

DOI: 10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2019.080901

传统藏药五脉绿绒蒿不同居群红外光谱分析

李佩佩^{1,2} 栾真杰^{1,2} 李朵^{1,2} 孟晓萍¹ 孙菁^{*1}

(1 中国科学院西北高原生物研究所,青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室,西宁 810008; 2 中国科学院大学,北京 100049)

摘要: 利用正交试验对光谱采集条件进行了优化,优化所得中红外光谱采集条件为:样品 KBr 比例 1:100 (m/m),粒径 75 μm ,扫描次数 32 次,分辨率 4 cm^{-1} ,压力 1.9×10^3 kg。对 17 个不同居群五脉绿绒蒿的中红外及衰减全反射(ATR)数据进行分析,均得到了 7 个共有峰。吸光度聚类分析结果表明,中红外及 ATR 分析数据均可将 17 个居群分为 3 大类群,各居群的聚类情况均符合野外样点实际分布(S4 除外)。除趋势对应分析(DCA)分析结果揭示了五脉绿绒蒿类群与生态环境之间的关系,纬度和海拔是影响五脉绿绒蒿不同类群红外光谱特征的主要环境因素。

关键词: 五脉绿绒蒿; 中红外; ATR; 聚类分析; DCA 分析

中图分类号: O657.33 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2020)05-0550-06

Infrared spectra analysis of different groups about the traditional tibetan medicine-*meconopsis quintuplinervia* regel

LI Peipei^{1,2}, LUAN Zhenjie^{1,2}, LI Duo^{1,2}, MENG Xiaoping¹, SUN Jing^{*1} (1. Qinghai Provincial Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: Orthogonal test was applied to optimize the conditions of spectral collection. The final spectra collection conditions were determined as sample KBr = 1:100(m/m), particle size of 200 meshes, number of scans of 32 times, resolution of 4 cm^{-1} , and pressure of 1.9×10^3 kg. The FTIR and ATR of 17 samples had 7 common peaks respectively. The clustering results of FTIR and ATR indicated that 17 samples were classified into 3 categories. According to the distribution of sample points, almost all samples accorded with the wild distribution, except S4. The results of infrared data combined with ecological environment information for DCA revealed the relationship between categories and ecological environment. The results indicated that latitude and elevation are the main factors influencing the infrared spectral characteristics of *M. quintuplinervia* from different population.

Keywords: *meconopsis quintuplinervia* Regel; FTIR; ATR; clustering analysis; detrended correspondence analysis(DCA)

五脉绿绒蒿(*Meconopsis quintuplinervia* regel)为罂粟科绿绒蒿属多年生草本植物^[1-2],主要化学成分为生物碱^[3]、黄酮^[4]和挥发油^[5]等化合物,具有较高的药用价值,常用在藏药配方中。药材是化学成分非常复杂的混合物体系^[6],传统的分析方法

费时、费力,不能保证样品最原始的信息^[7]。红外光谱是一种简单、快速、直接的分析方法^[8-9]。尤其是衰减全反射(ATR)技术的应用扩大了傅里叶变换红外光谱仪的应用范围,具有较高的信噪比,检测灵敏度高,样品处理简单^[10]。

收稿日期: 2019-08-09

基金项目: 青海省重点实验室发展建设专项(2017-ZJ-Y10)、青藏高原特色生物资源工程技术研究中心能力建设项目(2017-GX-G03)和青海省西宁市科技局重点研发与转化项目(2018-Y-59)资助

作者简介: 李佩佩,女(1992-),博士研究生。研究方向: 中药资源与资源化学; 1272216002@qq.com

* 通信作者: 孙菁,女(1976-),博士。研究方向: 中药资源与资源化学, sunj@nwipb.cas.cn

本文利用红外光谱分析技术,以采自青海省17个居群的五脉绿绒蒿样品为研究对象,进行了中红外光谱及衰减全反射(ATR)光谱采集,分析了不同居群五脉绿绒蒿红外光谱的异同,对不同居群样品的光谱数据进行聚类分析及除趋势对应分析(DCA)分析,阐明了不同居群红外光谱特征与生态环境之间的关系,可为该资源质量评价及药材区划提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

IS 50 傅里叶变换红外光谱分析仪 配备 DTGS 检测器、ATR 检测模块(Thermo Nicolet 公司);KBr(光谱纯, Thermo Nicolet 公司)。

在青海省范围内采集了17个不同居群的五脉绿绒蒿混合植物样品,记录采样点GPS地理信息。将上述样品带回实验室用超纯水清洗干净,阴干,粉碎后过筛,待用。原植物标本由中国科学院西北高原生物研究所孙菁研究员鉴定为五脉绿绒蒿(*Meconopsis quintuplinervia* regel)。

1.2 实验方法

光谱采集条件优化:根据影响中红外光谱采集的实验因素,设计5因素4水平的正交试验,进行全波段光谱扫描($n=3$),光谱扫描范围 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$,以最大吸光度为指标选出实际最优组合。结合极差分析、方差分析以及理论最优组合与实际最优组合的比较,确定优化后中红外光谱采集条件,并开展方法学试验进行验证。并根据优化后光谱采集条件,采集样品的ATR一维红外光谱图($n=3$),光谱采集范围为 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 。

1.3 数据分析

利用OMNIC软件,对采集的光谱以灵敏度80,阈值0.01为标准标峰,分析 $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ 范围的光谱信息。将所得光谱吸光度数据导入PC-ORD软件中进行聚类分析,缺失值利用随机森林方法处理,距离测定用correlation,中红外组间联系方法为Median,ATR组间联系方法为Ward's法;分别将中红外及ATR吸光度信息与采样点经纬度、海拔信息导入PC-ORD软件,对相关数据进行DCA(Detrended Correspondence Analysis)分析。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱采集条件的优化

2.1.1 正交试验 光谱采集条件正交试验结果表明,最优组合为:样品-KBr(1:100, m/m),粒径 $75\text{ }\mu\text{m}$,扫描次数32,分辨率 4 cm^{-1} ,压力 $1.9\times 10^3\text{ kg}$,最大峰吸光度0.949。

2.1.2 极差分析 对正交试验结果进行极差分析,各因素对光谱采集的影响大小排序为:比例>颗粒度大小>分辨率>扫描次数>压力。

2.1.3 理论最优组合与实际最优组合的比较 理论最优组合试验3次重复相关系数RSD为0.51%,实际最优组合试验3次重复相关系数RSD为0.27%,说明实际最优组合的重复性较好。

由R值可知,压力对吸光度的影响最小,样品:KBr比例对谱图的影响是吸光度的14.2倍,表明改变压片压力对光谱采集效果影响不大,但是用 $1.9\times 10^3\text{ kg}$ 压力压片时较用 $1.2\times 10^3\text{ kg}$ 压力压片时时间可节省约2/3,为了获得更好的压片效果,节省压片时间,设定压片压力为 $1.9\times 10^3\text{ kg}$ 。最终确定优化后的中红外一维图谱的采集条件为:样品:KBr比例1:100(m/m) 粒径 $75\text{ }\mu\text{m}$,扫描次数32次,分辨率 4 cm^{-1} ,压力 $1.9\times 10^3\text{ kg}$ 。

2.1.4 方差分析 对正交试验结果进行方差分析。结果表明,根据F值可知,各因素对光谱采集的影响力大小依次为比例>颗粒度大小>分辨率>扫描次数>压力,其中,样品:KBr的比例F值为150.67,对结果的影响到了极显著水平,颗粒度大小、分辨率对结果的影响到了显著水平,而扫描次数、压力对结果的影响不显著,压力因素的F值仅为0.67,表明压力对光谱采集效果产生的影响微小,以上结果与R值分析结果一致。

2.1.5 方法学验证 对优化后的采集条件进行方法学验证。其中,重复性试验RSD为0.69%($n=6$) 精密度试验RSD为0.49%($n=6$) 稳定性试验RSD为0.46%($n=6$),说明本试验具有较好的重复性、精密度及稳定性。

根据上述试验条件,得到中红外光谱采集条件为:样品:KBr比例1:100(m/m) 粒径 $75\text{ }\mu\text{m}$,扫描次数32次,分辨率 4 cm^{-1} ,压力 $1.9\times 10^3\text{ kg}$ 。根据中红外采集条件优化结果,得到ATR光谱的采集条件为:颗粒度 $75\text{ }\mu\text{m}$,扫描次数32次,分辨率 4 cm^{-1} 。

2.2 红外光谱特征分析

对不同居群五脉绿绒蒿的中红外及ATR进行谱图特征分析。由图1可知,五脉绿绒蒿中红外及ATR光谱吸收相似,但是二者在共有峰吸收处存在差异,比如中红外在 1104 cm^{-1} (C=S)及 618 cm^{-1} (C-Cl)处有吸收,而ATR在 1321 cm^{-1} (-NO₂)处有吸收,中红外在 1642 cm^{-1} (-NH₃)系列处的吸光度较ATR中的高。

17 个居群五脉绿绒蒿中红外一维光谱共有 3401 2920 2851 1642 1381 1251 1056 cm^{-1} 7 个共有峰。其中 S11 在 1409 cm^{-1} 处没有吸收峰, 在 826 cm^{-1} 处有吸收; S13 在 1409 cm^{-1} 处没有吸收峰; S10 在 618 cm^{-1} 处没有吸收; S6 在 778 cm^{-1} 处有吸收。根据这些特有吸收峰可以对样品进行初步的产地归属判断。

17 个居群五脉绿绒蒿 ATR 一维图谱大致相

似, 共有峰有 3275 2917 2850 1734 1601 1243 525 cm^{-1} 7 个。其中 S17 居群的吸收明显比其他地区的吸收强, S11 在 1408 cm^{-1} 处无吸收, S17 在 1023 cm^{-1} 处无吸收, 不同居群图谱差异集中体现在 1404 ~ 1319 cm^{-1} 波段。

对中红外及 ATR 共有吸收峰进行波谱解析 (表 1) [11-14], 由解析结果知, 中红外及 ATR 共有峰由醇、酚、酮、酯等化合物振动生成。

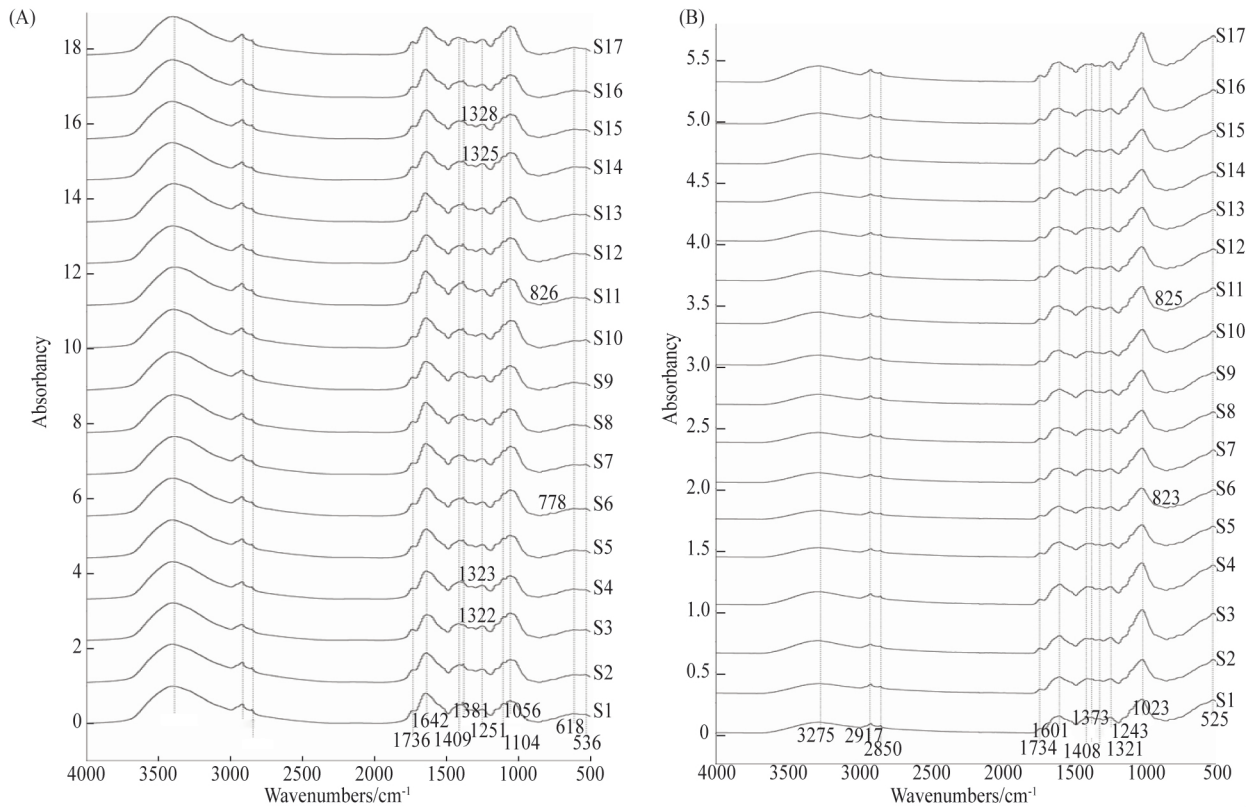


图 1 不同居群五脉绿绒蒿红外指纹图谱

Fig. 1 The fingerprint spectra of different groups of *meconopsis quintuplineria*
(A) FTIR average spectra of 17 samples; (B) ATR average spectra of 17 samples

表 1 中红外及 ATR 共有峰波谱解析

Table 1 Common wavenumbers spectrometric identification of FTIR and ATR

Wave number/ cm^{-1}		Functional Group	Compound
FTIR	ATR		
3401	3257	-OH	Alcohol, phenol, carboxylic acid
2920	2917	C-CH ₃ , -CH ₂ -	Alkanes, alkenes, aromatic, aldehyde
2851	2850	O-CH ₃ , N-CH ₃	Aromatic and aldehyde
	1734	C=O	Lactone, anhydride, ketone
1642	1601	C=C	Aromatic and aldehyde
1381		C=C	Aromatic and aldehyde
1251	1243	-C-O-C	Ether
1056		C-O	Alcohol, carboxylic acid, ester, diethyl ether
	525	C-X	Alkenes and aromatic

2.3 聚类分析

不同居群五脉绿绒蒿中红外及 ATR 共有峰吸光度数据聚类结果如图 2 所示。由图 2 可知, 两种聚类分析结果均可将 17 个居群分为 3 大类群, 每一类群所包括各居群也基本一致。I 类包含 S1,

S2, S5, S6, S9, S4, S8, S13, S12, S15, S16, S10, S7, S11 共 14 个居群, II 类包括 S3, S14 共 2 个居群, III 类包括 S17 共 1 个居群, 大部分居群被聚入第 I 类。根据样点分布图(图 3) 除了 S4 其余居群的聚类情况均符合野外样点的分布。

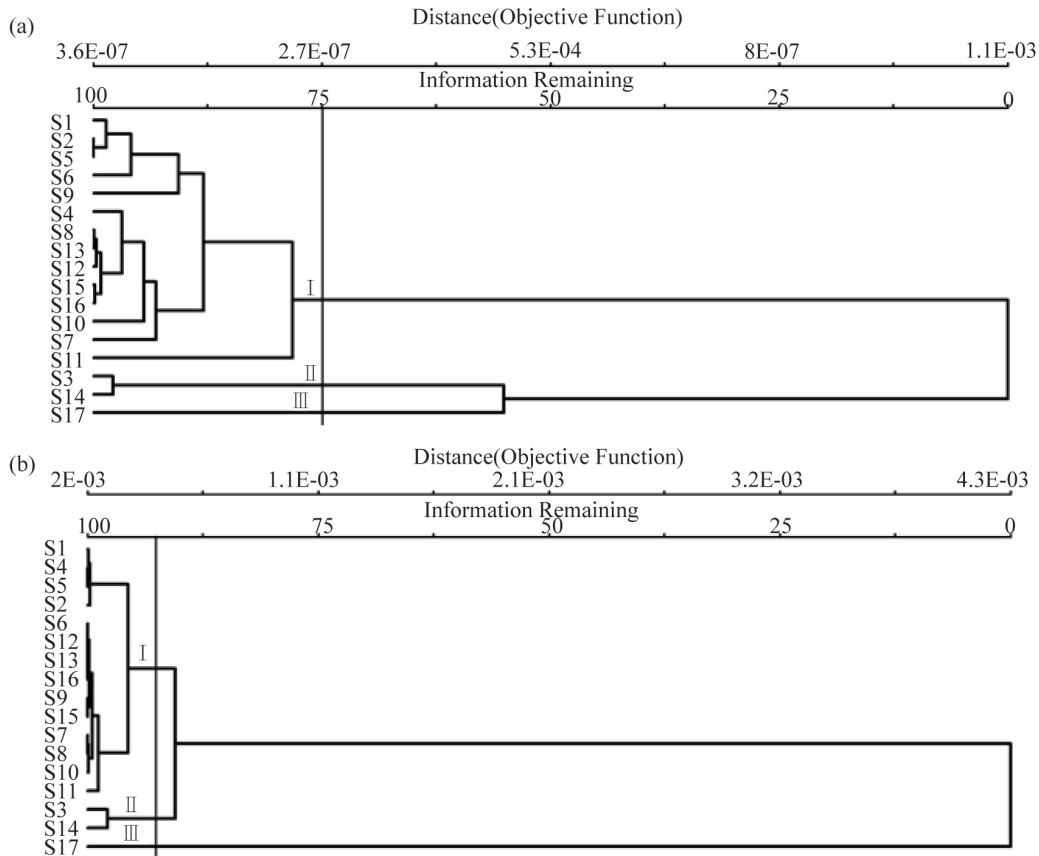


图 2 不同地点五脉绿绒蒿聚类结果

Fig. 2 Clustering results of FTIR and ATR absorbance of common peaks in different regions

(a) Clustering result of FTIR; (b) Clustering result of ATR

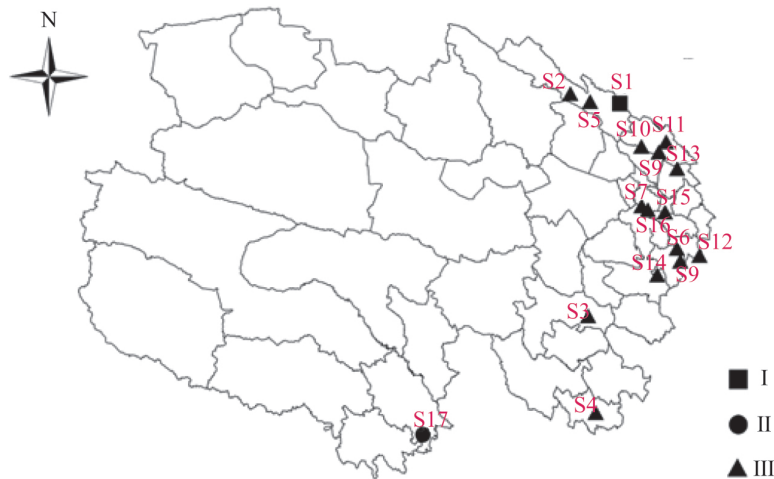


图 3 不同居群五脉绿绒蒿中红外聚类地理区划图

Fig. 3 Geographical division map of FTIR clustering about *M. quintuplinervia* from 17 regions

2.4 DCA 分析

中红外及 ATR 吸光度值 DCA 分析结果如图 4。由结果可知, 纬度和海拔对两种红外类群划

分结果均有较大影响^[15]。舍莉萍^[16]研究发现五脉绿绒蒿中化学成分的含量随纬度的变化较明显, 与本研究中聚类结果及 DCA 结果一致。

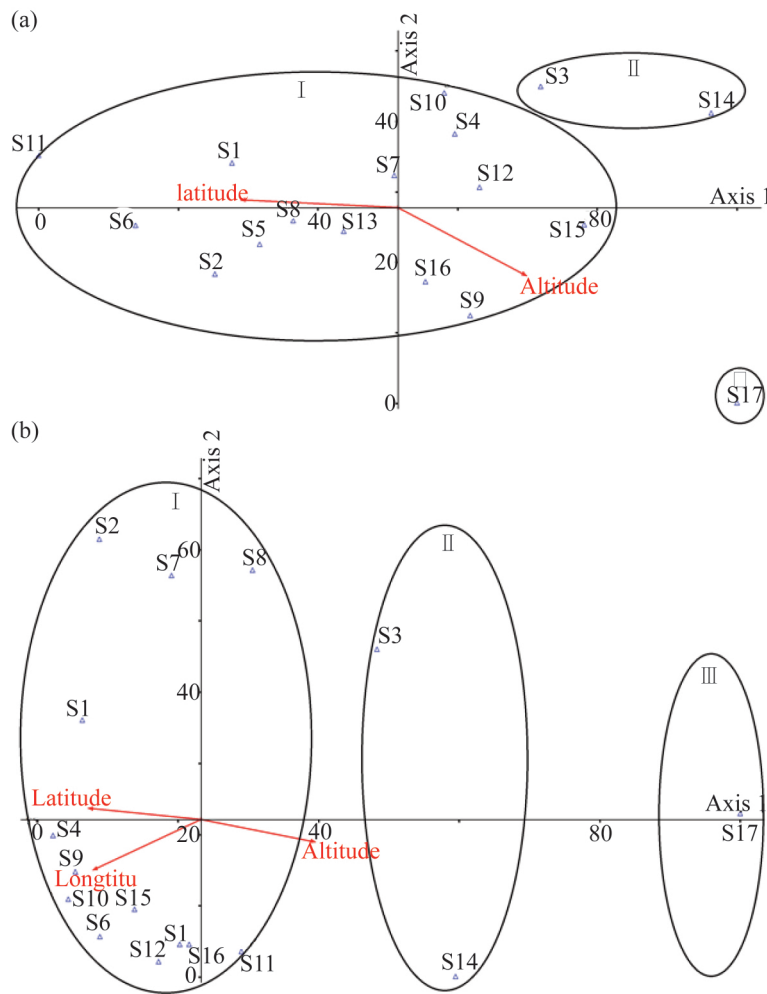


图 4 不同地点五脉绿绒蒿红外数据 DCA 结果

Fig. 4 DCA results about FTIR and environmental factors of *M. quintuplinervia* in different regions

(a) DCA results of FTIR; (b) DCA results of ATR

3 结论

利用正交试验结合极差分析、方差分析, 以吸光度为指标优化红外光谱的采集条件。17 个居群五脉绿绒蒿中红外一维光谱及 ATR 一维谱图分别有 7 个共有峰。分别利用两种共有峰吸光度数据

进行聚类分析, 两种聚类结果大致相同, 17 个居群五脉绿绒蒿均可以分为 3 类, 根据野外样点分布图, 除 S4 外其余居群的聚类情况均符合野外样点的分布。结合 DCA 分析结果, 纬度和海拔对聚类结果影响较大。

参考文献

[1] Dimaer D. Jingzhu Meteria Medica [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2012: 114.
帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2012: 114.

[2] Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Tibetan medicinevolunteers [M]. Xining: Qinghai Ethnic Publishing House, 1991: 465.
中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海民族出版社, 1991: 465.

[3] Sun Z H, Guo M, Shao J, Wang Z W. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(1): 77.
孙政华, 郭 玫, 邵 晶, 王志旺. 中成药, 2016, 38(1): 77.

- [4] She L P, Sun J, Zhou Y B, Sun S N, Zhao Q S, Ye R R, Lu X F, Peng M. *Nat Prod Res Dev*, 2015, 27: 466.
舍莉萍, 孙菁, 周玉碧, 孙胜男, 赵庆帅, 叶润蓉, 卢学峰, 彭敏. *天然产物研究与开发*, 2015, 27: 466.
- [5] Xu D Y, Chen X H, Kang W J, Fan X R, Yuan M, Yang S B. *J Qinghai Med Coll*, 2016, 37: 164.
徐达宇, 陈湘宏, 康文娟, 范雪汝, 袁明, 杨仕兵. *青海医学院学报*, 2016, 37: 164.
- [6] Nikzad-Langerodi R, Ortmann S, Pferschy-Wenzig E M, Bochkov V, Zhao Y M, Miao J H, Saokel J, Laderner A, Heiss E H, Dirsch V M, Bauer R, Atanasov A G. *Talanta*, 2017, 175: 264.
- [7] Chen J B, Sun S Q, Tang X D, Zhang J Z, Zhou Q. *Spectrochim Acta A*, 2016, 165: 176.
- [8] Chen J B, Sun S Q, Zhou Q. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(11): 2893.
- [9] Li J R, Chen J B, Zhou Q, Sun S Q, Lv G H. *Spectrosc Spectral Anal*, 2014, 34(3): 634.
李建蕊, 陈建波, 周群, 孙素琴, 吕光华. *光谱学与光谱分析*, 2014, 34(3): 634.
- [10] Zhang W Q, Zhang N, He H, Ma J Z, Zhong L Q, Sun Y, Zhang M H. *Acta Theriol*, 2019, 39(2): 119.
张玮琪, 张宁, 何欢, 马建章, 钟林强, 孙悦, 张明海. *兽类学报*, 2019, 39(2): 119.
- [11] Liang Y Z, Wu H L, Yu R Q. *Handbook of Analytical Chemistry [M]*. Beijing: Chemical Industry Press, 2016: 705.
梁逸曾, 吴海龙, 俞汝勤. *分析化学手册[M]*. 北京: 化学工业出版社, 2016: 705.
- [12] Murugesu S, Ahmed Q U, Uzir B F, Yusoff N I N, Perumal V, Ibrahim Z, Abas F, Saari K, Khatib A. *Vib Spectrosc*, 2019, 100: 22.
- [13] Zhang J, Wan R Y, Rao S T. *Chin J Anal Lab*, 2015, 35(11): 1353.
张进, 万瑞英, 姚思童. *分析试验室*, 2015, 35(11): 1353.
- [14] Qian Z H, Chen Y M, Hua Z D. *Chin J Anal Lab*, 2019, 38(3): 270.
钱振华, 陈月猛, 花镇东. *分析试验室*, 2019, 38(3): 270.
- [15] Zhou X, Zuo X A, Zhao X Y, Wang S K, Liu C, Zhang J, Lv P, Zhang J P. *Chin J Ecology*, 2015, 34(4): 947.
周欣, 左小安, 赵学勇, 王少坤, 刘川, 张婧, 吕朋, 张建鹏. *生态学杂志*, 2015, 34(4): 947.
- [16] She L P. Study on the chemical quality characteristics of *Meconopsis quintuplinervia* Regel. from Qinghai plateau [D]. Xining: Northwest Institute of Plateau Biology, University of Chinese Academy of Science, 2014.
舍莉萍. 青海高原五脉绿绒蒿化学品质特征分析[D]. 西宁: 中国科学院西北高原生物研究所, 2014.