

本文引用: 蒋芙蓉, 江星明, 黄良辉, 夏新斌, 何 雄, 袁志鹰. 基于 ATR-FTIR 研究药食同源植物多花黄精的产地分布[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(5): 864-868.

基于 ATR-FTIR 研究药食同源植物多花黄精的产地分布

蒋芙蓉^{1,2}, 江星明¹, 黄良辉¹, 夏新斌¹, 何 雄^{4*}, 袁志鹰^{1,3*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南科伦制药有限公司, 湖南 岳阳 414100;

3. 中医心肺病证辨证与药膳食疗重点实验室, 湖南 长沙 410208;

4. 湖南省药品审评与不良反应监测中心, 湖南 长沙 410013

[摘要] **目的** 基于傅里叶变换衰减全反射红外光谱(attenuated total reflection-fourier transformed infrared spectroscopy, ATR-FTIR)研究药食同源植物多花黄精的产地分布。**方法** 采用 ATR-FTIR 技术采集不同产地多花黄精粉末样本的红外光谱数据,通过红外谱图的波数分析其对应的官能团,并进行精密度、重复性、稳定性的方法学考察试验。谱图数据经预处理后,建立主成分分析(principal components analysis, PCA)模型和正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)模型,进行多元统计数据分析。**结果** 不同产地多花黄精 ATR-FTIR 图谱的峰形、峰位差异微小。运用 PCA 和 OPLS-DA 可视化处理不同产地多花黄精的数据,发现 7 种不同产地多花黄精代谢轮廓差异明显,可对不同产地的多花黄精进行辅助鉴别。**结论** ATR-FTIR 技术操作简单,环保经济,可为多花黄精质量控制提供技术参考。

[关键词] 多花黄精;傅里叶变换衰减全反射红外光谱;正交偏最小二乘判别分析;产地;质量控制

[中图分类号]R284.1

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.05.015

Geographical distribution of the medicinal and edible plant *Polygonatum cyrtoneura* Hua based on ATR-FTIR

JIANG Furong^{1,2}, JIANG Xingming¹, HUANG Lianghui¹, XIA Xinbin¹, HE Xiong^{4*}, YUAN Zhiying^{1,3*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Kelun Pharmaceutical Co., Ltd, Yueyang, Hunan 414100, China; 3. Key Laboratory of TCM Heart and Lung Pattern Differentiation, Medicated Diet & Dietotherapy, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Hunan Center for Drug Evaluation & ADR Monitoring, Changsha, Hunan 410013, China

[Abstract] **Objective** To study the geographical distribution of the medicinal and edible plant *Polygonatum cyrtoneura* Hua based on attenuated total reflection-fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). **Methods** The infrared spectrum data of *Polygonatum cyrtoneura* Hua powder samples from different places of origin were collected by ATR-FTIR technology. Moreover, the corresponding functional groups were analyzed by the wave number of the infrared spectrum, and the methodological investigation test of the precision, repeatability and stability was carried out. After preprocessing the spectral data, the orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) model and the principal component analysis (PCA) model were established for multivariate statistical data analysis. **Results** The peak shape and position of the ATR-FTIR spectra of *Polygonatum cyrtoneura* Hua from different places of origin were slightly different. The PCA and OPLS-DA were adopted to visualize the data of *Polygonatum cyrtoneura* Hua from different places of origin. It was found that the metabolic profiles of *Polygonatum cyrtoneura* Hua from 7 different places of origin were significantly different, which could assist in the identification of *Polygonatum cyrtoneura* Hua from different places of

[收稿日期]2022-09-29

[基金项目]财政部和农业农村部;国家现代农业产业技术体系资助(CARS-21);湖南省重点研发计划类/高新技术产业科技创新引领计划(2020SK2022, 2022SK2018);建生药创研基金项目(JSYY-20210105-068);湖南中医药大学化学工程与技术一流学科建设项目资助。

[第一作者]蒋芙蓉,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向:药品质量控制与药物分析。

[通信作者]*袁志鹰,男,博士,硕士研究生导师,高级实验师,E-mail:yuanzhiying2018@163.com;何 雄,女,副主任药师,E-mail:24280391@qq.com。

origin. **Conclusion** ATR-FTIR technology is simple to operate, environmental friendly and economic, which can provide technical reference for the quality control of *Polygonatum cyrtonea* Hua.

[**Keywords**] *Polygonatum cyrtonea* Hua; attenuated total reflection-fourier transformed infrared spectroscopy; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; places of origin; quality control

黄精为我国传统药食同源植物,性味甘、平,归脾、肺、肾经,具有补气养阴、健脾、润肺、益肾等功效,《中华人民共和国药典》2020版中收录的黄精为百合科植物滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.)、黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.)或多花黄精(*Polygonatum cyrtonea* Hua)的干燥根茎^[1]。我国黄精资源丰富,其中多花黄精主要分布在湖南、湖北、陕西以及江西等地^[2]。黄精含有多糖、酚类成分、氨基酸和矿质元素,具有抗氧化、降血糖、调节免疫的功效,是多种功能性食品的主要原料^[3-7]。药食同源药材产地讲究道地,不同地区所产多花黄精的有效成分会有一定差异,目前市场中以次充好的现象屡见不鲜。当前,鉴别黄精真伪的主流方法多采用性状、薄层色谱法、显微观察等鉴别方法,但这些方法囿于样本形态、鉴别人员等因素,难以识别产地来源。

随着分子生物学的不断发展,采用分子鉴定技术也可以对药用植物进行鉴别,而且鉴别结果更加准确,但目前此方法鉴别成本较高,其操作也相对复杂^[8]。傅里叶变换衰减全反射红外光谱法(attenuated total reflection-fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR),由于其具有无损、快速、简便、成本低、重现性好等特点^[9],近年来已广泛应用于生药学、食品、生物、环境、塑料、纺织、农业等多领域的分析与检测^[10-12]。在药食同源领域,姚冲等人利用 ATR-FTIR 对不同产地西红花进行判别;李秀丽等基于 ATR-FTIR 和 ¹H NMR 发现高温可改变牡丹籽油脂肪酸、酸值等品质指标^[13-14]。

主成分分析(principal component analysis, PCA)根据主成分的得分,可以描绘 n 个样本在二维或三维图上的分布情况,由此可以直观的对样本进行分类处理。正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial latent squares-discriminant analysis, OPLS-DA)是一种多因变量对多自变量的回归建模方法,可以去除自变量 X 中与分类变量 Y 无关的数据变异,使得模型变得简单和易于解释,该方法在代谢组学、转录组学等领域已广泛使用^[15]。

本文采用 ATR-FTIR 技术结合代谢组学多元统计分析策略开展了 7 个不同产地共 70 批次多花黄精样本中的代谢轮廓差异研究,可对不同产地的

多花黄精进行辅助鉴别。ATR-FTIR 技术操作简单,环保经济,作为食品药品领域分析研究的技术平台,可为药食同源大品种-多花黄精质量控制提供技术参考。

1 仪器与材料

电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司, DHG-9145A);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司, FW100);傅里叶变换红外光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司, Nicolet iS5)。

试验选用 7 个不同产地黄精,经湖南中医药大学药学院周日宝教授鉴定为多花黄精(*Polygonatum cyrtonea* Hua)的干燥根茎。每个产地 10 批次样本,共 70 批次样本作为本试验研究对象,具体信息见表 1。

表 1 70 批多花黄精样本来源信息

| 编号 | 名称 | 产地 |
|---------------|---------------------------------|-------|
| Anhui 01~10 | <i>Polygonatum cyrtonea</i> Hua | 安徽九华山 |
| Gansu 01~10 | <i>Polygonatum cyrtonea</i> Hua | 甘肃岷县 |
| Guangxi 01~10 | <i>Polygonatum cyrtonea</i> Hua | 广西桂林 |
| Guizhou 01~10 | <i>Polygonatum cyrtonea</i> Hua | 贵州贵阳 |
| Huaihua 01~10 | <i>Polygonatum cyrtonea</i> Hua | 湖南怀化 |
| Xinhua 01~10 | <i>Polygonatum cyrtonea</i> Hua | 湖南新化 |
| Xinshao 01~10 | <i>Polygonatum cyrtonea</i> Hua | 湖南新邵 |

2 实验方法

2.1 图谱数据采集

将干燥的多花黄精样品粉碎,过 200 目筛得到极细粉。取样品粉末约 0.05 g 均匀平铺在 ATR 附件上,调节压力塔,使样品粉末与 ATR 附件紧密接触。设置红外采集条件:分辨率 4 cm^{-1} ,光谱扫描波数范围 $600\sim 5500\text{ cm}^{-1}$,空白背景光谱扫描 32 次,自动扣除大气背景 CO_2 、 H_2O 的影响,样本扫描 16 次。所得图谱均经过 OMNIC-9.2 软件中的“自动基线校正”和“透过率%”转换处理。

2.2 方法学考察

按“2.1”方法采集谱图,OMNIC 自动标峰 6 个吸收强度最大的特征峰波数,如样本 Anhui 02(见图 1),特征峰波数分别是 3339.33 、 2939.87 、 1623.71 、 1415.58 、 1032.51 、 932.10 cm^{-1} ,以此 6 个特征峰波数

分别计算 RSD 值,并考察精密度、重复性、稳定性。

2.3 多元统计数据分析

将 ATR-FTIR 导出的数据经预处理后导入 SIMCA-14.1 软件(瑞典 Umetrics 公司),进行 PCA 和 OPLS-DA 多元统计数据分析。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度 取样本 Anhui 01 连续测定 6 次,得红外光谱图,标峰,记录 6 个特征峰波数,计算对应的 RSD 值,结果分别是 0.24%、0.03%、0.03%、0.01%、0.03%、0.04%,表明本实验所用光谱仪的仪器精密度良好。

3.1.2 重复性 取样本 Anhui 01 分为 6 份,平行测定 6 次,得红外光谱图,标峰,记录 6 个特征峰波数,计算对应的 RSD 值,结果分别是 0.24%、0.06%、0.02%、0.02%、0.13%、0.09%,表明本实验测定方法重复性良好。

3.1.3 稳定性 取样本 Anhui 01 分别在 0、1、2、4、6 h 进行测定,得红外光谱图,标峰,记录 6 个特征峰波数,计算对应的 RSD 值,结果分别是 0.14%、0.09%、0.19%、0.02%、0.12%、0.06%,表明该样本在 6 h 内稳定性良好。

3.2 谱图分析

通过查阅文献资料对多花黄精主要特征峰波数进行归属,并推断其可能的贡献物。特征峰波数 3339 cm^{-1} 主要归属为 N-H 伸缩振动、-OH 伸缩振动,可能贡献物为蛋白质、生物碱类^[16-17]; 2939 cm^{-1} 主要归属为饱和 C-H 伸缩振动,可能贡献物为脂肪酸化合物^[18]; 1623 cm^{-1} 主要归属为 C=C 伸缩振动,可能贡献物为烯类化合物^[19]; 1415 cm^{-1} 主要归属为 -OH 弯曲振动,可能贡献物为多糖类化合物^[16-17]; $900\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 主要归属为 C-O、C-OH 伸缩振动,可能贡献物为单糖类、多糖类化合物^[16-17]。

由此推断多花黄精红外光谱图主要由多糖类、蛋白质类、生物碱类、脂类等吸收带组成。将 70 批次多花黄精红外光谱图叠加(见图 1),由图 1 可看出,不同批次样本总体上峰形相似,峰位基本相同,但仍然具有细微差别,为此需要建立 PCA、OPLS-DA 模型来进行多元统计分析。

3.3 多元统计数据分析结果

3.3.1 PCA 将 ATR-FTIR 导出的数据经预处理后导入 SIMCA-14.1 软件,设置 model-type 为 PCA-X, Autofit 进行拟合,点击 scores 得到主成分分析得分图(见图 2A),将数据可视化后能观察到 7 个不同产地多花黄精能够很好的分类。设置 Hotelling's T², 筛选极少数离群样本,通过 SIMCA 软件中离群(Outlier)图(见图 2B)分析可知,样本 Anhui 03、Guangxi 01 为离群样本,去除离群值后,再重新拟合。离群样本出现此现象的原因有很多,药用植物的品质受产地环境、产地初加工、种养条件、药材年龄差异等多种因素的影响^[20]。

将离群样本合理去除后,提取了 3 个主成分,其累计贡献率为 94.27%。其中第一主成分 PC1 贡献率为 76.76%,第二主成分 PC2 贡献率为 11.17%,第三主成分 PC3 贡献率为 6.34%,模型中 R^2X (累计解释参数能力)值为 0.943, Q^2 (预测能力参数)值为 0.938,均高于 0.5,说明该模型稳定性和预测性良好,能较为全面的反映样品间的差异。从图 2 中能清晰看到同一产地更趋向于聚在一起,不同产地会有所区分。其中怀化、新化、新邵这 3 个产地都是在湖南省内,地理位置相对较近。虽然这 3 个产地两两之间也能明显区分,但从图中整体来看,这 3 个产地的多花黄精有一定的靠近的趋势,一定程度上说明产地相近的多花黄精,其成分差异可能更小。

3.3.2 OPLS-DA OPLS-DA 二维得分图在两两分析中具有更好的区分性,因此对样本类型两两一组,

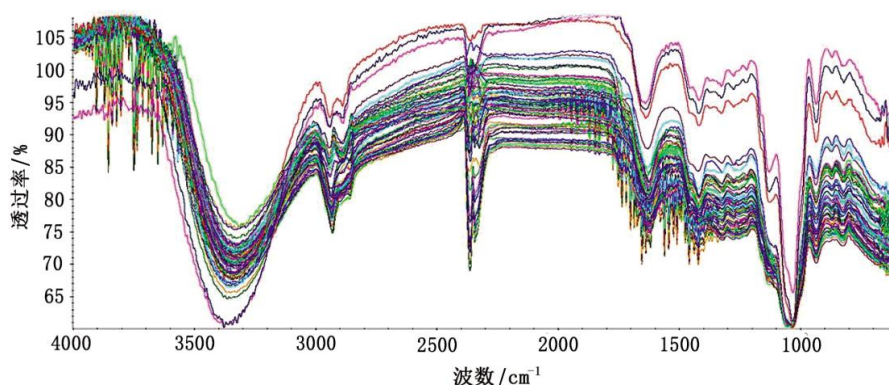


图 1 70 批样品 ATR-FTIR 叠加图

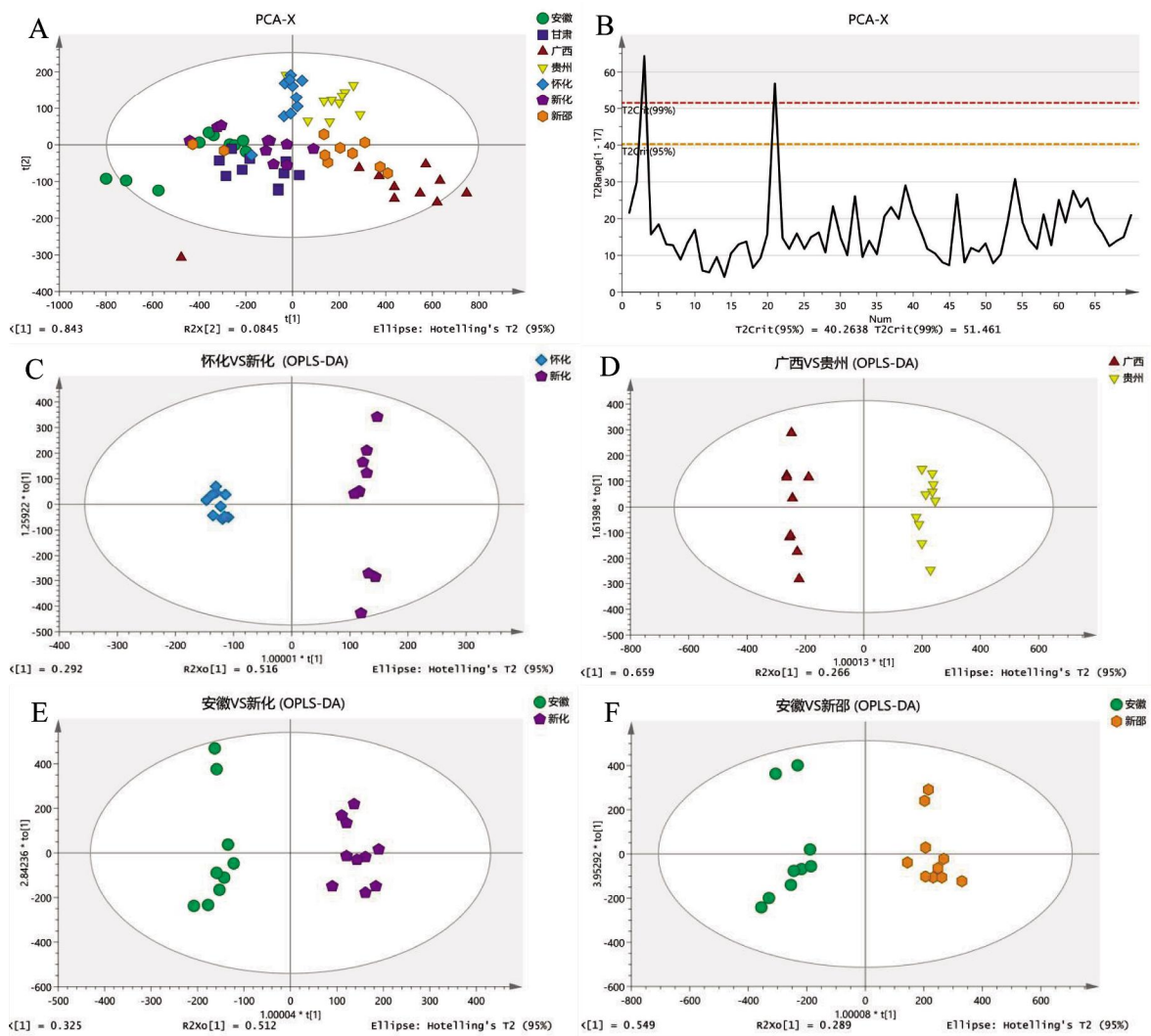


图2 多元统计数据分析

注:A.主成分分析得分图;B. Outlier图;C.怀化、新化多花黄精 OPLS-DA;D.广西、贵州多花黄精 OPLS-DA;E.安徽、新化多花黄精 OPLS-DA;F.安徽、新部多花黄精 OPLS-DA。

设置 model-type 为 OPLS-DA,进行模型拟合(部分样本见图 2C—F)。OPLS-DA 能够进一步对 2 个不同产地样本间进行判别分析,提取出 3 个主成分,模型中质量参数 R^2X_{cum} (反映 X 矩阵的解释率)、 R^2Y_{cum} (反映模型的稳定性)和 Q^2_{cum} (反应模型的预测性)三者值分别为 0.980、0.921 和 0.840,均大于 0.5,表明所建立的模型稳定性和预测性均良好。利用 OPLS-DA 图能够更加直观准确的区分两个不同产地的多花黄精。

最后检验 OPLS-DA 有无过拟合,对 Y 矩阵变量进行随机分组 200 次的置换检验(见图 3)。模型验证结果显示置换参数拟合截距(R^2 intercepts)为 0.265(应小于 0.4),预测截距(Q^2 intercepts)为-0.674(应小于 0),表明所建的模型具有较高的可靠性,不存在过度拟合现象。

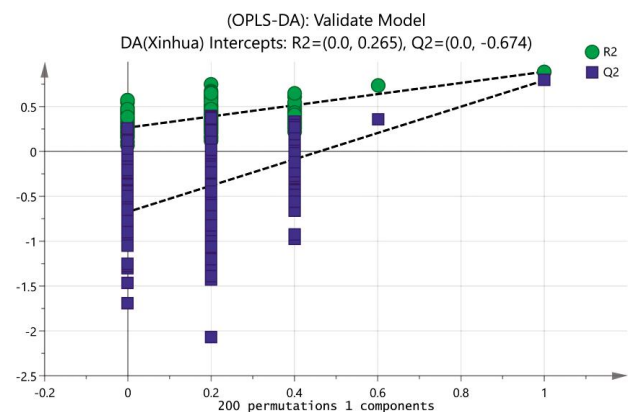


图3 OPLS-DA 置换检验

4 结论

多花黄精作为我国一种传统补益类中药材,且能药食两用,在各大中药材及食品原材料市场十分常见。湖南新化、怀化等湘中地区和安徽九华地区等地生产的黄精品质优良,如新化黄精获得中国地理

标志证明商标,黔阳黄精、安化黄精和九华黄精分别获得国家农产品地理标志。黄精的产地主要依赖外观性状和经验来鉴定,但是打粉后的黄精药材产地难以识别。目前,随着中药代谢组学研究的兴起,基于高通量数据研究可以辅助对中药的道地性进行评价,而国内外中药代谢组学研究主要采用 LC/MS、GC/MS、¹H-NMR、GC/IMS、ATR-FTIR 等技术^[21-22],在这些技术平台中,ATR-FTIR 技术具有仪器价格相对低廉、操作简便、无损检测、原位测试等优点。周晔等^[23]利用傅里叶红外光谱法对部分黄精属生药进行鉴别,研究过程中确定了共有峰和变异峰,通过共有峰率和变异峰率的高低对不同种属黄精的亲缘关系和成分差异做关联性研究,并用来判断药食两用植物的亲缘关系,具有实际应用价值。

本研究在前人研究基础上,运用 ATR-FTIR 技术对 70 批次不同产地多花黄精红外光谱图分析发现,多花黄精光谱可能主要由多糖类、蛋白质类、生物碱类、脂类等物质吸收带等组成。样间图谱大致相同,但仍然存在细微差异,通过 SIMCA 软件的 PCA、OPLS-DA 模型能够对不同产地的多花黄精进行代谢轮廓差异分析,证实了不同产地的多花黄精存在着差异,而产地相近的多花黄精,其差异可能会更小,此种差异可能是由多花黄精中化合物的种类或含量引起的,这也为药食两用中药的“道地性”提供了一定的理论依据。而样本中出现的离群样本,其原因可能是多样的:如个别多花黄精的质量问题或者多花黄精的产地加工等多种因素有关,今后还需要进一步探究。综上,ATR-FTIR 技术以其绿色、便捷、不损耗样本的特点,并结合多元统计数据分析,能够更准确、有效地将数据可视化,对药食两用类药材粉末的鉴别和质量控制具有十分重要的意义。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 319-320.

[2] 李亚霖, 周芳, 曾婷, 等. 药用黄精化学成分与活性研究进展[J]. 中医药导报, 2019, 25(5): 86-89.

[3] 陶爱恩, 杜泽飞, 赵飞亚, 等. 基于多糖组成和含量的 3 种基原黄精质量比较和识别研究[J]. 中草药, 2019, 50(10): 216-222.

[4] 于纯森, 刘宁, 宫铭海, 等. 黄精药理作用研究进展及在保健食品领域的应用开发[J]. 黑龙江科学, 2019, 10(18): 66-68.

[5] 张泽锐, 黄申, 刘京晶, 等. 多花黄精和长梗黄精花主要营养成分[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1329-1333.

[6] 唐兰芳, 王锋, 苏小军, 等. 低共熔溶剂提取对黄精多糖性质及抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(11): 151-157.

[7] 秦臻, 韦正新, 宰青青, 等. 黄精降低活性氧水平促进衰老内皮祖细胞功能的研究[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(1): 123-127.

[8] 王庆. 药用植物黄精鉴别研究进展[J]. 现代园艺, 2020, 43(13): 35-37.

[9] 张红梅, 郭西华. 应用红外光谱法鉴定中药材射干质量[J]. 光谱实验室, 2008, 25(4): 609-610.

[10] 王宝庆, 金哲雄, 布现立, 等. 红外光谱技术在传统中药领域的研究进展[J]. 生命科学仪器, 2010, 8(3): 37-39.

[11] 蔡碧琼, 蔡向阳, 张福娣. 衰减全反射-傅里叶变换红外光谱技术的发展及应用[J]. 武夷科学, 2004, 20(1): 192-194.

[12] YANG L, YANG L, SUN S, et al. Cascading chemical transitions of rhubarb (Rhei Radix et Rhizoma) during the scorching process revealed by heated ATR-FTIR spectroscopy and two-dimensional correlation analysis[J]. Journal of Molecular Structure, 2020, 1216: 128307.

[13] 姚冲, 钱晓东, 李丽琴, 等. ATR-FTIR 结合 RBF 神经网络对市售西红花的产地溯源[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6): 1323-1326.

[14] 李秀丽, 戴小梅, 陈志伟, 等. 基于 ATR-FTIR 和 ¹H NMR 研究高温对牡丹籽油品质特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(10): 63-68, 76.

[15] GORGULU S T, DOGAN M, SEVERCAN F. The characterization and differentiation of higher plants by fourier transform infrared spectroscopy[J]. Applied Spectroscopy, 2007, 61(3): 300-308.

[16] CHENG C, LIU J, CAO W, et al. Classification of two species of Bidens based on discrete stationary wavelet transform extraction of FTIR spectra combined with probability neural network[J]. Vibrational Spectroscopy, 2010, 54(1): 50-55.

[17] BYLESJO M, RANTALAINEN M, CLOAREC O, et al. OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification[J]. Journal of Chemometrics, 2006, 20: 341-351.

[18] 彭婧超, 熊苏慧, 万燕, 等. 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[J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(10): 157-160.

[19] 范佐旺, 柯晓燕, 陈靓雯, 等. 多花黄精的化学成分及药理研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(5): 119-126.

[20] 陈怡, 姚云生, 陈松树, 等. 多花黄精不同龄节药材质量研究[J]. 福建农业学报, 2020, 35(1): 38-43.

[21] YUAN Z Y, Li Z Y, ZHAO H Q, et al. Effects of different drying methods on the chemical constituents of Lilium lancifolium Thunb. based on UHPLC-MS analysis and antidepressant activity of the main chemical component regaloside A[J]. Journal of Separation Science, 2021, 44(5): 992-1004.

[22] YUAN Z Y, LI J, ZHOU X J, et al. HS-GC-IMS-Based metabonomics study of Baihe Jizhuang Tang in a rat model of chronic unpredictable mild stress[J]. Journal of Chromatography B, 2020, 1148(6): 122-143.

[23] 周晔, 李佩孚, 张庆伟, 等. 傅里叶红外光谱法鉴别部分黄精属生药的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2013(7): 1791-1795.