

刘 飞,杨春艳,道永艳,等. 傅里叶变换红外光谱对滇重楼生长年限的鉴别研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):300-304.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.088

# 傅里叶变换红外光谱对滇重楼生长年限的鉴别研究

刘 飞<sup>1</sup>, 杨春艳<sup>1</sup>, 道永艳<sup>1</sup>, 杨会云<sup>1</sup>, 王元忠<sup>2</sup>

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

**摘要:**用傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)结合光谱软件 Omnic 8.0 中光谱检索的方法对同一产地滇重楼样品进行生长年限的鉴别研究。测试了 68 株、7 种不同生长年限滇重楼主根木质部样品的红外光谱,利用 Omnic 8.0 软件建立了 Paris0、Paris1、Paris2、Paris4 等 4 个光谱库,所有光谱库均分别由每个生长年限任意 6 株主根木质部样品的平均红外光谱、平均一阶导数光谱、平均二阶导数光谱和平均四阶导数光谱组成。各样品红外光谱及其导数光谱分别与相应的光谱库进行光谱检索来鉴别样品的生长年限,比较了红外光谱及其 3 种导数光谱在相关性、绝对微分差、平方微分差 3 种检索算法,以及 1 800~900 cm<sup>-1</sup>、1 800~500 cm<sup>-1</sup>、全光谱(4 000~400 cm<sup>-1</sup>)3 个检索范围的鉴别效果。结果表明:红外四阶导数光谱、绝对微分差算法、全光谱范围的检索鉴别效果较好;基于主根木质部样品四阶导数红外光谱在全光谱范围、绝对微分差算法的光谱检索对滇重楼生长年限鉴别正确率为 86.8%。由结果看出,FTIR 结合光谱检索的方法可以鉴别滇重楼生长年限,为重楼药材生长年限的鉴定提供了一种新思路。

**关键词:**傅里叶变换红外光谱;光谱检索;滇重楼;生长年限;鉴别

**中图分类号:** O657.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0300-04

滇重楼(云南重楼)[*Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. - Mazz.] 和七叶一枝花 [*Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara] 主要分布于中国云南、四川、贵州等地,是中药材重楼的基源植物<sup>[1]</sup>。滇重楼以根茎入药,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效<sup>[2]</sup>。滇重楼富含多种甾体皂苷、黄酮素、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<sup>[3]</sup>。药理研究表明,重楼药材具有抗癌、抗菌消炎、止血镇痛、驱虫、收缩子宫等药理作用而被广泛应用于临床治疗,是云南名药云南白药、宫血宁和季德胜蛇药片等中成药的主要成分<sup>[3-4]</sup>。滇重楼根茎生长缓慢,从种子开始大约需要生长 7 年才能采收<sup>[5]</sup>,已有的研究表明生长年限是影响滇重楼药材品质的重要因素<sup>[5-7]</sup>。因此,对滇重楼药材生长年限的鉴定是其品质保障的基础。

关于滇重楼药材生长年限的鉴定,目前主要采用性状法来鉴定。性状鉴定法主观性强,需要有经验的人来鉴别。通过理化方法或 DNA 分子技术鉴定,需对药材进行分离提取,专业性强、技术难度大,在生长年限鉴定方面比较困难。近红外光谱和拉曼光谱可直接测试药材,但影响因素多,不利于推广<sup>[8]</sup>。傅里叶变换红外光谱能全面反映样品内部所有组分定性和定量的整体信息,具有用量少、灵敏度高、操作简单等优点。导数光谱能放大光谱差异,强化光谱特征。红外光谱

及其导数光谱应用于中药材的品种、产地、栽培模式等的鉴别研究已有报道<sup>[9-10]</sup>,但对中药材生长年限的鉴别研究鲜有报道。光谱检索是光谱分析中鉴别化合物的一种方法,此方法对植物品种的鉴别研究已有成功的应用报道<sup>[10]</sup>,但对植物生长年限的鉴别研究未见报道。本试验拟通过对 7 种生长年限的 68 株滇重楼主根木质部样品的红外光谱及其导数光谱,采用光谱检索的方法来研究滇重楼生长年限的鉴别方法,以期中药材生长年限的鉴别提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Frontier 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Perkin - Elmer 公司),装备 DTGS 检测器,扫描范围为 4 000~400 cm<sup>-1</sup>,分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>,累计扫描 16 次;光谱数据处理和光谱检索用 Omnic 8.0 软件。

溴化钾(天津市福晨化学试剂厂)为分析纯;试验药材: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,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,并经云南省农业科学院药用植物研究所鉴定为百合科重楼属植物滇重楼。生长年限分别为 2、3、4、8、9 年的各采集了 10 株,生长年限分别为 5、7 年的各采集了 9 株。将滇重楼植株的主根洗净后经 60℃ 恒温烘干至恒质量,分别取各植株主根木质部制备样品。表 1 为试验所用滇重楼样品的生长年限及其编号。

### 1.2 方法

将所取样品放入玛瑙研钵,磨为均匀粉末后,按样品与溴化钾质量比 1:50 加入溴化钾,并搅磨均匀,然后压片测试光谱。所有光谱均扣除背景,并使用 Omnic 8.0 软件进行自动基线校正、九点平滑和归一化等预处理,同时求出每个样品光谱的一阶导数光谱、二阶导数光谱、四阶导数光谱。取每种生

收稿日期:2015-08-09

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

作者简介:刘 飞(1974—),男,云南江川人,硕士,副教授,主要从事生物红外光谱研究。E-mail: yxtelf@163.com。

通信作者:王元忠,硕士,副研究员,主要从事药用植物资源评价研究。E-mail: yzwang1981@126.com。

表1 试验所用滇重楼样品的生长年限及其编号

样品生长年限 (年)	代号	编号
2	A	A1 - A10
3	B	B1 - B10
4	C	C1 - C10
5	D	D1 - D9
7	E	E1 - E9
8	F	F1 - F10
9	G	G1 - G10

长年限任意6个样品的光谱求其平均光谱及相应的一阶、二阶、四阶导数光谱,在 Omnic 8.0 软件中建立 Paris0、Paris1、Paris2、Paris4 4 个光谱数据库,每个数据库分别由各生长年限主根木质部 6 个样品光谱的平均红外光谱及其一阶导数光谱、二阶导数光谱、四阶导数光谱组成。用样品光谱及其导数光谱分别与光谱数据库 Paris0、Paris1、Paris2、Paris4 中的光谱进行检索匹配,通过匹配得分对滇重楼样品的生长年限进行鉴别分析。

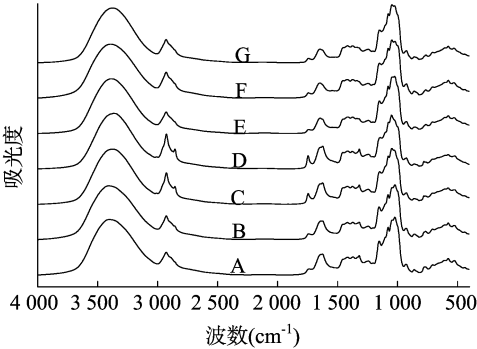
2 结果与分析

2.1 不同生长年限重楼的红外光谱及其二阶导数光谱特征

由图 1 每种生长年限滇重楼主根木质部任意 6 个样品的平均红外光谱可知,不同生长年限滇重楼主根木质部红外光谱的峰形基本相同,共显示了 3 400、2 929、1 740、1 640、1 417、1 357、1 320、1 240、1 153、1 077、1 050、1 018、926、860、768、706、577、525 cm<sup>-1</sup>附近等约 20 个较明显的共有吸收峰;其中 3 400 cm<sup>-1</sup>附近宽而强的吸收峰归属为多糖的羟基形成多种氢键 O—H 键和氨基 N—H 键的伸缩振动吸收;2 929 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰是脂类、多糖等亚甲基 C—H 反对称伸缩振动;1 740 cm<sup>-1</sup>附近的弱吸收峰,归属为脂类羰基 C=O 伸缩振动吸收峰;1 640 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰主要为甾体苷、孕甾烷苷、黄酮苷和多糖类物质中 O—H 弯曲振动和羰基 C=O 伸缩振动吸收峰<sup>[11]</sup>;1 417 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰归属为亚甲基变角振动;1 357、1 320 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰归属为亚甲基面外摇摆振动吸收峰;1 240 cm<sup>-1</sup>附近吸收峰主要来自羧酸中 C—OH 的伸缩振动;在 1 200 ~ 950 cm<sup>-1</sup>多糖吸收区显示了 1 153、1 077、1 050、1 018 cm<sup>-1</sup>附近 4 个阶梯增强的吸收峰,主要为苷类、醇类或糖类物质 C—O 伸缩振动吸收峰<sup>[11]</sup>;其中 1 153 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰是多糖和苷类物质 C—O 键特征振动和甾体皂苷元中羟基 O—H 的弯曲振动<sup>[16]</sup>;1 024 cm<sup>-1</sup>附近吸收峰归属为直链 C—C 的伸缩振动;926、860、768、706 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰为糖环中的 C—C 伸缩振动和甾体皂苷的特征吸收振动<sup>[11]</sup>。滇重楼主根木质部的二阶导数红外光谱图如图 2 所示。比较图 1、图 2 可知,二阶导数红外光谱明显增强了样品光谱的分辨力,原光谱中被掩盖的子峰、各吸收峰的峰位、肩峰位置准确地展现出来。由图 2 可知,二阶导数光谱中 1 162、1 108、1 078、1 058、1 016、985、922、861、764、710、572 cm<sup>-1</sup>附近等峰与淀粉二阶导数光谱中的特征峰在峰形和峰位上都很一致,结合原光谱中 1 153、1 077、1 018、926、860、768、577 cm<sup>-1</sup>等吸收峰在峰形和峰位上也与淀粉红外光谱特征峰的峰形和峰位很相似,说明滇重

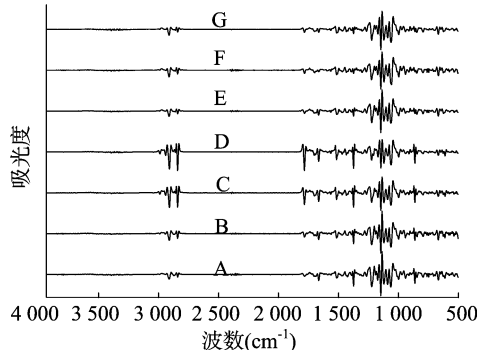
楼主根木质部中含有大量的淀粉<sup>[9]</sup>。上述光谱特征表明,滇重楼主根木质部中的主要物质成分为淀粉,同时还含有少量的皂苷和脂肪酸类物质。

观察图 1 和图 2,比较各生长年限的红外光谱,其差异主要表现为:(1)红外光谱中,生长年限为 4 年和 5 年的样品光谱,在 3 008、2 853 cm<sup>-1</sup>附近,显示了比较明显的吸收峰,同时在 2 929、1 746 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰比其他生长年限的强;二阶导数红外光谱中,4、5 年的样品光谱还在 2 960、2 896、2 875 cm<sup>-1</sup>附近显示了吸收峰。3 008 cm<sup>-1</sup>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<sup>[16]</sup>;2 960 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰归属为甲基 C—H 反对称伸缩振动;2 896 cm<sup>-1</sup>归属为次甲基 C—H 伸缩振动;2 875 cm<sup>-1</sup>归属为甲基 C—H 对称伸缩振动。说明生长年限为 4、5 年的滇重楼主根木质部中脂肪酸类物质的含量比其他生长年限的多。(2)在多糖类物质的特征吸收区,随着生长年限的增加,红外光谱和二阶导数红外光谱均反映 1 050 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰逐年增强;红外光谱中 1 103 cm<sup>-1</sup>附近的吸收峰在低生长年限被掩盖,高生长年限有显示,二阶导数光谱中此峰生长年限为 5 年和 2 年的较强,其他年限基本一致。二阶导数光谱在 970 ~ 710 cm<sup>-1</sup>光谱范围内,2、4、5 年的样品光谱在 781 cm<sup>-1</sup>位置上显示了较明显的吸收峰,其他生长年限较弱;此范围不同生长年限的光谱在峰形和峰位上还显示了一些微小差异,与不同生长年限样品中皂苷类物质类型差异有关。上述光谱差异说明随着生长年限的增加,滇重楼主根皂苷类物质的积累增加,不同生长年限滇重楼所含的皂苷类型存在差异。



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的红外光谱



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木质部的二阶导数红外光谱

2.2 FTIR 光谱结合光谱检索对滇重楼生长年限的鉴别

光谱检索是一种将红外光谱数字化,然后利用某种算法对未知物的谱图和光谱库中的标准谱图进行数据点对数据点的计算比对,得出匹配数值来确定最佳匹配,从而获得对未知物鉴定的方法。采用光谱检索方法对各生长年限样品光谱与由相应的平均红外光谱组成的光谱库进行检索匹配鉴别,匹配得分的大小表示彼此之间的亲密程度,值越大匹配程度越高。样品光谱与光谱库中已知生长年限光谱匹配分值最大的,即视样品为该生长年限。在 Omnic 8.0 软件中,光谱检索的算法设置有 5 种,其中相关性算法可以消除基线的影响;绝对差算法可以加大光谱图与标准谱的小差别权重;平方差算法适合噪音较大的谱图;绝对微分差算法可以消除光谱峰偏移的影响,有利于没有独特吸收峰的未知样品光谱检索;平方微分差算法强调大峰和峰形的差异。微分算法有利于基线漂移或倾斜的未知样品光谱检索,也有利于信噪比差的未知样品光谱检索<sup>[12]</sup>。本试验的样品是不同生长年限滇重楼的主

根本质部,由“2.1”节中的光谱分析可知,不同生长年限样品光谱的差异主要体现在组成物质的含量及微量成分的差异方面,因此本试验主要采用绝对微分差算法来进行光谱检索;同时比较了绝对微分差、平方微分差和相关性 3 种算法进行光谱检索鉴别的情况。在鉴别研究中,所有样品光谱均作为未知生长年限样品光谱,用样品光谱及其导数光谱分别与光谱数据库 Paris0、Paris1、Paris2、Paris4 中的光谱进行检索匹配,对不同级别光谱的检索鉴别效果进行比较;同时还对 1 800 ~ 900 cm<sup>-1</sup>、1 800 ~ 500 cm<sup>-1</sup>、全光谱范围(4 000 ~ 400 cm<sup>-1</sup>)进行了检索鉴别比较。由于篇幅限制,表 2 列出了样品的红外光谱及其导数光谱与相应光谱数据库 Paris0、Paris2、Paris4 在全光谱范围进行绝对微分差算法检索匹配错误的样品及匹配得分高的前 3 个样品和分值;表 3 列出了四阶导数光谱在全光谱范围进行平方微分差和相关性算法检索鉴别错误的样品及得分高的样品和分值。

表 2 全光谱范围绝对微分差检索匹配有错误的样品及得分高的前 3 个品种及分值

样品	匹配得分高的前 3 个品种及分值								
	原光谱			二阶导数光谱			四阶导数光谱		
A4	<b>B(92.7)</b>	A(91.1)	F(89.1)	A(79.6)	F(75.9)	G(74.2)	A(76.4)	E(65.4)	F(64.6)
A8	<b>B(92.1)</b>	A(90.7)	E(90.5)	<b>G(81.5)</b>	E(79.5)	F(76.3)	A(73.2)	E(70.7)	G(70.3)
A9	<b>B(89.1)</b>	A(88.5)	F(86.3)	<b>G(74.6)</b>	A(72.5)	E(71.7)	A(69.5)	G(66.2)	E(62.3)
B2	<b>F(89.1)</b>	B(88.2)	A(84.2)	B(76.47)	F(67.0)	F(66.5)	B(65.3)	A(55.1)	F(55.0)
B3	<b>F(89.0)</b>	B(85.7)	E(81.9)	B(74.71)	F(72.0)	G(71.0)	B(66.9)	F(57.9)	G(57.3)
B6	<b>C(85.2)</b>	D(84.3)	A(77.0)	<b>C(70.70)</b>	D(69.5)	B(59.9)	B(62.3)	C(60.3)	D(57.6)
B7	<b>C(83.0)</b>	D(80.5)	A(74.6)	<b>C(63.57)</b>	D(63.3)	B(61.7)	B(56.4)	C(55.6)	D(55.5)
B9	<b>F(87.2)</b>	B(85.4)	A(82.7)	<b>F(70.92)</b>	G(70.0)	E(69.0)	<b>A(60.6)</b>	E(57.6)	G(57.5)
B10	<b>F(90.2)</b>	A(87.7)	B(87.5)	<b>A(75.89)</b>	G(70.0)	F(75.4)	<b>A(67.8)</b>	B(66.1)	G(65.1)
C1	<b>G(89.0)</b>	C(88.1)	E(87.6)	C(78.88)	E(77.9)	D(77.1)	<b>D(76.9)</b>	C(75.9)	G(71.0)
C3	<b>A(86.0)</b>	E(86.0)	B(85.2)	<b>A(73.47)</b>	C(73.4)	E(71.9)	C(73.8)	A(66.9)	E(66.2)
C4	<b>B(85.1)</b>	E(84.5)	A(83.0)	C(70.82)	E(69.0)	D(68.5)	C(75.2)	D(65.6)	A(64.0)
C6	<b>G(89.9)</b>	E(89.8)	C(85.0)	<b>E(78.80)</b>	G(76.3)	C(74.7)	C(75.4)	E(69.8)	G(67.6)
C7	<b>B(90.3)</b>	F(89.4)	A(87.7)	<b>G(76.14)</b>	E(75.7)	F(73.5)	C(71.6)	G(66.0)	D(65.2)
C8	<b>D(88.1)</b>	C(82.9)	G(76.4)	<b>D(75.31)</b>	C(69.6)	E(61.0)	<b>D(68.8)</b>	C(63.4)	E(58.7)
C10	<b>D(90.9)</b>	C(89.9)	G(78.5)	C(81.44)	D(80.6)	E(62.3)	<b>D(67.5)</b>	C(66.1)	E(56.3)
D4	<b>C(88.2)</b>	G(88.1)	E(87.0)	D(77.27)	G(76.2)	E(76.1)	D(75.7)	G(69.1)	E(68.3)
D5	<b>C(91.7)</b>	G(85.6)	E(84.4)	D(82.07)	C(82.0)	E(72.7)	D(79.1)	C(71.9)	G(66.5)
D6	<b>C(91.7)</b>	G(88.5)	E(88.2)	<b>C(80.63)</b>	D(80.2)	E(74.7)	D(81.5)	C(74.0)	E(67.5)
D7	<b>F(90.0)</b>	B(87.9)	E(84.6)	<b>G(75.37)</b>	E(74.6)	F(74.1)	<b>E(66.9)</b>	G(65.9)	F(63.2)
D8	<b>G(91.6)</b>	E(91.5)	C(89.2)	<b>E(82.69)</b>	G(81.4)	C(77.8)	D(80.6)	C(76.7)	E(74.0)
D9	<b>C(88.0)</b>	G(85.6)	E(85.4)	D(79.17)	C(75.6)	E(71.9)	D(76.6)	C(69.5)	E(66.0)
E2	<b>G(86.6)</b>	E(84.6)	C(84.4)	E(76.73)	G(74.1)	C(71.4)	E(72.9)	D(70.6)	G(78.9)
E3	E(94.1)	G(94.0)	B(89.4)	<b>G(85.74)</b>	E(85.6)	F(79.2)	E(81.1)	G(78.5)	F(67.9)
E9	<b>B(87.6)</b>	A(85.5)	E(83.9)	E(65.92)	G(64.9)	B(64.7)	<b>A(60.3)</b>	E(59.61)	G(54.6)
F1	F(90.2)	E(82.7)	B(82.5)	F(71.70)	E(69.6)	G(69.3)	<b>C(62.5)</b>	F(60.8)	D(60.1)
F3	<b>G(89.8)</b>	E(89.6)	B(88.8)	F(77.39)	G(77.1)	E(76.9)	F(71.3)	A(65.8)	E(65.6)
F5	F(92.0)	B(85.1)	E(84.5)	<b>G(76.70)</b>	F(76.1)	E(73.5)	F(69.6)	G(64.2)	A(61.3)
F6	<b>G(87.9)</b>	E(86.7)	F(85.8)	F(75.98)	E(72.8)	G(72.8)	F(69.0)	E(63.5)	G(63.3)
G1	<b>E(91.6)</b>	A(91.2)	G(91.0)	G(82.69)	E(80.5)	A(86.4)	G(76.7)	E(70.8)	C(69.4)
G3	<b>E(93.3)</b>	G(92.3)	F(86.1)	G(83.29)	E(79.2)	F(71.7)	G(70.1)	E(68.6)	F(61.4)
G6	E(93.0)	G(93.0)	F(87.4)	G(83.27)	E(82.6)	F(75.2)	G(79.7)	E(72.6)	F(68.4)
G7	F(92.8)	G(92.2)	B(86.6)	G(84.60)	E(82.8)	E(75.1)	G(80.9)	E(73.3)	D(65.6)
G8	<b>F(92.8)</b>	E(91.7)	G(90.6)	G(85.5)	E(83.3)	F(80.6)	G(74.9)	E(74.7)	F(72.0)
G9	<b>F(91.7)</b>	B(88.8)	E(87.6)	<b>E(78.05)</b>	G(77.9)	F(77.0)	<b>F(69.6)</b>	G(68.9)	E(68.3)

注:黑色斜体数据表示错误的匹配样品及匹配得分。表 3 同。

2.2.1 全光谱范围绝对微分差算法的光谱检索鉴别 滇重楼主根木质部样品的红外光谱由于物质组成成分主要为糖苷类物质,光谱振动带重叠严重。导数光谱能将重叠的谱带分开,消除光谱中背景吸收等影响,提高光谱的分辨能力。一阶导数光谱能够显示出原光谱的吸收峰和肩峰;二阶导数光谱有很强的分辨能力,光谱的负峰对应原光谱中吸收峰和肩峰的准确位置;四阶导数光谱的分辨能力比二阶导数光谱更强;但导数光谱也会降低光谱的信噪比<sup>[10,12]</sup>。本试验在测试样品光谱时,适当提高了样品与溴化钾的质量比,测试光谱的信噪比相对较高,为利用样品导数光谱提供了便利。将全部 68 株滇重楼主根木质部样品的红外光谱、一阶导数红外光谱、二阶导数红外光谱、四阶导数红外光谱分别与光谱数据库 Paris0、Paris1、Paris2、Paris4 在全光谱范围进行绝对微分差算法的检索鉴别。在红外光谱检索中,有 36 个样品的检索结果与自身所在生长年限匹配度最高,占总样品数的 52.9%;一阶导数红外光谱检索中有 43 个样品的检索结果与自身所在生长年限匹配度最高,占总样品数的 63.2%;二阶导数红外光谱检索中有 52 个样品的检索结果与自身所在生长年限匹配度最高,占总样品数的 76.4%;四阶导数红外光谱检索中有 59 个样品的检索结果与自身所在生长年限匹配度最高,占总样品数的 86.8%。以上数据表明,绝对微分差算法的光谱检索对滇重楼生长年限的鉴别中红外光谱的正确率为 52.9%,一阶导数红外光谱的正确率为 63.2%,二阶导数红外光谱的正确率为 76.5%,四阶导数红外光谱的正确率为 86.8%。说明导数红外光谱检索的正确率高于红外光谱,且随着导数红外光谱级别的增加,检索正确率增大;基于样品四阶导数红外光谱进行绝对微分差算法的光谱检索,对滇重楼生长年限的鉴别效果较好。

2.2.2 四阶导数光谱在全光谱范围内不同算法的检索鉴别 将全部 68 株滇重楼主根木质部样品的四阶导数红外光谱分别与光谱库 Paris4 在全光谱范围进行平方微分差算法检索、相关性算法检索的匹配鉴别。由表 3、表 2 可知,在绝对微分差算法检索中,有 59 个样品的匹配结果与自身所在生长年限匹配度最高,占总样品数的 86.8%;在平方微分差算法检索和相关性算法检索中,均有 56 个样品的匹配结果与自身所在生长年限匹配度最高,占总样品数的 82.4%。说明基于滇重楼样品四阶导数红外光谱检索对生长年限的鉴别,3 种不同的检索算法都有较好的效果,都可以鉴别不同生长年限的滇重楼。比较 3 种算法的检索匹配得分结果,相关性算法检索的匹配得分较高,其次为平方微分差算法检索,绝对微分差算法检索的最低,但从检索匹配的正确率看,绝对微分差算法的检索正确率最高,表明绝对微分差算法的光谱检索更合适对滇重楼生长年限的鉴别。

2.2.3 四阶导数光谱在不同范围绝对微分差算法的检索鉴别 将全部 68 株滇重楼主根木质部样品的四阶导数红外光谱与光谱库 Paris4 分别在光谱范围 1 800 ~ 900、1 800 ~ 500 cm<sup>-1</sup>进行绝对微分差算法的检索鉴别。检索结果为:在 1 800 ~ 900 cm<sup>-1</sup>光谱范围有 50 个样品检索匹配正确,占总数的 73.5%;在 1 800 ~ 500 cm<sup>-1</sup>光谱范围内有 56 个样品检索匹配正确,占总数的 82.4%。结合“2.2.1”节中在全光谱范

表 3 四阶导数光谱进行全光谱检索匹配错误的样品及最高得分和品种

样品	最高得分和品种	
	平方微分差	相关性
B9	A(71.7)	A(82.4)
B10	A(74.3)	A(85.8)
C1	D(85.1)	D(94.1)
C7	G(75.3)	G(87.0)
C8	D(73.9)	D(85.3)
C10	D(75.3)	D(87.0)
D7	G(74.4)	G(85.9)
E9	A(68.9)	A(78.4)
F1	A(61.5)	A(63.9)
G8	E(79.4)	E(91.1)
G9	F(77.1)	F(88.9)
G10	F(78.9)	F(90.7)

围的检索结果,说明在 3 个不同光谱范围采用绝对微分差算法的光谱检索来鉴别滇重楼的生长年限,全光谱范围的效果较好。1 800 ~ 900 cm<sup>-1</sup>光谱范围反映了脂类、蛋白质、酮类、碳水化合物类物质等的特征振动;1 800 ~ 500 cm<sup>-1</sup>光谱范围除反映上述物质的特征振动外,还反映多糖类物质的糖环振动和皂苷类物质的特征振动;全光谱范围反映了样品组成物质成分的所有光谱信息。3 个不同光谱范围的鉴别结果表明,不同生长年限的滇重楼主根样品,尤其是生长年限比较接近的,其物质组分及含量差异很小,通过光谱检索的方法来鉴别比对数据点的增加有利于微小差异的积累,提高鉴别正确率。

3 结论与讨论

利用傅里叶变换红外光谱技术测试了 68 株 7 种不同生长年限滇重楼主根木质部的红外光谱,利用光谱软件 Omnic 8.0 计算了各样品红外光谱的一阶、二阶、四阶导数红外光谱,各生长年限任意 6 个样品光谱的平均红外光谱及相应的平均导数红外光谱;以平均红外光谱及其平均导数光谱作为各生长年限标准光谱,在 Omnic 8.0 软件中建立各生长年限不同级别光谱的标准光谱库,各样品光谱及其导数光谱分别与相应的光谱库进行光谱检索,通过检索得到的匹配分值对滇重楼生长年限进行鉴别。比较了 4 种级别的光谱、3 种不同检索算法、3 个不同光谱检索范围的鉴别效果,结果表明四阶导数红外光谱、绝对微分差算法、全光谱范围的检索鉴别效果较好。基于四阶导数红外光谱在全光谱范围进行绝对微分差算法的光谱检索鉴别,样品生长年限的鉴别正确率为 86.8%。

在鉴别研究中已注意到生长年限匹配错误的样品,有较多的样品鉴别结果与实际生长年限的差别仅为 1 年,这与滇重楼主根生长较缓慢,相邻生长年限的滇重楼主根样品的物质组分及含量非常接近有关。如果在实际中允许鉴别的误差为 1 年,那么本试验的鉴别结果正确率将进一步提高。比如在基于样品四阶导数红外光谱在全光谱范围进行绝对微分差算法的检索鉴别中,鉴别错误的样品、鉴别生长年限与实际生长年限误差超过 1 年的只有 3 个,鉴别的相对正确率增加为 95.6%。利用滇重楼主根的红外光谱结合 Omnic 8.0 中光谱

郝莉花,董彩文,陈春生,等. 红枣贮藏期间主要病原真菌的分离、鉴定与 ITS 序列分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):304-307.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.089

# 红枣贮藏期间主要病原真菌的分离、鉴定与 ITS 序列分析

郝莉花<sup>1</sup>,董彩文<sup>2</sup>,陈春生<sup>2</sup>,纵伟<sup>2</sup>

(1. 河南省产品质量监督检验院,河南郑州 450000; 2. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院,河南郑州 450002)

**摘要:**为了解红枣贮藏期间主要病原真菌的污染情况,首先对红枣表面的真菌进行分离,然后经过形态观察,并结合 ITS 序列扩增、测序和序列比对,对分离的相关病原菌进行鉴定。结果显示,有 8 种真菌菌系在红枣表面上出现。其中,链格孢菌(*Alternaria* spp.)和青霉(*Penicillium* spp.)是主要的菌株,而链孢霉属(*Neurospora* spp.)、纸葡萄穗霉(*Stachybotrys chartarum*)是在红枣贮藏期间新发现的 2 种真菌。本研究结果为控制红枣采后病害提供了依据。

**关键词:**红枣;贮藏期;病原真菌;ITS 序列分析

**中图分类号:** TS207.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0304-04

枣属于鼠李科枣属植物。枣树品种多、适应性强,其果实具有丰富的营养,受到消费者的青睐,但鲜枣在自然条件下不耐贮藏。目前,由于对贮藏期间枣中病原菌种类及侵染原因缺乏了解,不能采取有效的控制措施,导致病害现象时有发生,因真菌病害侵染而导致的腐烂率达到 30% 以上,引起红枣品质变差,难以食用,造成严重的损失<sup>[1-4]</sup>。因此,研究引起红枣病害的病原菌,从而控制其采后病害,具有重要的意义。近年来,已有研究从贮藏的红枣鲜果中分离并采用形态学的方法鉴定出贮藏过程中引起腐烂病害的一些主要病原真菌<sup>[5-8]</sup>,但采用 ITS 序列分析红枣表面真菌的研究还少见报道。因此,本研究对红枣表面的真菌进行分离,通过 ITS 序列扩增、测序和序列比对,对分离的相关病原菌进行鉴定。为针

对性地采取措施对致腐病原菌进行控制提供依据<sup>[9-10]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 干红枣产自河南省新郑市,放在无菌样品袋中,室温放置 1 个月。*Taq* 酶和 dNTP 购于 TaKaRa 公司。真菌 DNA 提取试剂盒购于 Omega 公司。

1.1.2 培养基 孟加拉红培养基(蛋白胨 5 g/L、葡萄糖 10 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L、孟加拉红 0.033 g/L、氯霉素 0.1 g/L、琼脂 20 g/L),用蒸馏水溶解以上成分,然后及时加入孟加拉红溶液。氯霉素先用少量乙醇溶解后再加入到培养基中,121 ℃灭菌 20 min。

马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA):先称取 200 g 马铃薯,洗净去皮切成小块,加水 1 000 mL 煮沸 30 min,纱布过滤后再加 2% 葡萄糖和 2% 琼脂,121 ℃灭菌 15 min。

1.1.2 实验仪器 PCR 仪产自德国 Eppendorf 公司,电泳仪

植物资源,2014,33(5):61-63,66.

[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):1043-1055.

[9]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.

[10]刘飞,王元忠,邓星燕,等. 红外光谱结合光谱检索对石斛品种的鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2014,34(6):1548-1552.

[11]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.

[12]吴瑾光. 近代傅里叶变换红外光谱技术及应用(上卷)[M]. 北京:科学技术文献出版社,1994:654.

收稿日期:2015-02-14

基金项目:国家质检总局科技项目(编号:2013QK232)。

作者简介:郝莉花(1979—),女,硕士,工程师,从事食品安全检测工作。E-mail:zzulisp@126.com。

检索的方法对滇重楼生长年限进行鉴别是一种基于植物光谱信息的统计分类方法。重楼主根的化学成分及含量受品种、生态环境、栽培技术等因素的影响,本研究结果虽然有很好的效果,但由于试验中全部样品均来自同一产地且样品数量较少,因此所用鉴别方法的有效性还需进一步研究。尽管如此,本研究仍然为重楼药材生长年限的鉴别提供了一种新思路。

## 参考文献:

- [1]李恒. 重楼属植物[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2]国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:243.
- [3]欧立军. 重楼属药用植物研究进展[J]. 安徽农业科学,2009,37(20):9471-9472.
- [4]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.
- [5]赵庭周,王卜琼,马青,等. 滇重楼采收期研究[J]. 中国野生