

李超,姬鹏鹏,黄显章,等.不同产地艾叶红外指纹图谱研究[J].江苏农业科学,2019,47(17):222-224.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.055

不同产地艾叶红外指纹图谱研究

李超,姬鹏鹏,黄显章,张超云,王旭,高丽,刘沁荣,赵振

(南阳理工学院/河南省张仲景方药与免疫调节重点实验室,河南南阳 473000)

摘要:为了建立不同产地艾叶药材的红外指纹图谱,为艾叶产地鉴别提供新的技术和方法,采用傅里叶变换红外光谱技术对国内 6 个主产地的艾叶样品进行分析,通过图谱的表征解析、相似度对比、主成分分析及聚类分析等方法,建立艾叶红外指纹图谱并探讨鉴别不同产地艾叶的方法。结果表明:不同产地艾叶的红外图谱相似度较高,但运用适当的计量学方法可实现艾叶的产地鉴别;红外图谱解析、相关系数分析及聚类分析等方法可对不同产地艾叶样品进行正确的分类,结果相互验证和补充。可见,红外指纹图谱分析技术适用于艾叶的产地鉴别,该结果为艾叶的产地溯源和质量控制提供了一种新的思路。

关键词:艾叶;不同产地;红外指纹图谱;相关系数;聚类分析

中图分类号:R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)17-0222-03

艾叶为菊科多年生草本植物艾(*Artemisia argyi* Levl. et Vant.)的干燥叶^[1],性温,味苦,归肝经、脾经、肾经,具有散寒止痛、温经止血、补气安胎、止咳平喘等功效,是中医妇科常用中药之一^[2]。艾叶于夏季花未开时采摘,除极干旱和高寒地区外,在我国大部分地区均有分布,主要分布于湖北、浙江、安徽、河南、河北等省份,并在局部植物群落中呈现为优势种群。

近年来,艾产业的快速发展带来了艾叶资源需求的激增,但同时也存在诸多安全隐患,艾叶产地难以溯源及艾叶品质参差不齐已成为制约艾产业发展的主要瓶颈。前人虽对不同产地艾叶的品质评价做了大量的研究工作,为艾叶产地间的差异研究提供了有益的本底材料^[3-5],但前人研究方法具有操作复杂、预处理繁琐、试验周期长等缺点。因此,一种操作简单、快捷准确的试验方法亟待开发。

中药材红外光谱具有“指纹性”,借助红外特征吸收的差异可达到区分和鉴别中药材的目的,且该技术具有无损、快捷等显著的优点,已成功应用于多种中药材的产地鉴别^[6-11],但不同产地艾叶药材的红外光谱研究尚未开展。因此,本试验以 6 个不同主产区的艾叶样品为研究对象,建立艾叶红外指纹图谱,挖掘指纹谱图中的潜在差异信息,并结合相似度评价及化学计量学方法,最终对艾叶药材进行质量评价。本研究为艾叶药材的质量控制及产地鉴别提供一种新的技术和方法。

1 材料与方法

1.1 材料收集

2017 年 5—6 月,从河北安国、浙江宁波、湖北蕲春、山东烟台、河南汤阴及河南西峡采集野生状态的艾叶样品,经南阳

收稿日期:2018-06-04

基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2015CB554506);河南省科技开放合作项目(编号:172106000053)。

作者简介:李超(1987—),男,河南南阳人,博士,讲师,主要从事中药资源学方向的研究。E-mail:lichaoctm@126.com。

通信作者:黄显章,博士,副教授,主要从事中药品质评价方向的研究。E-mail:nylgzyx@126.com。

理工学院中药教研室黄显章副教授鉴定为艾的干燥叶。将艾叶样品去杂、清洗、自然干燥、粉碎、过筛,混匀后备用。

1.2 仪器与试剂

傅里叶变换红外光谱仪(自带 DTGS 检测器,TENSOR 27 型,德国 Bruker 公司);分析天平(FA-2204B,上海精密科学仪器有限公司);万能粉碎机(FW-135 型,天津泰斯特仪器有限公司);粉末压片机(FY-15 型,上海天闾机械设备有限公司);红外干燥箱(8401-2A 型,常州诺基仪器有限公司);KBr(光谱纯,南京化学试剂公司)。

1.3 试验环境及方法

1.3.1 试验环境 不同产地艾叶红外图谱的测定在南京农业大学分析测试中心完成,分析过程中温度保持在 22~27℃,空气湿度保持在 30%~40%,每个艾叶粉末压片累积扫描次数 32 次,每次扫描时均扣除 H₂O 和 CO₂ 的干扰。

1.3.2 试验方法 称取艾叶粉末样品 1.0 mg,于玛瑙研钵内与 KBr 研磨充分(比例约为 1:200),并压制成厚度约为 1 mm 的透明锭片,放入傅里叶变换红外光谱仪测定。每个产地均以溴化钾为背景,制备 3 个艾叶粉末样品片,每个样品片随机扫描 3 个不同的位置,获得 3 张红外光谱图,取计算后的平均谱图作为最终的艾叶谱图。

1.3.3 试验数据预处理 将得到的不同产地艾叶原始红外光谱数据进行多点基线校正,除去基线影响;进行自动多点平滑处理,去除噪声;进行标准归一化处理,消除样本间称量的差异;借助 SPSS 20.0 分析软件选取指纹区域 1 300~500⁻¹ cm 进行主成分分析、因子分析及聚类分析等;应用 Origin 和 Omnic 软件拾取特征峰和绘制分析图谱,借助 SPSS 和 SIMCA-P 软件进行计量学分析。

1.4 方法学考察

1.4.1 精密度试验 称取同一艾叶样品,参照“2.3.2”节中试验方法,连续测定 5 次,计算其共有峰波数的相对标准差。

1.4.2 稳定性试验 称取同一艾叶样品,参照“2.3.2”节中试验方法,分别于 0、2、4、8、24 h 测定,计算其共有峰波数的相对标准差。

1.4.3 重复性试验 称取同一艾叶样品,称取 5 份平行样,参照“1.3.2”节中的试验方法,计算共有峰波数的相对标准差。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

稳定性试验表明,共有峰波数的相对标准差在 0.08% ~ 2.95% 之间,24 h 内样品稳定;精密度试验表明,共有峰波数的相对标准差均小于 0.13%;重复性试验表明,共有峰波数

的相对标准差在 0.11% ~ 4.55%,说明该方法可靠、重复性好、稳定性强,符合指纹图谱的要求。

2.2 对照红外指纹图谱

本试验以共有模式建立艾叶对照红外指纹图谱,选择道地产区(蕲艾)并且经传统经验鉴定品质较好的 10 批次蕲艾样品作为对照药材,取其平均光谱为对照谱图。每份蕲艾样品选取不同位置随机扫描 3 次,以吸收强度均值作为红外对照图谱的吸收强度,对照红外图谱见图 1。

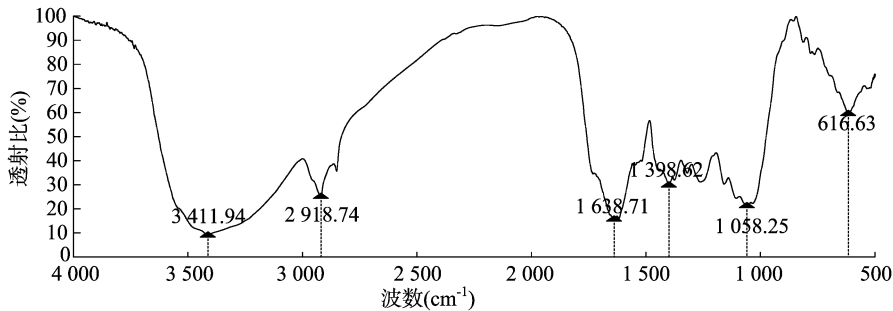


图1 艾叶红外对照图谱及共有特征峰

2.3 对照红外图谱解析及表征

在得到的对照图谱(图 1)中,3 411 cm^{-1} 附近频率低,谱带宽的吸收峰可能为 N—H 及 O—H 的伸缩振动峰;2 918 cm^{-1} 附近的吸收峰可能为 C—H 伸缩振动峰;1 638 cm^{-1} 处附近的吸收峰可能为 C=O 或 C=C 的伸缩振动峰;1 398 cm^{-1} 处的吸收峰可能为 C—O 伸缩振动峰;1 262 cm^{-1} 处的吸收峰可能为取代苯类 C—H 面内弯曲振动峰;1 058 cm^{-1} 处可能为苷类,多糖类等碳水化合物化合物的 C—O 弯曲振动;616 cm^{-1} 处可能为 C—H 的面外弯曲振动峰。

2.4 艾叶红外指纹图谱的相似度分析

本试验采用共有特征峰及全谱相似度分析相结合的方法,这样既能突出共有峰的特点,又能将全谱信息强度和位置差异体现出来,分析方法较为全面和准确,提高了样品间的可比性和比较的精度。

2.4.1 艾叶红外指纹图谱共有特征峰的相似度分析 经过对不同产地艾叶样品进行比较,发现共有特征峰为 616、1 058、1 262、1 398、1 638、2 918、3 411 cm^{-1} ,其编号分别为 1、2、3、4、5、6。从不同产地艾叶样品的共有特征峰与蕲艾对照红外图谱的相似度分析结果(表 1)可以看出,不同产地艾叶样品红外图谱的共有特征峰相关系数可分为 2 类。第 1 类为河南汤阴所产艾叶,该产区艾叶的相关系数在 0.99 以上,与道地产区蕲艾的相似度较高;第 2 类主要包括河北安国、山东烟台、河南汤阴、浙江宁波,以上产区艾叶的相关系数在 0.8 ~ 0.9 之间。

2.4.2 艾叶 FTIR 指纹图谱全波段的相似度分析 从不同产地艾叶样品的全波段图谱与蕲艾对照红外图谱的相似度分析结果(表 1)可以看出,不同产地艾叶样品红外图谱的全波段相关系数可分为 2 类。第 1 类为河南汤阴所产艾叶,该产区艾叶的相关系数在 0.990 以上,与道地产区蕲艾的相似度较高;第 2 类主要包括河北安国、山东烟台、河南西峡、浙江宁波,以上产区艾叶的相关系数在 0.950 ~ 0.990,仍具有较高的相似性。

2.5 艾叶红外指纹图谱主成分分析

选取波段 1 300 ~ 500 cm^{-1} 作为不同产地艾叶的“指纹

表 1 不同产地艾叶红外相关系数

编号	产地	相关系数	
		共有特征峰	红外图谱
1	湖北蕲春	1.000	1.000
2	河北安国	0.866	0.950
3	山东烟台	0.825	0.987
4	河南汤阴	0.994	0.996
5	河南西峡	0.836	0.970
6	浙江宁波	0.827	0.967

区”进行分析,并建立基于主成分分析的模型,表 2 为不同产地艾叶红外图谱的特征向量值及累计贡献率。从表 2 可以看出,所提取的前 5 主成分累计贡献率已经高达 99.99%,可以替代原始的 FTIR 图谱。

表 2 艾叶 FTIR 图谱前 5 主成分的特征值及累计贡献率

主成分	特征值	贡献率(%)	累计贡献率(%)
PC1	1638.60	87.67	87.67
PC2	196.24	10.50	98.17
PC3	30.02	1.61	97.78
PC4	2.79	0.15	99.93
PC5	1.36	0.07	99.99

从图 2 可看出,不同产地艾叶红外光谱在散点图上的位置关系与其光谱的相似度相吻合,如河南汤阴艾叶与湖北蕲春艾叶相似度较高(相关系数在 0.990 以上),则在主成分散点图上均分布于第二象限;河南西峡艾叶和浙江宁波艾叶与道地产区湖北蕲春相似度较低,则在散点图上分布第四象限,与湖北蕲春艾叶距离较远;同理,河北安国所产艾叶和山东烟台所产艾叶与道地产区湖北蕲春相似度居中,则分别分布于第一象限和第三象限。

2.6 不同产地艾叶指纹图谱聚类分析

艾叶红外图谱在距离系数为 5 时,可将不同产地艾叶样品划分为 3 个表征群(图 3),其中山东烟台和河南西峡的艾叶样品、湖北蕲春和河南汤阴的艾叶样品首先聚为一类,这与图 2 的主成分散点图分布象限相吻合;河北安国和浙江宁波

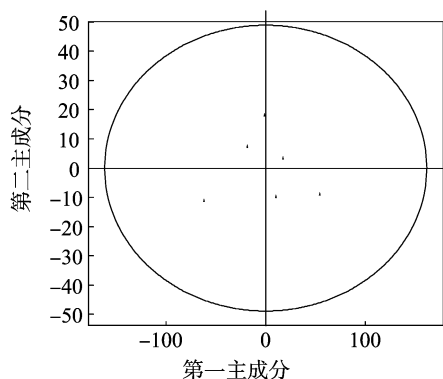


图2 艾叶红外图谱第1、2主成分散点图

的艾叶样品分别处于第二、第三表征群,说明亲缘关系和相似度匹配相对较远,这也与“2.4”节中部分分析结果吻合。

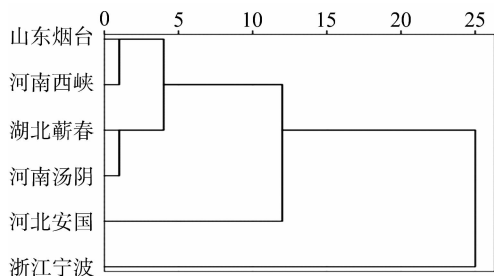


图3 不同产地艾叶图谱的聚类分析

3 讨论和结论

红外光谱技术在中药质量控制和产地鉴别等研究领域应用较为广泛和深入,该技术具有无损、快捷等显著的优点,且操作简单快捷,检测速度快,无需复杂预处理,较为适合实际生产。红外光谱法仅需少量粉末样品,收集 $4\,000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 光谱图后进行数据分析和信息挖掘即可得出鉴定结果,尤其是将红外图谱与相关系数法、偏最小二乘法、主成分分析法等计量学方法相结合,可以挖掘药材原始光谱中潜在的地理信息,在中药材产地鉴别和质量监控等方面起重要作用。

本试验在笔者所在课题组前期研究的基础上构建不同产地艾叶红外指纹图谱,通过适当的计量学方法(相关系数法、主成分分析法、聚类分析法等)挖掘艾叶产地间的差异。在主成分分析中,河南汤阴艾叶与湖北蕲春艾叶相似度较高,在第一、第二散点图上均分布于第二象限;河南西峡艾叶和浙江宁波艾叶与道地产区湖北蕲春相似度较低,在第一、第二散点图上均分布于距离较远的第四象限;河北安国艾叶和山东烟台艾叶与道地产区湖北蕲春相似度居中,则分别分布于第一象限和第三象限;在聚类分析中,山东烟台和河南西峡的艾叶样品、湖北蕲春和河南汤阴的艾叶样品首先聚为一类,河北安国和浙江宁波的艾叶样品分别处于第二、第三表征群,这也与主成分分析的结果相吻合。本研究结果与孔德鑫等研究不同产地紫金牛药材的主成分分析模型结果^[12]和韦记青等研究不同产地战骨的聚类分析结果^[13]相似。笔者推测同种不同产地的中药材受特定生态环境的影响,在长期生态适应过程中,中药材生长所需的温度、光照、土壤、水文等生态因素与其生长发育和品质唇齿相关,并附带了地域信息的指纹特征,中药材品质的优劣取决于活性成分,而活性成分的合成和积累

与其产地环境密切相关,这种关系可以体现在红外光谱的差异上;同时,笔者还发现河南汤阴艾叶与道地产区湖北蕲春艾叶相关系数较高,说明该地区艾叶的品质与道地产区相近;在主成分分析和聚类分析中,又将湖北蕲春和河南汤阴艾叶划分为一类,试验结果与上述分析相吻合,充分说明河南汤阴与湖北蕲春艾叶品质相近,质量较好,故笔者建议在艾叶资源需求量紧缺的情况下可将河南汤阴作为艾叶的另一优质产区。

本研究首次采用 FTIR 技术对 6 个不同产地的艾叶样品进行测定和分析,建立了艾叶产地间红外指纹图谱的共有模式,并进行了共有特征峰的解析表征;从红外图谱和共有特征峰 2 个方面进行相似度分析,试验结果相互补充和印证;建立了艾叶红外指纹图谱的主成分和聚类分析方法,试验结果与相似度分析结果相吻合。本试验结果表明,不同产地艾叶红外图谱整体相似度较高,但也存在一定的差异,运用适当数据分析方法可将不同产地的艾叶正确分类,从而实现艾叶的产地鉴别,为艾叶的产地溯源和质量控制提供新的理论依据和技术支持。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 张元,康利平,郭兰萍,等. 艾叶的本草考证和应用研究进展[J]. 上海针灸杂志,2017,36(3):245-255.
- [3] 黄显章,康利平,高丽,等. 基于古代本草记载的不同产地艾叶中棕矢车菊素和异泽兰黄素的含量研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(18):3504-3508.
- [4] 肖宇硕,卢金清,孟佳敏,等. 气质联用法对蕲艾及不同产地艾叶中挥发油成分分析比较[J]. 中国药师,2018,21(3):404-410.
- [5] 董鹏鹏,梅全喜,戴卫波. 不同产地艾叶总黄酮,重金属和硒元素的含量比较研究[J]. 时珍国医国药,2016(1):74-76.
- [6] Gok S, Severcan M, Goormaghtigh E, et al. Differentiation of anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis[J]. Food Chemistry, 2015, 170:234-240.
- [7] Gori A, Maggio R M, Cerretani L A, et al. Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques[J]. International Dairy Journal, 2012, 23(2):115-120.
- [8] Li C, Yang S C, Guo Q S, et al. Geographical traceability of Marsdenia tenacissima by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics[J]. Spectrochimica Acta (Part A—Molecular and Biomolecular Spectroscopy), 2016, 152:391-396.
- [9] 李超,杨生超,郭巧生,等. 中药通关藤红外指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(17):3311-3315.
- [10] 高姗姗,李建蕊,吴方斌,等. 川木通红外光谱指纹图谱的建立及其与相近中药的鉴别[J]. 中国中药杂志,2016,41(8):1485-1492.
- [11] 刘悦,李静怡,范刚,等. 不同产地中国沙棘的傅里叶变换红外光谱识别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2016,36(4):948-954.
- [12] 孔德鑫,王满莲,邹蓉,等. 基于红外光谱和化学计量学的紫金牛药材质量快速鉴定研究[J]. 基因组学与应用生物学,2013,32(6):771-776.
- [13] 韦记青,孔德鑫,唐辉,等. 基于主成分分析和聚类分析的野生战骨红外指纹图谱比较研究[J]. 广西植物,2011,31(4):559-563.