 和 PC2)的累积方差贡献率为 71.7%, 表明该模型对变量的解释能力较好。PCA 模型中 $R^2_X=0.702$, $Q^2=0.458 (<0.5)$, 表明该模型拟合度较好, 但预测能力较差^[27], 尚需采用其他模型进一步分析。

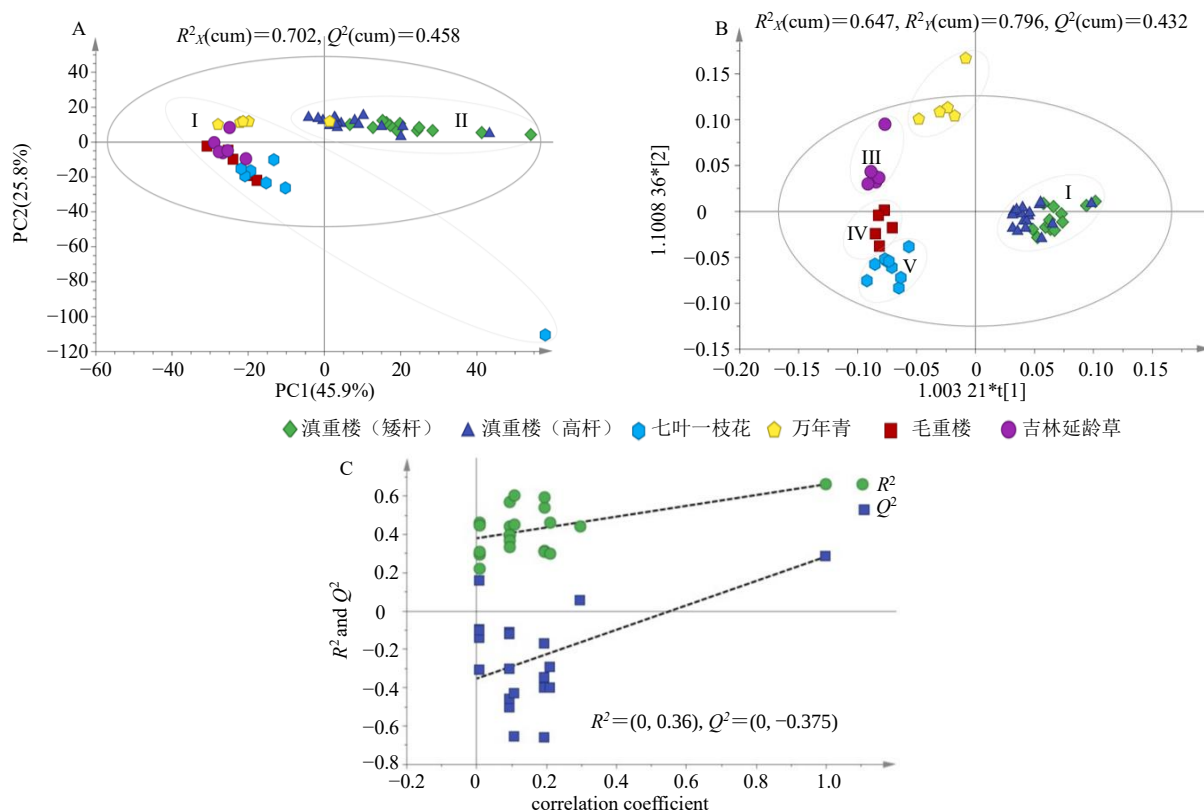


图 2 PCA 评分图 (A)、OPLS-DA 评分图 (B)、OPLS-DA 置换检验图 (C)
Fig. 2 PCA score plot (A); OPLS-DA score plot (B); OPLS-DA permutation test plot (C)

3.2.2 OPLS-DA OPLS-DA 是一种多因变量对多自变量的回归建模方法, 其可识别光谱中非相关变异性^[28]。55 批样本的 OPLS-DA 得分图如图 2-B 所示, 除 1 批万年青样本外, 其余样本均在 95% 置信区间; 万年青的 5 批样品均聚为一组, 表明万年青的化学成分与其他物种有显著差异, 容易区分。其余的 50 批样本按物种各自聚为一组, 滇重楼、七叶一枝花与其他混伪品明显分离; 然而 Q^2 值为 0.432 (<0.5), 提示该模型预测能力差。随机置换检验评估模型适用性结果显示 (图 2-C), Q^2 回归线的截距为负值, 表明 OPLS-DA 不存在过拟合现象^[29]。尽管 OPLS-DA 提供了聚类 and 距离趋势的信息, 但仍无法区分重楼及其混伪品。

3.2.3 LDA LDA 是一种机器学习算法, 其通过线性组合特征并进行极限估计, 以增大不同类别之间的距离, 同时最小化类别内部的差异^[12]。由于 $12\,000\sim7\,200\text{ cm}^{-1}$ 波段吸收峰较少, $4\,200\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$ 仪器噪音比较大, 不适于建模。选择 $7\,200\sim4\,200\text{ cm}^{-1}$ 波段的数据建模, 样本的 LDA 分类结果见表 2。原始分类显示, 有 1 批高秆滇重楼样本误判为矮秆滇重楼, 分类准确率为 94.1%; 而矮秆滇重楼、

七叶一枝花、毛重楼、万年青和吉林延龄草样本的分类准确率均达到 100.0%。交叉检验显示, 13 批矮秆滇重楼和 17 批高秆滇重楼存在一定的重叠, 但均被准确分类为滇重楼。另外, 5 批毛重楼样本中, 分别有 3 批和 1 批样本被错误地分类为七叶一枝花和吉林延龄草; 4 批七叶一枝花样本被错误分类为毛重楼。此外, 根据 LDA 得分图 (图 3-A) 显示, 前 2 个判别函数 (DF1 和 DF2) 解释了总方差的 95.60%; 滇重楼、七叶一枝花, 毛重楼, 万年青和吉林延龄草的样本均显著分离, 高秆和矮秆滇重楼的样本未明显分离。

3.2.4 ANN ANN 是光谱数据分析的有效工具, 具有强大非线性拟合、自学习和容错能力^[30]。样本在 $7\,200\sim4\,200\text{ cm}^{-1}$ 内的 ANN 分类结果见表 3。当训练集随机选择 67.3% 的样本时, 所有样本均能被成功鉴别, 准确率达到 100%。为了进一步检验预测模型的稳定性, 采用剩余 32.7% 的样本进行测试, 平均准确率为 88.9%。对于矮秆滇重楼和高秆滇重楼, 其准确率分别为 75.0% 和 66.7%, 但均被正确分类为滇重楼。七叶一枝花、毛重楼、

表 2 LDA 的鉴别效果

Table 2 Discrimination effects of LDA algorithm

分类	物种	预测类别						准确率/%
		滇重楼（矮秆）	滇重楼（高秆）	七叶一枝花	毛重楼	万年青	吉林延龄草	
原始分类	滇重楼（矮秆）	13	0	0	0	0	0	100.0
	滇重楼（高秆）	1	16	0	0	0	0	94.1
	七叶一枝花	0	0	9	0	0	0	100.0
	毛重楼	0	0	0	5	0	0	100.0
	万年青	0	0	0	0	5	0	100.0
	吉林延龄草	0	0	0	0	0	6	100.0
交叉检验	滇重楼（矮秆）	5	8	0	0	0	0	38.5
	滇重楼（高秆）	7	10	0	0	0	0	58.8
	七叶一枝花	0	0	5	4	0	0	55.6
	毛重楼	0	0	3	1	0	1	20.0
	万年青	0	0	0	0	5	0	100.0
	吉林延龄草	0	0	0	1	0	5	83.3

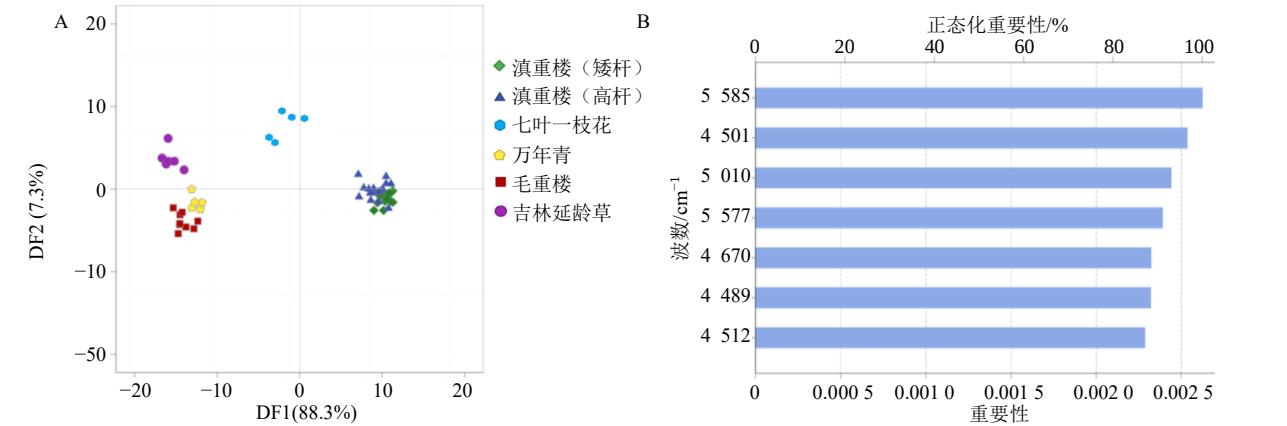


图 3 NIRS 图谱的 LDA 分析 (A) 和变量重要性分析 (B)

Fig. 3 LDA analysis (A) and variable importance analysis (B) of NIRS

表 3 ANN 的鉴别效果

Table 3 Discrimination effects of ANN algorithm

样本	实测	预测类别						准确率/%
		滇重楼（矮秆）	滇重楼（高秆）	七叶一枝花	毛重楼	万年青	吉林延龄草	
训练	滇重楼（矮秆）	9	0	0	0	0	0	100.0
	滇重楼（高秆）	0	14	0	0	0	0	100.0
	七叶一枝花	0	0	8	0	0	0	100.0
	毛重楼	0	0	0	4	0	0	100.0
	万年青	0	0	0	0	1	0	100.0
	吉林延龄草	0	0	0	0	0	1	100.0
	准确率/%	24.3	37.8	21.6	10.8	2.7	2.7	100.0
检验	滇重楼（矮秆）	3	1	0	0	0	0	75.0
	滇重楼（高秆）	1	2	0	0	0	0	66.7
	七叶一枝花	0	0	1	0	0	0	100.0
	毛重楼	0	0	0	1	0	0	100.0
	万年青	0	0	0	0	4	0	100.0
	吉林延龄草	0	0	0	0	0	5	100.0
	准确率/%	22.2	16.7	5.6	5.6	22.2	27.8	88.9

万年青和吉林延龄草的准确率为 100.0%。表明 ANN 适用于重楼及其混伪品的鉴别。此外, 根据自变量重要性图 (图 3-B), 筛选出的前 7 个特征波数范围在 $4\,501\sim 5\,585\text{ cm}^{-1}$, 分别是 $5\,585$ 、 $4\,501$ 、 $5\,010$ 、 $5\,577$ 、 $4\,670$ 、 $4\,489$ 、 $4\,512\text{ cm}^{-1}$; 这些波长可能是皂苷、多糖或黄酮类化合物的吸收峰^[20-23]。大量的研究表明, 重楼的主要成分是皂苷、多糖及黄酮类^[25,31]。本研究所筛选出的特征波长与这些成分相符。

3.3 2D-IR 分析

2D-IR 能够简化复杂光谱和区分重叠特征峰,

并提高谱图分辨率^[32], 已成功用于紫苏子、陈皮等中药材的鉴别^[33-34]。采用同步 2D-IR 对重楼及其混伪品在 $7\,200\sim 4\,200\text{ cm}^{-1}$ 波段的光谱数据分析结果显示, 在 $5\,897\sim 5\,600\text{ cm}^{-1}$ 和 $4\,497\sim 4\,200\text{ cm}^{-1}$ 内差异最大, 进一步对该特征波段进行 2D-IR 分析。

3.3.1 $5\,897\sim 5\,600\text{ cm}^{-1}$ 波段 2D-IR 分析 样本在 $5\,897\sim 5\,600\text{ cm}^{-1}$ 波段 2D-IR 谱图如图 4 所示, 图中红色峰表示正相关峰, 蓝色峰表示负相关峰, 对角线上的峰称自动峰^[35]。可见重楼及其混伪品的自动峰在强度、位置和个数上存在显著差异。具体而

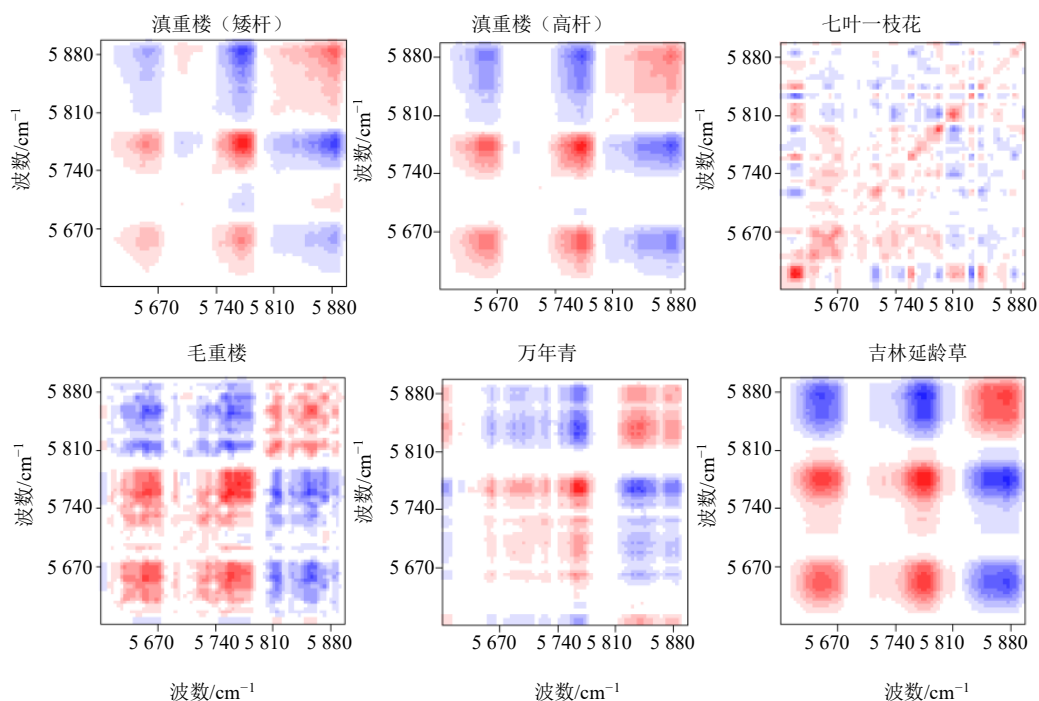


图 4 重楼及其混伪品在 $5\,897\sim 5\,600\text{ cm}^{-1}$ 的同步 2D-IR 谱图

Fig. 4 2D-IR synchronous correlation spectra of *Paridis Rhizoma* and its adulterants in $5\,897\sim 5\,600\text{ cm}^{-1}$ region

言, 滇重楼 (矮秆和高秆) 在 $5\,654$ 、 $5\,770$ 、 $5\,878\text{ cm}^{-1}$ 处有 3 个明显的自动峰, $5\,770\text{ cm}^{-1}$ 处为最强峰。高秆滇重楼在 $5\,654\text{ cm}^{-1}$ 处的峰强度略高于矮秆滇重楼。七叶一枝花和毛重楼的最强峰分别在 $5\,615$ 、 $5\,766\text{ cm}^{-1}$ 处, 与滇重楼存在明显差异, 且两者自动峰个数较多。万年青和吉林延龄草的最强峰分别在 $5\,762\text{ cm}^{-1}$ 和 $5\,774\text{ cm}^{-1}$ 附近, 与滇重楼的最强峰位置接近, 但万年青自动峰的个数与滇重楼有明显差异, 吉林延龄草在 $5\,774\text{ cm}^{-1}$ 处的峰强度较滇重楼高。上述结果表明, 基于 $5\,897\sim 5\,600\text{ cm}^{-1}$ 波段的 2D-IR 分析, 可鉴别重楼及其混伪品。

3.3.2 $4\,497\sim 4\,200\text{ cm}^{-1}$ 波段 2D-IR 分析 样本在 $4\,497\sim 4\,200\text{ cm}^{-1}$ 波段的 2D-IR 谱图如图 5 所

示, 滇重楼 (矮秆和高秆) 有多个自动峰, 最强峰位于 $4\,319\text{ cm}^{-1}$ 处; 高秆滇重楼在 $4\,427\text{ cm}^{-1}$ 附近的相对峰强度高于矮秆滇重楼, 而在 $4\,389\text{ cm}^{-1}$ 附近的相对峰强度低于矮秆滇重楼。七叶一枝花在 $4\,400$ 、 $4\,424$ 和 $4\,447\text{ cm}^{-1}$ 处有 3 个明显的自动峰, 最强峰位于 $4\,447\text{ cm}^{-1}$ 处。毛重楼有多个自动峰, 最强峰位于 $4\,250\text{ cm}^{-1}$ 处。万年青和吉林延龄草各有 2 个明显的自动峰, 分别在 $4\,242$ 、 $4\,373$ 、 $4\,323$ 、 $4\,358\text{ cm}^{-1}$ 处, 最强峰分别位于 $4\,373$ 、 $4\,323\text{ cm}^{-1}$; 两者的最强峰位置与滇重楼接近, 但自动峰的个数和峰强度存在显著差异。上述结果表明, 基于 $4\,497\sim 4\,200\text{ cm}^{-1}$ 波段的 2D-IR 分析, 可用于鉴别重楼及其混伪品。

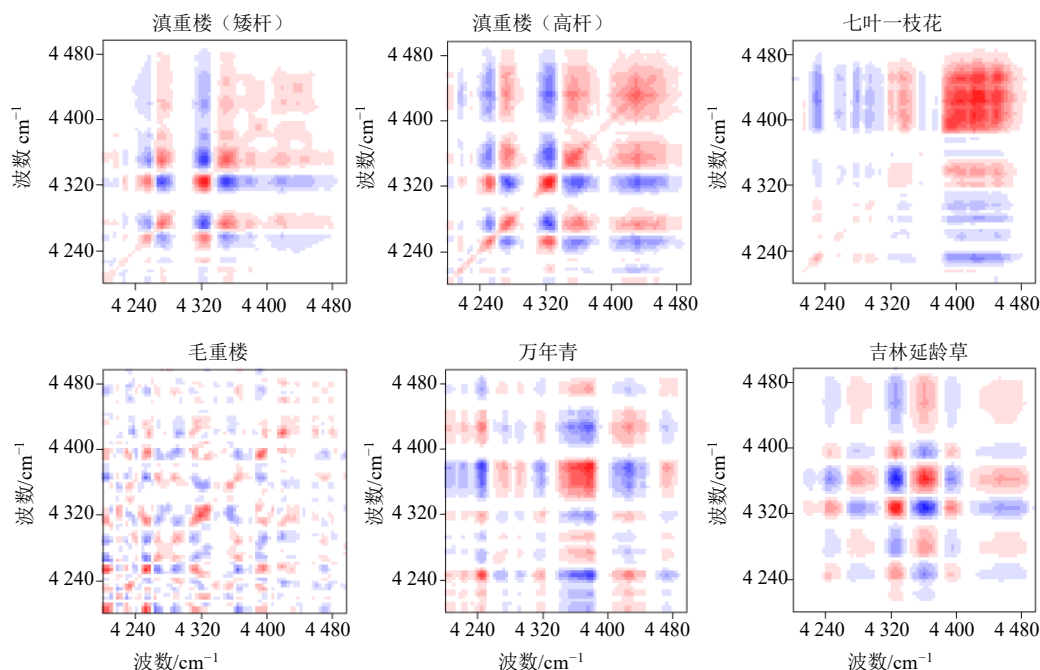


图 5 重楼及其混伪品在 4 497~4 200 cm^{-1} 的同步 2D-IR 谱图

Fig. 5 2D-IR synchronous correlation spectra of *Paridis Rhizoma* and its adulterants in 4 497—4 200 cm^{-1} region

4 讨论

4.1 NIRS 在重楼及混伪品鉴别中的优越性

重楼作为名贵药材，但由于高昂的价格，市场上混伪品充斥，给用药安全带来极大的隐患。目前，鉴别重楼及其混伪品的方法包括性状、显微、理化和分子生物学等多种方法，不同方法各具优缺点。陆保平等研究发现，正品重楼和混伪品的外观性状非常相似，仅凭外观很难区分，而其显微结构也仅有细微的差别^[36]；由于性状和显微鉴别较为主观，需要依靠专家判断，容易造成误判^[37]；同时有研究证实，性状、显微鉴别对于同属药材间的鉴别较为困难^[38]，这也限制了它们在近缘药材鉴别上的应用。此外，研究者已成功地将 HPLC 和 FT-IR 等方法应用于重楼及其混伪品鉴别^[39-40]，但由于操作步骤繁琐，且会对样品造成损坏，这些方法也存在一定的局限性。分子生物学技术由于其高灵敏度和特异性，已成为重楼及其混伪品鉴别的重要手段^[41-42]。然而，该方法依赖于植物的遗传特征，DNA 提取时间长，尤其是在药材样品 DNA 降解的情况下存在较大局限性。

与传统方法相比，NIRS 主要反映 C-H、O-H、N-H、S-H 等化学键的信息，其分析范围几乎涵盖所有的有机化合物和混合物。此外，NIRS 具有诸多优点，包括无需对分析样品进行前处理即可进行光谱

测量，仅需几分钟即可通过一次近红外光谱的采集测量获得多项性能指标的数据，且分析过程无需消耗其他材料或破坏样品^[43]。NIRS 具有较强的抗干扰能力，受环境和仪器等因素影响较小，具有良好的分析重现性和低成本；数据处理相对简便，只需对操作人员进行简易的软件培训，便于推广应用^[44]。本研究证实，结合 ANN 和 2D-IR，NIRS 可有效用于快速鉴别重楼及其混伪品，并可推广应用于重楼药材的市场监管。

4.2 混伪品替代重楼使用的可行性探讨

基于 NIRS 技术的 ANN 及 2D-IR 可明显区分正品重楼及其混伪品，这表明重楼与其混伪品，包括毛重楼、万年青和吉林延龄草，在化学成分信息特征上存在显著差异。根据《中国药典》2020 年版重楼项下规定，重楼中的指标性成分，即重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 和重楼皂苷 VII 的总量不得少于 0.60%^[1]。先前的研究显示，毛重楼中几乎不含重楼皂苷^[45]。而万年青中的重楼皂苷总含量也小于 0.01%，主要含有强心苷、生物碱和有机酸类成分^[46]。口服万年青后可能引发中毒反应，包括口唇和舌体肿胀、声带麻痹、吞咽困难，甚至影响呼吸等症状^[47]。值得注意的是，吉林延龄草中重楼皂苷的总含量虽然达到 0.8%，但几乎不含药典基原重楼中富含的重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II，而主要含有重楼皂苷 III 和重

楼皂苷VI^[45]。综上所述, 以上研究表明混伪品与药典基原重楼的化学成分存在显著差异, 因此不适宜将其作为重楼的替代品使用。

4.3 药典 2 种基原植物化学成分的差异探讨

基于 NIRS 技术与化学计量学分析显示, 中国药典重楼的基原植物滇重楼和七叶一枝花被明显地分成 2 类。2D-IR 分析显示, 滇重楼和七叶一枝花样本在 $4\,497\sim 4\,200\text{ cm}^{-1}$ 和 $5\,897\sim 5\,600\text{ cm}^{-1}$ 波段自动峰的数量、强度和位置存在显著差异; 以上提示二者化学成分差异较大。已有研究证实, 地理环境对重楼的生长发育和药材品质具有显著影响^[48]。滇重楼分布于福建、湖北、湖南、广西、四川、贵州和云南等地, 生长在海拔 $800\sim 3\,600\text{ m}$ 的林下或路边; 而七叶一枝花产于江苏、浙江、江西、福建、台湾、湖北、湖南、广东、广西、四川、贵州等地和云南部分地区, 生活在海拔 $600\sim 1\,350\text{ (}2\,000\text{)}\text{ m}$ 的林下荫处或沟谷边的草丛中^[49], 这种地理分布的差异提示二者在药材品质方面可能具有差异。此前已有多项研究显示, 滇重楼和七叶一枝花的皂苷类成分存在显著差异, 并且二者药效各有特色^[50]。如七叶一枝花中的指标性成分重楼皂苷I、重楼皂苷II和重楼皂苷VII的总量远低于 0.6% ^[51], 不符合《中国药典》2020 年版要求。而滇重楼中的这些成分远高于七叶一枝花, 达 1.70% ^[46]。研究表明, 滇重楼和七叶一枝花均具有镇痛作用, 但差异不明显; 七叶一枝花的抗氧化、抗菌活性和镇静作用强于滇重楼, 但抑制 Caco-2 细胞的增殖效果弱于滇重楼^[52]。在溶血作用方面, 七叶一枝花较滇重楼强, 而止血作用方面, 滇重楼则明显优于七叶一枝花^[53-54]。因此, 在临床应用中, 有必要区分使用滇重楼和七叶一枝花, 以确保临床用药的有效性和安全性。

4.4 不同品种的滇重楼药用合理性探讨

滇重楼分布广泛, 生态环境多样, 经过长期自然选择, 形成了丰富的遗传多样性^[55]。目前生产上广泛栽培的品种主要有矮秆滇重楼和高秆滇重楼, 两者在植物形态上有较大差异, 其分类尚存在争议。从自然分布来看, 高秆滇重楼主要分布在云南中部、南部, 广西西部和贵州西南部, 海拔为 $800\sim 1\,900\text{ m}$ ^[56]; 矮秆滇重楼主要分布在云南北部、西北部和西部、四川西南部和西藏东南部, 海拔为 $1\,900\sim 2\,600\text{ m}$, 两者分布范围几乎没有重叠^[57]。张开元^[58]基于 ITS 基因序列研究认为滇重楼应分为 2 种基因类型 (YN-I 和 YN-II)。Ji 等^[59]认为矮秆滇重楼 *P.*

polyphylla var. *yunnanensis* 为滇重楼的模式种, 基于叶绿体基因组系统发育分析认为高秆滇重楼为滇重楼的隐存种, 并将其拉丁名修订为 *P. liiana* Y. H. Ji。

本研究中, 通过运用 NIRS 技术与化学计量学鉴别模型相结合, 分析重楼及其常见混伪品, 结果显示矮秆滇重楼和高秆滇重楼聚为一类, 提示他们的化学成分存在相似性。之前的研究已证实基因型的分化对滇重楼化学成分和质量的影响较小^[58]。鉴于高秆滇重楼作为重楼商品使用具有悠久的历史^[60], 并在我国云南有大面积的种植。王嘉乐等^[61]通过本草考证亦认为重楼的基原植物应至少包含华重楼 (七叶一枝花)、高秆滇重楼和矮秆滇重楼。因此, 将高秆滇重楼和矮秆滇重楼作为重楼商品使用可能是合理的。

5 结论

本研究系统探讨了 NIRS 在重楼及其常见混伪品鉴别中的应用。研究发现, NIRS 可在短时间 (约 20 s) 内完成样品的检测。通过 PCA 和 OPLS-DA 模型对样本进行分析, 结果显示, OPLS-DA 模型的分类效果优于 PCA, 可以有效区分重楼及其混伪品, 但预测能力较差。ANN 识别准确率达到 100% , 且预测能力良好。在不同样本的 2D-IR 图谱中, $5\,897\sim 5\,600\text{ cm}^{-1}$ 和 $4\,497\sim 4\,200\text{ cm}^{-1}$ 区间差异显著。2D-IR 数据分析步骤简单, 无需大量样本进行模型训练, 为重楼及其混伪品的快速鉴别提供了新的思路。NIRS-ANN 和 2D-IR 方法适用于重楼及其混伪品的快速鉴别。

此外, 研究结果还表明, 目前将高秆滇重楼和矮秆滇重楼作为重楼商品使用是合理的。但目前关于这 2 种滇重楼品种在化学成分及药效差异的研究尚不足; 未来研究应深入探讨不同滇重楼品种的化学成分及药效。基于 NIRS 技术和前人的研究, 药典法定基原的滇重楼和七叶一枝花在化学成分上存在显著差异, 因此在临床应用中, 有必要区分使用滇重楼和七叶一枝花, 以确保临床用药的有效性和安全性。本研究还发现, 混伪品毛重楼、万年青和吉林延龄草, 在化学成分上与正品重楼有明显差异, 不适宜作为重楼的替代品使用。本研究为重楼及其混伪品的快速鉴别和质量控制提供了重要的科学参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 271.
- [2] Wen Y S, Ni W, Qin X J, et al. Steroidal saponins with

- cytotoxic activity from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 12: 31-34.
- [3] Zhang J Y. Chemical assessment of wild *Paris rhizome* from Southwest China [J]. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2012, 6(40): 2802-2807.
- [4] 王骞, 丁媛, 杨敏, 等. 滇重楼品质与产地和表型性状相关性分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(15): 3203-3212.
- [5] 胡宪清, 傅慎文. 万年青中毒致房室传导阻滞 1 例 [J]. 心电图杂志, 2009, 28(6): 428.
- [6] Wang Y Z, Li P. Effect of cultivation years on saponins in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* using ultra-high liquid chromatography-tandem mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Plant Growth Regul*, 2018, 84(2): 373-381.
- [7] Wu Z, Zhang J, Xu F R, et al. Rapid and simple determination of polyphyllin I, II, VI, and VII in different harvest times of cultivated *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz by UPLC-MS/MS and FT-IR [J]. *J Nat Med*, 2017, 71(1): 139-147.
- [8] 王旭星, 贾天颖, 杨成金, 等. 重楼 2 种基原植物不同部位中 9 个皂苷含量比较 [J]. 中国现代中药, 2022, 24(11): 2132-2140.
- [9] 谢梦迪, 田亮玉, 桂新景, 等. 近红外光谱技术结合化学计量学应用于川贝母真伪与规格的快速辨识研究 [J]. 中草药, 2022, 53(8): 2490-2498.
- [10] 黄志伟, 郭拓, 黄文静, 等. 近红外光谱技术在名贵中药材质量评价中的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6328-6336.
- [11] 安冉, 刘刚, 林浩坚, 等. FT-IR 光谱结合曲线拟合与 2D-IR 光谱鉴别松茸 [J]. 光散射学报, 2018, 30(4): 373-378.
- [12] Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 22(5): 717-727.
- [13] 张红涛, 张亮, 谭联, 等. 基于近红外高光谱成像的单籽粒小麦品种分类研究 [J]. 粮食与油脂, 2022, 35(12): 59-62.
- [14] 李庆, 闫晓剑, 赵魁, 等. 基于云端-互联便携式近红外技术现场快检西红花真伪 [J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(10): 3029-3037.
- [15] 刘亚超, 李永玉, 彭彦昆, 等. 近红外二维相关光谱的掺和大米判别 [J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(5): 1559-1564.
- [16] 王元忠, 沈涛. 红外光谱结合化学计量学对栽培滇重楼的产地鉴别研究 [J]. 中草药, 2023, 54(5): 1574-1581.
- [17] 赵艳丽, 张霁, 袁天军, 等. 近红外光谱快速鉴别不同产地药用植物重楼的方法研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(7): 1831-1835.
- [18] 黄得栋, 何微微, 马晓辉, 等. 近红外光谱法鉴别不同产地的南五味子 [J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(2): 47-50.
- [19] Zhao F, Du G, Huang Y. Exploring the use of near-infrared spectroscopy as a tool to predict quality attributes in prickly pear (*Rosa roxburghii* Tratt) with chemometrics variable strategy [J]. *J Food Compos Anal*, 2022, 105: 104225.
- [20] Tahir H E, Arslan M, Mahunu G K, et al. Authentication of the geographical origin of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) using various spectroscopies: NIR, low-field NMR and fluorescence [J]. *Food Contr*, 2020, 114: 107231.
- [21] Shi L, Li L X, Zhang F J, et al. Nondestructive detection of *Panax notoginseng* saponins by using hyperspectral imaging [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2022, 57(7): 4537-4546.
- [22] Qian L L, Li D W, Song X J, et al. Identification of Baha'sib mung beans based on Fourier transform near infrared spectroscopy and partial least squares [J]. *J Food Compos Anal*, 2022, 105: 104203.
- [23] Chen X, Liu H G, Li J Q, et al. A geographical traceability method for *Lanmaoa asiatica* mushrooms from 20 township-level geographical origins by near infrared spectroscopy and ResNet image analysis techniques [J]. *Ecol Inform*, 2022, 71: 101808.
- [24] 赵飞亚, 陶爱恩, 黎氏文梅, 等. 基于形态和红外光谱分析的云南重楼及近似种的快速鉴别 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 702-709.
- [25] 李龙星, 李海峰, 王成军. 9 种重楼属植物叶中甾体皂苷成分差异的研究 [J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(19): 12-18.
- [26] Svante W, Kim E, Paul G. Principal component analysis [J]. *Chemometr Intell Lab*, 1987, 2(1-3): 37-52.
- [27] 王震. 不同生长期穿心莲药材 HPLC 指纹图谱及化学模式识别 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(3): 410-420.
- [28] Guan Q, Pu T T, Zhou Z Y, et al. Multi-element and metabolite characterization of commercial *Phyllanthi Fructus* with geographical authentication and quality evaluation purposes [J]. *Food Contr*, 2023, 151: 109787.
- [29] 余代鑫, 郭盛, 张霞, 等. 近红外光谱技术结合化学计量学和机器学习算法的干姜产地溯源研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(17): 4583-4592.
- [30] Liang N, Sun S S, Zhang C, et al. Advances in infrared spectroscopy combined with artificial neural network for the authentication and traceability of food [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(11): 2963-2984.

- [31] 李早慧, 都晓伟. 滇重楼药材的研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 3032-3048.
- [32] 黄冬兰, 陈小康. 二维相关红外光谱技术快速鉴别三七及其伪品 [J]. 光散射学报, 2017, 29(1): 79.
- [33] 杨济齐, 沈婉莹, 魏晓芳, 等. 基于二维相关红外光谱的陈皮快速鉴别研究 [J]. 中南药学, 2022, 20(3): 544-550.
- [34] 杨兰芬, 孙素琴, 周群, 等. 三种紫苏子的红外光谱分析与鉴定 [J]. 现代仪器与医疗, 2018, 24(1): 88-91.
- [35] 孙素琴, 周群, 秦竹. 中药二维相关红外光谱鉴定图集 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 67-76.
- [36] 陆保平, 林根平, 曾建华, 等. 两种重楼混伪品的鉴别比较 [J]. 中国药业, 2007, 16(18): 55-56.
- [37] 方海兰, 夏从龙, 段宝忠, 等. 基于 DNA 条形码的中药材种子种苗鉴定研究: 以重楼为例 [J]. 中药材, 2016, 39(5): 986-990.
- [38] 肖聪, 饶伟文, 吴萌, 等. 20 批重楼药材皂苷类成分分析与其 TLC 鉴别方法探讨 [J]. 中国药品标准, 2016, 17(6): 403-405.
- [39] 巨博雅, 朱厚达, 李燕敏, 等. 重楼药材和混伪品中 5 种皂苷的含量及对《中国药典》2015 年版重楼含量测定修订的探讨 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1745-1755.
- [40] 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.
- [41] 朱英杰, 陈士林, 姚辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药科学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [42] Duan B Z, Wang Y P, Fang H L, et al. Authenticity analyses of *Rhizoma Paridis* using barcoding coupled with high resolution melting (Bar-HRM) analysis to control its quality for medicinal plant product [J]. *Chin Med*, 2018, 13: 8.
- [43] 胡建勇, 缪明锦, 闻焜, 等. 基于红外光谱结合化学计量学及 HPLC 色谱的紫丹参及其近缘种成分差异 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 8-14.
- [44] 姚婉清, 彭梦侠, 刘婷. 近红外光谱结合化学计量学方法在化学分析中的应用 [J]. 嘉应学院学报, 2018, 36(5): 17-27.
- [45] 黄圆圆. 15 种重楼属植物根茎的化学成分分析 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018: 152.
- [46] 杨青淑. 基于亲缘关系和次生代谢物的重楼属药用植物资源发掘研究 [D]. 大理: 大理大学, 2022: 107.
- [47] 于永波, 王智昊, 侯玥, 等. 口服万年青根茎中毒老年患者 1 例 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(15): 3325-3326.
- [48] 段宝忠, 黄林芳, 谢彩香, 等. 基于 TCM-GIS 技术的云南重楼生产区划初探 [J]. 价值工程, 2010, 29(2): 140-142.
- [49] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 15 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2016: 86-96.
- [50] 高嘉宁, 张丹, 何海燕, 等. 基于正交偏最小二乘判别分析法分析滇重楼和华重楼品质成分差异性 [J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(1): 136-142.
- [51] 刘立敏, 韩多, 李海峰, 等. HPLC 含量测定和 DNA 分子标记技术对重楼属药用植物的鉴定 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(2): 355-359.
- [52] 李焘. 滇重楼与七叶一枝花化学成分及生物活性的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2011.
- [53] 王强, 徐国钧, 程永宝. 中药七叶一枝花类的抑菌和止血作用研究 [J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(4): 251-253.
- [54] 丁立帅, 赵猛, 李燕敏, 等. 七叶一枝花和滇重楼提取物的制备、表征及其体外溶血作用分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21): 7-12.
- [55] 唐玲, 王艳芳, 李荣英, 等. 滇重楼不同居群的表型多样性研究 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(18): 89-95.
- [56] 杨青淑, 王婧, 江媛, 等. 重楼属植物分子生物学研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(15): 4763-4770.
- [57] 刘玉雨. 云南重楼属植物分类整理与质量评价研究 [D]. 大理: 大理大学, 2019: 114.
- [58] 张开元. 两种基因型云南重楼的荧光可视化真伪鉴定及化学特征相关性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018: 88.
- [59] Ji Y H, Liu C K, Yang J, et al. Ultra-barcoding discovers a cryptic species in *Paris yunnanensis* (Melanthiaceae), a medicinally important plant [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 411.
- [60] 兰茂. 滇南本草 [M]. 昆明: 云南人民出版社, 1959: 23.
- [61] 王嘉乐, 杨青淑, 江媛, 等. 重楼道地性研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(8): 2572-2581.

[责任编辑 时圣明]