

# 基于 ATR - FTIR 结合化学计量学 快速鉴别玉竹和黄精的实验研究

彭婧超<sup>1,2</sup>, 熊苏慧<sup>1,2</sup>, 万燕<sup>3</sup>, 黄科盼<sup>3</sup>, 林丽美<sup>1,2</sup>

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙, 410208;

2. 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南长沙, 410208;

3. 湖南食品药品职业学院, 湖南长沙, 410208)

**[摘要]** 目的: 采用衰减全反射傅里叶变换红外光谱法(ATR - FTIR)和化学计量学对同科同属易混淆药材玉竹和黄精进行鉴别。方法: 采用 ATR - FTIR 获取样本的一级和二级红外指纹图谱, 采用 PLS - DA 构建最佳图谱模型, 并采用 PCA、HCA 等化学计量学对模型图谱基本特征进行分析。结果: 玉竹和黄精红外图谱主要由蛋白质、脂类和糖类等吸收带组成, 两者光谱相似, 但在 1200 ~ 700 cm<sup>-1</sup> 处存在较小差异; 在此范围对原图谱进行主成分分析发现, 前 3 个主成分(集中在 970 cm<sup>-1</sup>、990 cm<sup>-1</sup> 和 715 cm<sup>-1</sup> 附近)对玉竹和黄精鉴别的正确率可达 96.56%; 在此范围对原图谱进行聚类分析发现, 玉竹和黄精种内样本均具有一定地域特征性, 但不影响整体鉴别效果。结论: 采用 ATR - FTIR 并结合化学计量学可以快速准确鉴别玉竹和黄精, 可为同属种植物鉴别提供理论依据。

**[关键词]** 衰减全反射傅里叶变换红外光谱法; 化学计量学; 玉竹; 黄精

**[中图分类号]** R284.4 **[文献标识码]** A DOI: 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.10.063

## Rapid identification of *Polygonatum odoratum* and *Polygonatum sibiricum* based on attenuated total reflection - Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics: An experimental study

PENG Jingchao<sup>1,2</sup>, XIONG Suhui<sup>1,2</sup>, WAN Yan<sup>3</sup>, HUANG Kepan<sup>3</sup>, LIN Limei<sup>1,2</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Changsha 410208, Hunan, China;

3. Hunan Food and Drug Vocational College, Changsha 410208, Hunan, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the identification of *Polygonatum odoratum* and *Polygonatum sibiricum* in the same family and the same genus based on attenuated total reflection - Fourier transform infrared spectroscopy (ATR - FTIR) and chemometrics. Methods: ATR - FTIR was used to obtain the first - and second - order infrared fingerprints of samples, A partial least squares - discriminant analysis was used to establish the optimal spectrum model, and chemometrics methods including principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were used to analyze the characteristics of the model. Results: The infrared fingerprints of *Polygonatum odoratum* and *Polygonatum sibiricum* consisted of the absorption bands of proteins, lipids, and saccharides, and *Polygonatum odoratum* and *Polygonatum sibiricum* had similar fingerprints, with a small difference at 1200 - 700 cm<sup>-1</sup>. PCA of the original spectrum within this range showed that the top three principal components (near 970 cm<sup>-1</sup>, 990 cm<sup>-1</sup>, and 715 cm<sup>-1</sup>) had an correct rate of 96.56% in the identification of *Polygonatum odoratum* and *Polygonatum sibiricum*. HCA of the original spectrum within this range showed regional characteristic of the samples of *Polygonatum odoratum* and *Polygonatum sibiricum*, which did not affect overall identification. Conclusion: ATR - FTIR combined with chemometrics can achieve rapid and accurate identification of *Polygonatum odoratum* and *Polygonatum sibiricum* and thus provides a theoretical basis for the identification of plants in the same genus.

**[Key words]** attenuated total reflection - Fourier transform infrared spectroscopy; chemometrics; *Polygonatum odoratum*; *Polygonatum sibiricum*

**基金项目:** 国家发改委标准化项目(编号: ZYBZH - C - HUN - 21); 湖南省重大科技专项(编号: 2015SK1001); 湖南省研究生创新课题(编号: 2017CX26)

**第一作者:** 彭婧超, 女, 2013 级硕士研究生, 研究方向: 中药质量标准化研究

**通讯作者:** 林丽美, 女, 教授, 研究方向: 中药质量标准化研究, E-mail: lizasmile@163.com

中药玉竹和黄精均隶属于被子植物百合科黄精属 *Polygonatum* 植物的根茎,同为补虚类药物,具有润肺作用。但前者味甘,性微寒,归肺、胃经,多用于燥热伤阴、热伤胃阴之证;后者味甘,性平,归肺、肾、脾经,多用于阴虚肺燥、阴血不足和脾胃虚弱之证<sup>[1]</sup>。两者虽在形态、功效、主治上具有一定相似性,但不可混用,否则达不到临床疗效。

基于“方以药成”理念,对玉竹和黄精进行精准鉴别具有重大意义。目前,关于玉竹和黄精鉴别方法主要为组织形态鉴别<sup>[2]</sup>、凝胶电泳法鉴别<sup>[3]</sup>、分子遗传标记法鉴别<sup>[4]</sup>等方式,具有准确度低或操作复杂、成本高昂等不足。衰减全反射傅里叶变换红外光谱法( *attenuated total internal reflectance fourier transform infrared spectroscopy*, *ATR – FTIR* )是基于化合物中官能团和极性键振动的一种分析技术,通过对红外光谱中峰位置、峰形状和峰强度的差异性变化可对样本进行精确判别,具有操作简单、成本低昂、样本无损害和灵敏度高等优势。随着红外分析技术的不断成熟以及化和计量学方法的广泛应用,两者相结合已广泛用于材料学<sup>[5]</sup>、法学<sup>[6]</sup>、食品药品<sup>[7]</sup>等领域。

采用红外光谱技术在中药材系统分类方面多有报道,如研究人员对穿心莲进行红外分析发现,穿心莲内酯和新穿心莲内酯含量是决定其收获期的主要要素<sup>[8]</sup>;竹亚科植物在 1800 ~ 700cm<sup>-1</sup> 处具有明显差异性,可作为其分类依据<sup>[9]</sup>。本研究采用 *ATR – FTIR* 并结合化学计量学对中药玉竹及黄精进行初步研究,旨在为二者及其掺伪品难以鉴别的问题提供参考。

1 仪 器

Niclet – iS5 红外光谱仪( *Thermo SCIENTIFIC* 公司),灵巧型粉碎机 *DJ – 10A* (上海隆拓仪器设备有限公司),101 型电热鼓风干燥箱(北京市永光明医疗仪器厂)。

2 样品处理、检测及数据处理

样品玉竹和黄精购买于药材市场或各药典,由湖南中医药大学药学院龚力民副教授鉴定,所购玉竹为百合科植物玉竹 *Polygonatum odoratum* ( *Mill* ) *Druce* 的干燥根茎,黄精为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* *Coll. et Hemsl.* 的干燥根茎。具体来源见表 1。

样品粉末在 40℃ 下充分烘干,过 200 目筛,得极细粉。样品粉末置于 *ATR* 附件上,调节压力塔,设置相关参数为:分辨率 4cm<sup>-1</sup>,扫描次数 32 次,空白背景光谱扫描 64 次,扣除大气背景干扰。获得的红外光谱采用 *omine 8.0* 进行自动平滑、基线校正和纵坐标归一化处理等操作,选定波长范围为 4000 ~ 600cm<sup>-1</sup>。采用 *SIMCA 14.0* 进行化学计量学分析。

3 方法学考察

取 *QC* 样本进行方法学考察,按 2 项对样本进行实验,取红外图谱中吸收强度最大的 6 个特征峰作为评价峰,以其对应波数计算 *RSD*。

表 1 玉竹和黄精来源

| 物种 | 编号  | 来源   | 编号  | 来源      | 物种 | 编号  | 来源    |
|----|-----|------|-----|---------|----|-----|-------|
| 玉竹 | Y1  | 湖南长沙 | Y17 | 四川绵阳    | 黄精 | H1  | 湖南长沙  |
|    | Y2  | 湖南怀化 | Y18 | 四川成都    |    | H2  | 湖南怀化  |
|    | Y3  | 湖南娄底 | Y19 | 四川峨眉山   |    | H3  | 湖南娄底  |
|    | Y4  | 湖南郴州 | Y20 | 北京市     |    | H4  | 湖南长沙  |
|    | Y5  | 宁夏银川 | Y21 | 广东惠州    |    | H5  | 云南昆明  |
|    | Y6  | 云南   | Y22 | 湖南湘潭    |    | H6  | 湖南郴州  |
|    | Y7  | 天津   | Y23 | 宁夏银川    |    | H7  | 云南玉溪  |
|    | Y8  | 吉林四平 | Y24 | 黑龙江哈尔滨  |    | H8  | 广东广州  |
|    | Y9  | 内蒙包头 | Y25 | 辽宁大连    |    | H9  | 湖南湘潭  |
|    | Y10 | 山东曲阜 | Y26 | 江苏南京    |    | H10 | 云南大理  |
|    | Y11 | 浙江   | Y27 | 陕西汉中    |    | H11 | 四川成都  |
|    | Y12 | 陕西西安 | Y28 | 安徽芜湖    |    | H12 | 四川峨眉山 |
|    | Y13 | 河北唐山 | Y29 | 安徽合肥    |    | H13 | 四川绵阳  |
|    | Y14 | 山西大同 | Y30 | 广东广州    |    |     |       |
|    | Y15 | 吉林长春 | Y31 | 黑龙江齐齐哈尔 |    |     |       |
|    | Y16 | 山东济南 | Y32 | 安徽滁州    |    |     |       |

3.1 精密度 *QC* 样本连续操作 6 次,得红外图谱,计算特征峰波数 *RSD*,结果显示各特征峰波数值 *RSD* 均小于 0.30%,表明傅里叶变换红外光谱仪的仪器精密度良好。

3.2 重复性 *QC* 样本平行操作 6 次,得红外图谱,计算特征峰波数 *RSD*,结果显示各特征峰波数值 *RSD* 均小于 0.23%,表明样品测定方法重复性良好。

3.3 稳定性 *QC* 样本分别在 0、1、2、4、6h 进行测定,得红外图谱,计算特征峰波数 *RSD*,结果显示各特征峰波数值 *RSD* 均小于 0.16%,表明样品稳定性良好。

3.4 中间精密度 *QC* 样本在不同时间由不同操作人员操作,得红外图谱,计算特征峰波数 *RSD*,结果显示各特征峰波数值 *RSD* 均小于 0.13%,表明仪器中间精密度良好。

4 结 果

4.1 玉竹与黄精红外光谱分析 玉竹及黄精红外图谱如图 1 所示,两者大致相似。由图 1 分析可得,3339cm<sup>-1</sup> 附近为 O – H 伸缩振动和 N – H 伸缩振动叠加,主要贡献物为蛋白质和核酸<sup>[10]</sup>;2935cm<sup>-1</sup> 附近为饱和 C – H 伸缩振动,主要贡献物为脂肪酸化合物<sup>[11]</sup>;1729cm<sup>-1</sup> 附近为 C = O 伸缩振动,主要贡献物为脂类物质<sup>[12]</sup>;1375cm<sup>-1</sup> 为 – CH<sub>3</sub> 伸缩振动,主要贡献率为脂肪类化合物<sup>[13]</sup>;1200 ~ 900cm<sup>-1</sup> 范围多为多糖吸收区,900 ~ 700cm<sup>-1</sup> 范围多为糖类异构吸收峰<sup>[9]</sup>。由此可知,玉竹和黄精红外光谱主要以蛋白质、脂类和糖类等吸收带组成。

中药红外光谱因化学成分不同或各成分含量比例不同,三要素(峰位置、峰强度和峰形状)会在红外光谱带中产生差异特征,对于不同种类或不同炮制品等中药,往往通过一级红外图谱中三要素差异即可快速分析;但不同产地或不同时期等中药往往差异只体现在峰强度上,因此需要结合二阶导数图谱进行分析<sup>[14]</sup>。玉竹和黄精一级红外图谱虽然相似,但在 1200 ~ 700cm<sup>-1</sup> 区间却存在细小差异。故对两

者光谱进行二级求导 (Savitsky - Golay 导数)。由二阶导数图谱 (图 2) 可知,玉竹和黄精在  $1200 \sim 700\text{cm}^{-1}$  范围有较大的差异,玉竹在  $999\text{cm}^{-1}$  附近具有两个小肩峰、在  $810\text{cm}^{-1}$  附近具有多个明显的吸收峰;而黄精在  $840\text{cm}^{-1}$ 、 $737\text{cm}^{-1}$  附近具有明显的吸收峰。

当前研究表明,玉竹和黄精均主要含有多糖、低聚糖、氨基酸、生物碱等成分<sup>[15]</sup>。在对两者多糖进行研究发现,玉竹和黄精中的多糖含量所占比值最大,从而使两者具有相似的补益作用,但玉竹多糖和黄精多糖在单糖成分及配比上存在一定差异,这也进一步佐证了两者不能互为替代<sup>[16-17]</sup>。玉竹和黄精红外二阶图谱在  $1200 \sim 700\text{cm}^{-1}$  范围之间的差异主要来源于糖类物质,两者之间的差异性与文献报道符合。

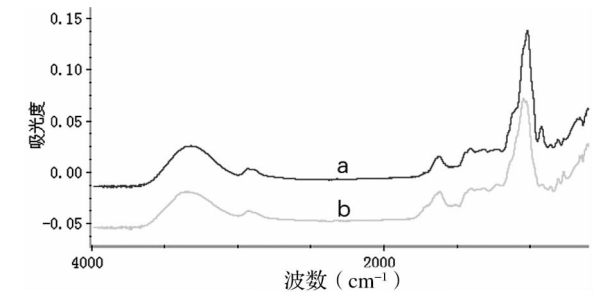


图 1 玉竹 (a) 与黄精 (b) 红外图谱

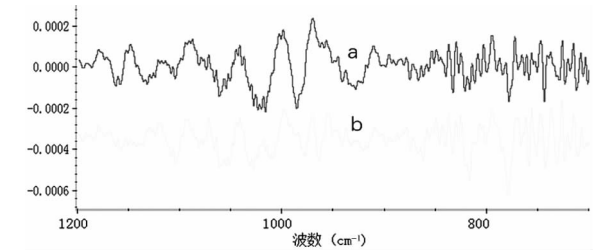


图 2 玉竹 (a) 与黄精 (b) 二阶红外图谱 ( $1200 \sim 700\text{cm}^{-1}$ )

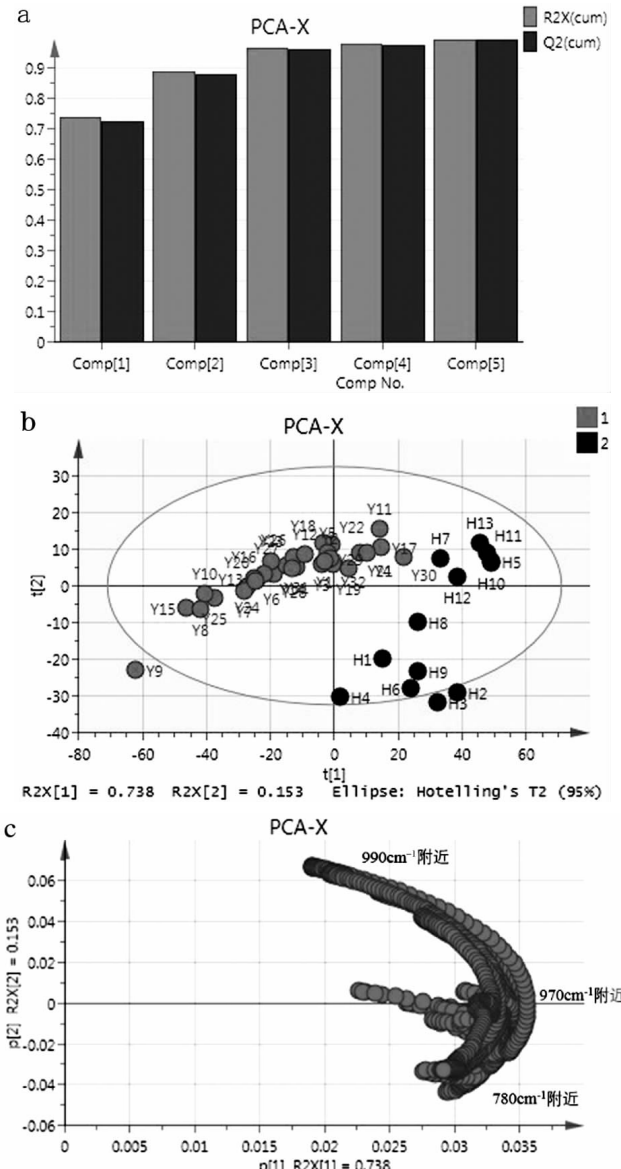
4.2 化学计量学分析 对玉竹样本及黄精样本进行人为分类,构建偏最小二乘法 (partial least squares - discriminant analysis, PLS - DA) 模型。在 PLS - DA 模型中,拟合度 ( $Q^2$ ) 和预测值 ( $R^2$ ) 数值介于  $0 \sim 1$  之间,通常认为两者值均大于  $0.5$  时,模型具有较好的拟合性和可预测性;进一步对模型进行置换实验,当置换参数拟合截距 ( $Q^2$  intercepts) 和预测截距 ( $R^2$  intercepts) 分别小于  $0.4$  和  $0.05$  时,模型方能有效。玉竹样本和黄精样本在  $1200 \sim 700\text{cm}^{-1}$  显示出差异性,通过构建原图谱、一阶图谱和二阶图谱的 PLS - DA 模型,寻找最佳模型,如表 2 所示,原图谱分类效果较好,故采用  $1200 \sim 700\text{cm}^{-1}$  范围内原图谱进行统计分析。

| 表 2 不同数据类型下 PLS - DA 模型参数 |       |       |                  |                  |
|---------------------------|-------|-------|------------------|------------------|
| 类型                        | $R^2$ | $Q^2$ | $R^2$ intercepts | $Q^2$ intercepts |
| 原图谱                       | 0.902 | 0.855 | 0.011            | -0.306           |
| 一阶图谱                      | 0.922 | 0.937 | 0.404            | -0.307           |
| 二阶图谱                      | 0.956 | 0.845 | 0.714            | 0.078            |

4.2.1 主成分分析 主成分分析 (principal components analysis, PCA) 是一种基于投影技术的数据分析方法,其将原始变量按一定的权重线性组合之后而产生新的变量达到降维目的,通过前 2 个或 3 个主成分做出平面或三维图,从而观察到光谱的主要特性和样品分类情况<sup>[18]</sup>。

对  $1200 \sim 700\text{cm}^{-1}$  范围的原图谱进行主成分分析,共有 5 个主成分,其中 PC1 (主要在  $970\text{cm}^{-1}$  附近) 占方差总贡献率的  $73.84\%$ , PC2 (主要在  $990\text{cm}^{-1}$  和  $780\text{cm}^{-1}$  附近) 占方差总贡献率的  $15.23\%$ , PC3 (主要在  $715\text{cm}^{-1}$  和  $1160\text{cm}^{-1}$  附近) 占方差总贡献率的  $7.39\%$ ,前 3 个主成分累积贡献率高达  $96.56\%$  ( $>95\%$ )。

由图 3a 可知,通过前 3 个主成分,玉竹样本和黄精样本能被很好的分为两类,但两样本之间均存在一定离群样本 (Y9、H3、H2),这说明除样本种类外,存在其余因素 (如产地等相关种植因素) 对样本分类具有一定影响,因此有必要对其进一步深入研究。



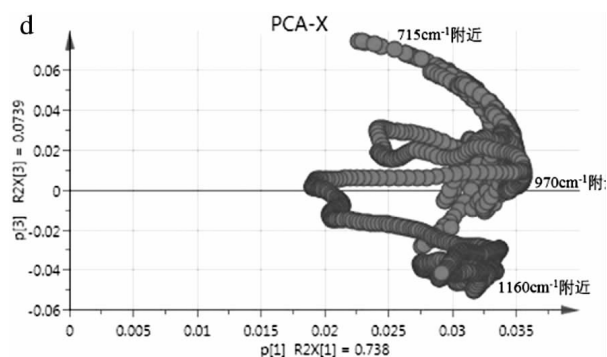


图3 主成分分析拟合图(a)、得分图(b)和荷载图(c、d)

4.2.2 簇类分析 簇类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)作为化学计量学方法下无监督学习方法中的一种,可用于比较相似的组样本,且数据经主成分分析后更为精确。HCA的基础是计算两两之间的距离,首先对多个样本分类,通过两两之间的距离构成矩阵成为一类,距离最近的两类再次合并,如此重复,至只有一类为止<sup>[19]</sup>。

由图4可知,玉竹样本和黄精样本是基于Ward算法的层次聚类,当分类距离为5000时,样本共分为四类,玉竹样本和黄精样本各两类;当分类距离为8000时,样本分为两类,玉竹一部分样本为一类,另一部分和黄精样本共为一类。结合表1及图4发现,组别1样本(玉竹)大多来源于北方各省,组别2样本(玉竹)大多来源与南方各省,组别3样本(黄精)大多来源与四川、云南等地,组别4样本(黄精)大多源于湖南、广东等地。这说明就同属种植物玉竹和黄精样本而言,地域差异微大于物种差异。且同一物种之间,不同区域存在一定差异,这为中药材“道地性”提供了科学依据。

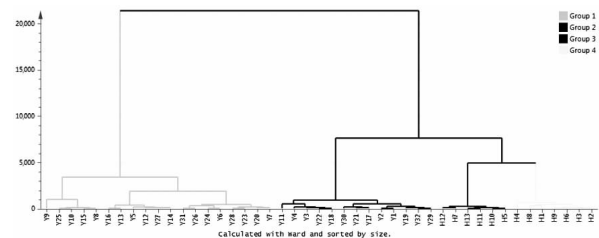


图4 簇类分析图

## 5 小 结

本研究对32批玉竹样本和13批黄精样本进行红外光谱分析发现,玉竹和黄精红外光谱主要由蛋白质、脂类和糖类物质吸收带组成,在1200~700cm<sup>-1</sup>糖类物质吸收范围内存在一定差异,其中差异性主要表现在970cm<sup>-1</sup>、990cm<sup>-1</sup>、715cm<sup>-1</sup>等附近,三者对两批样本分类累积贡献率高达96.56%。同时研究发现了玉竹和黄精均存在一定地域差异性,但并不影响两批样本差异性。采用ATR-FTIR并结合化学计量学具有操作简单、成本低廉、分析快速等优势,能快速准确地鉴别玉竹和黄精。本研究的开展有利于鉴别玉竹、黄精及其掺伪品,并可为今后对黄精属植物分离鉴定工作的开展提供参考。

## 参考文献

- [1] 郭凤翔,田连地. 黄精与玉竹不能混用[J]. 中国误诊学杂志,2001,11(1):1746-1747.
- [2] 胡光星. 玉竹与黄精的辨别使用[J]. 中国医药科学,2011,1(14):105.
- [3] 杨九艳,青梅,吴玉章,等. 蒙药玉竹与黄精的凝胶电泳法鉴别[J]. 中国民族医药杂志,1999,5(S1):102.
- [4] 刘塔斯,李钟,刘春林. 玉竹及其混淆品黄精的RAPD分析[J]. 中国药学杂志,2002,38(10):16-18.
- [5] 林先凯,王宁,叶正茂,等. ATR-FTIR结合化学计量学鉴别猪牛羊草的研究[J]. 中国皮革,2018,47(7):13-17.
- [6] 王磊,王琪,林汉成,等. 温度对死后大鼠肾组织FTIR光谱特征的影响[J]. 法医学杂志,2018,34(3):223-227.
- [7] 汪杰君,陈嘉,叶松,等. 开放光程FTIR光谱的葡萄品质劣变监测方法[J]. 光谱学与光谱分析,2018,38(7):2132-2135.
- [8] Yusof NA, Isha A, Ismail IS, et al. Infrared-metabolomics approach in detecting changes in *Andrographis paniculata* metabolites due to different harvesting ages and times[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2015, 95(12):2533-2543.
- [9] 李伦,刘刚,张川云,等. FTIR结合统计分析对竹类植物的鉴别分类研究[J]. 光谱学与光谱分析,2013,33(12):3221-3225.
- [10] 宫本佼,容蓉,张国英,等. 九州虫草不同部位的红外光谱分析与评价[J]. 光谱学与光谱分析,2011,31(9):2420-2423.
- [11] 武晓丹,金哲雄,孙素琴,等. 七种不同产地仙鹤草原药材及提取物的红外光谱与二维相关红外光谱的分析与鉴定[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(12):3222-3227.
- [12] 黄冬兰,徐永群,陈小康,等. 基于红外三级鉴定与聚类分析法的党参快速鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2017,37(10):3281-3288.
- [13] 汪静静,闫述模,杨滨. 近红外光谱技术对人参药材人参皂苷含量测定及产地识别的研究[J]. 光谱学与光谱分析,2015,35(7):1885-1888.
- [14] 周晶,孙建云,徐胜艳,等. 八角茴香与其伪品莽草的红外光谱三级鉴定研究[J]. 光谱学与光谱分析,2008,28(12):2864-2867.
- [15] 郭怀忠,陈春英,赵焕荣. 毛细管区带电泳法测定黄精和玉竹多糖的含量及其单糖组成[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):54-59.
- [16] 朱巧,邓欣,张树冰,等. 黄精多糖的提取工艺、组分分析与含量测定研究进展[J]. 中南药学,2017,15(11):1586-1590.
- [17] 许丽丽,展晓日,曾昭武,等. 玉竹多糖的研究进展[J]. 中药材,2011,34(1):154-157.
- [18] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析[J]. 中国临床药理学与治疗学,2010,15(5):481-489.
- [19] Kniggeendorf AK, Gaul TW, Meinhardt-tollweber M. Hierarchical Cluster Analysis(HCA) of Microorganisms: An Assessment of Algorithms for Resonance Raman Spectra[J]. Applied Spectroscopy, 2011, 65(2):165-173.

(收稿日期:2019-02-15)