

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.13.017

基于共有峰率和变异峰率双指标序列法的桔梗样品红外光谱指纹图谱研究*

丁波, 李国强, 许曼, 陈冉

(安徽省妇幼保健院, 安徽 合肥 230001)

摘要:目的 基于共有峰率和变异峰率双指标序列法建立评价不同产地桔梗样品质量的红外光谱指纹图谱。方法 采用溴化钾压片法制备桔梗样品, 采用傅里叶红外光谱法, 结合多维共有峰率和变异峰率双指标序列法, 对7个产地的桔梗样品进行产地区分和质量评价。结果 7个产地桔梗样品的红外光谱图基本相似, 3 280, 2 929, 1 740, 1 635, 1 419, 1 034, 670, 525 cm^{-1} 波数附近有特征吸收峰出现, 1 740, 1 635, 1 419, 1 034 cm^{-1} 波数附近吸收峰的位置、数目和强度有差异; 双指标序列分析结果显示, 样品的共有峰率不低于46.2%, 变异峰率不高于66.7%。结论 产地接近、气候条件与生长环境相似的桔梗间共有峰率较高, 而相差较大的桔梗间变异峰率较高。红外光谱法结合多维共有峰率和变异峰率双指标序列法可准确、直观地鉴别桔梗的真伪、产地和品质。

关键词: 桔梗; 红外光谱法; 指纹图谱; 双指标序列法; 共有峰率; 变异峰率

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)13-0074-05

Establishment of Infrared Fingerprint of Platycodonis Radix Samples Based on Dual - Index Sequence Analytical Method of Common and Variant Peak Ratio

DING Bo, LI Guoqiang, XU Man, CHEN Ran

(Anhui Province Maternity and Child Health Hospital, Hefei, Anhui, China 230001)

Abstract: Objective To establish an infrared (IR) fingerprint of Platycodonis Radix samples from different produce areas based on the dual - index sequence analytical method of common and variant peak ratio to evaluate their quality. **Methods** The potassium bromide pellet was used to prepare the Platycodonis Radix samples. The Fourier transform infrared (FTIR), dual - index sequence analytical method of multi - dimensional common and variant peak ratio were used to identify the produce areas of Platycodonis Radix samples from seven produce areas and evaluate their quality. **Results** The IR spectrograms of Platycodonis Radix samples from seven produce areas were similar. There were characteristic absorption peaks around wavenumbers of 3 280, 2 929, 1 740, 1 635, 1 419, 1 034, 670, 525 cm^{-1} , and the location, number and intensity of absorption peaks were different around wavenumbers of 1 740, 1 635, 1 419 and 1 034 cm^{-1} . The results of dual - index sequence analytical method showed that the common peak ratio of the samples was not less than 46.2%, while the variation peak ratio of the samples was not higher than 66.7%. **Conclusion** The common peak ratio among Platycodonis Radix with near produce areas, similar climate and growth environment was higher, while the variant peak ratio among Platycodonis Radix with great differences in the above factors was higher. The IR spectrometry combined with dual - index sequence analytical method of multi - dimensional common and variant peak ratio can accurately and intuitively identify the authenticity, produce area and quality of Platycodonis Radix.

Key words: Platycodonis Radix; infrared spectrometry; fingerprint; dual - index sequence analytical method; common peak ratio; variant peak ratio

桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根, 性平, 味苦、辛, 归肺经, 有宣肺、利咽、祛痰、排脓之功效, 应用于祛痰止咳^[1]。其主产于华北、东北、华中、华东及西南地区, 资源分布广泛, 地域差异大, 有效成分含量差异大, 且市场上出现了桔梗科沙参或石竹科石竹等多种桔梗伪品^[2]。采用单一方法鉴别存在耗时、耗试药、操作烦琐等问题, 如通常采用的色谱法和光谱法等均需对药材进行预处理。红外光谱法具有高度的专属性和特征性, 为快速鉴别中药材和分析化学结构的有效手段^[3]。多维共有峰率和变异峰率双指标序列法在分析大样本量时, 可通过多维空

间考察不同中药样品间的相互关系, 并用数量精确表示该关系, 克服了一般分析方法需要大量样本的缺点, 可区别2个及以上的样本^[4]。本研究中采用溴化钾压片法制备桔梗样品, 采用红外光谱法建立了不同产地桔梗样品的红外光谱指纹图谱, 并结合多维共有峰率和变异峰率双指标序列法对桔梗样品进行产地区分和质量评价。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Nicolet Avatar FTIR370型傅里叶红外变换色谱仪(美国尼高力公司), 配有氘代三甘氨酸硫酸酯检测器;

*基金项目: 2018年安徽省重点培育智库——安徽省中医药发展研究中心项目[2018zk02]。

第一作者: 丁波, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电话)0551-62160028(电子邮箱)549145682@qq.com。

YB-300A型超细粉碎机(永康速锋工贸有限公司); PL601-S型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司, 精度为千分之一)。

1.2 试药

桔梗皂苷D标准品(上海源叶生物科技有限公司, 批号为P27A11F122502, 纯度不低于98%); 溴化钾(分析纯, 上海迈坤化工有限公司, 批号为20200313)。2年生桔梗, 产地分别为陕西郭兴庄村(A)、安徽亳州(B)、安徽李兴镇尹寨村(C)、湖南(D)、安徽太和县谢千村谢千庄(E)、河南黄土楼村(F)、浙江永兴西街(G), 采集时间2019年10月, 由安徽中医药大学提供, 并经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为正品, 药材标本存放于安徽省妇幼保健院药剂科。

2 方法与结果

2.1 红外光谱分析

2.1.1 红外光谱参数

光谱范围: $4\ 000 \sim 400\ \text{cm}^{-1}$; 分辨率: $4\ \text{cm}^{-1}$; 扫描次数: 32次。扫描时实时扣除 H_2O 和 CO_2 的干扰。

2.1.2 样品制备

分别取各产地桔梗药材, 置 $60\ ^\circ\text{C}$ 温度条件下干燥至恒重, 粉碎, 过9号筛, 桔梗药材粉末与溴化钾以1:100(m/m)比例在红外光灯下混合、研磨, 均匀放入压片模具内压片, 即得桔梗样品。

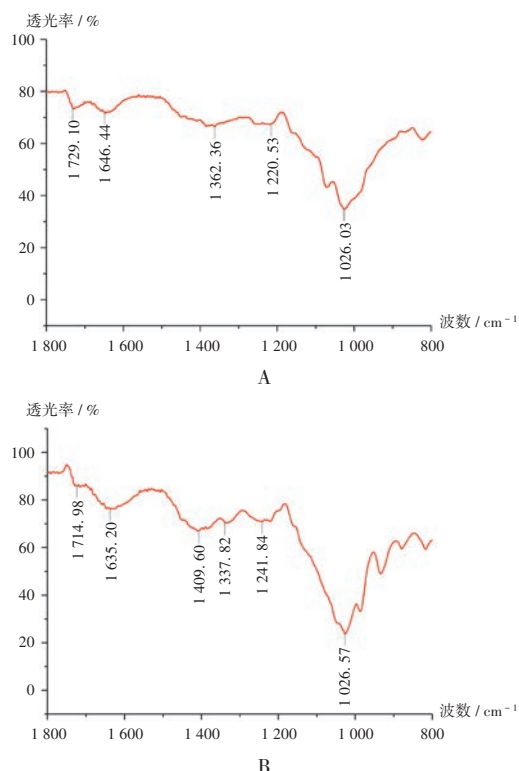
2.1.3 方法学考察

重复性试验: 取桔梗药材(产地为A)粉末6份, 按2.1.2项下方法制备桔梗样品, 按2.1.1项下红外光谱参数进行测定, 记录红外光谱图, 并计算光谱图中共有峰波数的RSD。结果的 $RSD = 0.92\%$ ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取桔梗药材(产地为A)粉末, 按2.1.2项下方法制备桔梗样品, 分别于压片后2, 4, 6, 8, 10, 12 h时按2.1.1项下红外光谱参数进行测定, 记录红外光谱图, 并计算光谱图中共有峰波数的RSD。结果的 $RSD = 0.84\%$ ($n = 6$), 表明样品在12 h内稳定性良好。

2.1.4 红外光谱分析

桔梗样品与桔梗皂苷D标准品: 2020年版《中国药典(一部)》记载桔梗皂苷D为桔梗的主要活性成分。其红外光谱图见图1A, 主要特征吸收峰在 $1\ 729$, $1\ 646$, $1\ 362$, $1\ 220$, $1\ 026\ \text{cm}^{-1}$ 波数处, 其中 $1\ 729 \sim 1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 波数处吸收峰为多种物质的叠加峰, 主要为水中O—H的弯曲振动、共轭羰基C=O的伸缩振动及芳香环骨架的振动^[5-6], $1\ 729\ \text{cm}^{-1}$ 波数附近出现的酯类羰基吸收峰为桔梗三萜皂苷类特征峰^[7]; $1\ 362\ \text{cm}^{-1}$ 波数为C—H的弯曲振动, $1\ 026\ \text{cm}^{-1}$ 波数为C—O的伸缩振动^[8]。桔梗样品基本上保留桔梗皂苷D标准品的特征吸收峰, 光谱图见图1B。



A. 桔梗皂苷D标准品 B. 桔梗样品

图1 桔梗样品与桔梗皂苷D标准品红外光谱图

A. Standard samples of platycodin D B. Platycodonis Radix samples

Fig. 1 IR spectrograms of Platycodonis Radix samples and standard samples of platycodin D

不同产地的桔梗样品: 分别将7个产地的桔梗药材按2.1.2项下方法处理, 按2.1.1项下红外光谱参数进行测定, 不同产地桔梗样品红外光谱叠加指纹图谱见图2。由图3可知, 7个产地桔梗样品的红外光谱图基本相似, 其特征吸收峰在 $3\ 280$, $2\ 929$, $1\ 740$, $1\ 635$, $1\ 419$, $1\ 034$, 670 , $525\ \text{cm}^{-1}$ 波数附近。其中, $3\ 280\ \text{cm}^{-1}$ 波数处为多糖类、苷类、糖醇类等化合物中羟基O—H的伸缩振动^[9]; $2\ 929\ \text{cm}^{-1}$ 波数处为亚甲基C—H反对称的伸缩振动^[10]; $1\ 740\ \text{cm}^{-1}$ 波数附近出现的酯类羰基吸收峰为桔梗三萜皂苷类化合物的特征峰^[11]; $1\ 635\ \text{cm}^{-1}$ 波数附近为多酚、多糖、蛋白质中C=O的伸缩振动; $1\ 419\ \text{cm}^{-1}$ 波数附近可能是C—H的弯曲振动; $1\ 034\ \text{cm}^{-1}$ 波数及其两侧肩峰为多个峰重叠而成的宽强峰, 归属为多糖、苷类化合物中C—O的弯曲振动; $950\ \text{cm}^{-1}$ 波数以下为糖环骨架的振动, $670\ \text{cm}^{-1}$ 和 $525\ \text{cm}^{-1}$ 波数处为芳环(杂环)分子的骨架振动和变角振动, 与桔梗中菊糖有关^[11]。可见, 桔梗中含有多糖及甾体皂苷类等化合物, 且不同产地的桔梗样品之间化学成分具有一定相似性。但不同产地桔梗样品于 $1\ 740$, $1\ 635$, $1\ 419$, $1\ 034\ \text{cm}^{-1}$ 波数附近吸收峰的位置、数目和强度存在一定差异, 如产地B、产地E、产地F的桔梗样品相较于其他产地在 $1\ 740\ \text{cm}^{-1}$ 波数处强度明显, 且产地B和产地E

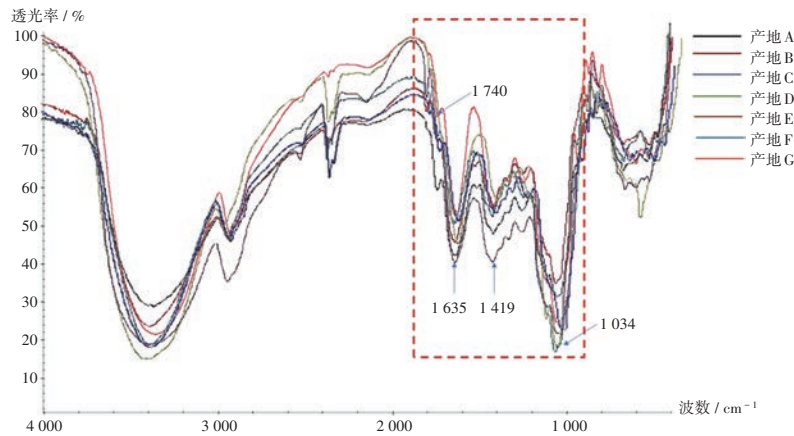
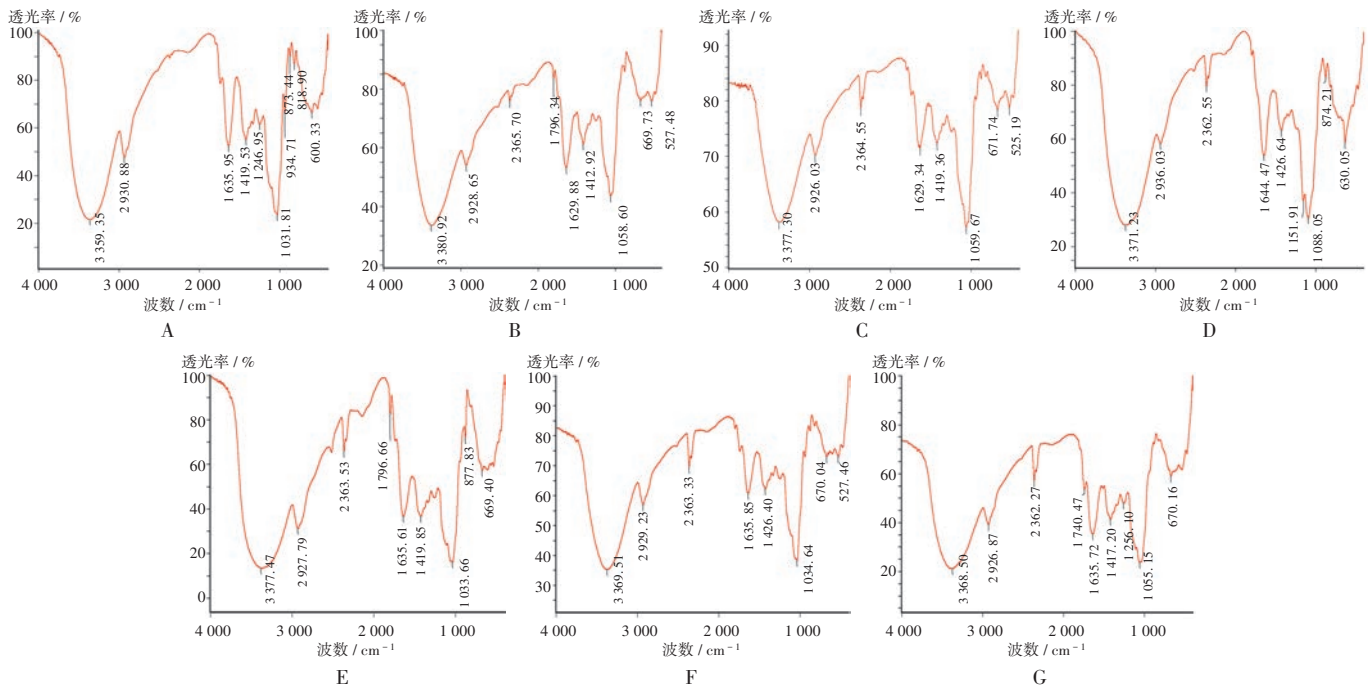


图2 不同产地桔梗样品红外光谱叠加指纹图谱

Tab. 2 IR spectrograms superimposed fingerprints of *Platycodonis Radix* samples from different produce areas



A. 产地A B. 产地B C. 产地C D. 产地D E. 产地E F. 产地F G. 产地G

图3 不同产地桔梗样品红外光谱图

A. Produce area A B. Produce area B C. Produce area C D. Produce area D E. Produce area E F. Produce area F G. Produce area G

Fig. 3 IR spectrograms of *Platycodonis Radix* samples from different produce areas

的桔梗样品峰位置偏移46个波数;产地B、产地C、产地D的桔梗样品在1034 cm⁻¹波数分别偏移了24个、35个、54个波数,表明不同产地桔梗样品的化合物成分和含量存在一定差异。故可根据特征吸收峰初步判断桔梗的整体化学成分和产地。

2.2 共有峰率和变异峰率双指标序列分析

2.2.1 双指标序列分析

双指标序列是指通过计算指纹图谱共有峰率和变异峰率,根据共有峰率的大小排成的一个序列(包含共有峰率和变异峰率)。其中,共有峰率表示样品之间的相似性,变异峰率表示差异性^[12-13]。共有峰率大表明样品差异小,变异峰率大表明样品差异大。

共有峰率计算公式见公式(1)。

$$P(\%) = \frac{N_g}{N_d} \times 100\% \quad (1)$$

式中, P 为共有峰率, N_g 为共有峰数, N_d 为独立峰数。

N_d 计算公式见公式(2)。

$$N_d = N_g + N_a + N_b \quad (2)$$

式中, N_d 为相互比较的2个红外光谱图中的独立峰总数, N_a 为红外光谱指纹图谱a中相对于其共有峰的非共有峰数, N_b 为红外光谱图b中相对于共有峰的非共有峰数。

变异峰率计算公式见公式(3)。

表1 不同产地桔梗样品的共有峰率和变异峰率双指标序列分析结果(%)

Tab. 1 Results of dual-index sequence analytical of common and variant peak ratio of Platycodonis Radix samples from different produce areas (%)

产地	共有峰率和变异峰率双指标序列				
A	DE (63.6;42.9,14.3)	G(58.3;42.9,28.6)	CD(50.0;66.7,33.3)	B(46.2;66.7,50.0)	
B	CD(88.9;12.5,0)	G(80.0;12.5,12.5)	F(70.0;28.6,14.3)	D(54.5;50,33.3)	A(46.2;50,66.7)
C	E(100.0;0,0)	B(88.9;0,12.5)	G(70.0;14.9,28.6)	DF(60.0;33.3,33.3)	A(50.0;33.3,66.7)
D	G(70.0;14.9,28.6)	A(63.6;14.3,42.9)	CEF(60.0;33.3,33.3)	B(54.5;33.3,50.0)	
E	C(100.0;0,0)	B(88.9;0,12.5)	G(70.0;14.3,28.6)	DE(60.0;33.3,33.3)	A(50.0;33.3,66.7)
F	BG(70.0;14.3,28.6)	A(63.6;14.3,42.9)	CDE(60.0;33.3,33.3)		
G	B(80.0;12.5,12.5)	CDEF(70.0;28.6,14.3)	A(58.3;28.6,42.9)		

$$P_{va(b)}(\%) = \frac{N_{a(b)}}{N_g} \times 100\% \quad (3)$$

式中, $P_{va(b)}$ 为变异峰率, $N_{a(b)}$ 为红外光谱图中 a(b) 的总峰数。

2.2.2 共有峰率和变异峰率双指标序列分析

根据公式计算7个产地桔梗样品之间红外光谱图的共有峰率和变异峰率,建立不同产地桔梗的双指标序列。可在 $2+n$ 维(n 为样品数)空间中量化各个样品的异同,具有较强的鉴别力,进行相似性分析。如产地A:DE(63.6%;42.9%,14.3%)表明该序列以产地A为标准计算产地B~G样品红外光谱图的共有峰率和变异峰率,表明产地A与产地DE的共有峰率为63.6%,其中产地A变异峰率为42.9%,产地DE变异峰率为14.3%。7个产地桔梗样品红外光谱图共有峰率和变异峰率双指标序列分析结果见表1。

任一样品与其他样品有相同的共有峰率时,多数情况下变异峰不同,少数相同。如产地A:CD(50.0%;66.7%,33.3%),表明产地C和产地D相对于产地A具有相同的共有峰率50%,但变异峰率不同,分别为66.7%和33.3%,可明显区分产地C和产地D。但产地C:DF(60.0%;33.3%,33.3%)序列中,产地D和产地F相对于产地C具有相同的共有峰率和变异峰率,表明产地D和产地F相对于产地C非常相似。因此,双指标序列分析可从共性和变异性进一步发现不同产地桔梗的相似性和差异性。

2.2.3 基本关系组、对及分析

由表1可知,产地C:E(100%;0,0)序列中,产地C、产地E共有峰率为100%,变异峰率为0,分别对应安徽李兴镇尹寨村和安徽太和县谢千村谢千庄,地理位置接近,气候条件与生长环境相似,药材质量相似度高;产地B与产地C、产地G、产地E的共有峰率均大于80%,表明产地B与产地C、产地G、产地E桔梗样品含有相似的主要特征峰,化学成分很接近,对应产地分别为安徽亳州、安徽李兴镇尹寨村、浙江永兴西街和安徽太和县谢千村谢千庄,产地地理位置相对接近,气候与

自然条件相似;产地A与其他产地的共有峰率为46.2%~63.6%,变异峰率大,整体相似度低,表明陕西与安徽、浙江、湖南桔梗的化学成分差异大,地理经度跨度大,具有明显的地域差异。可见,产地接近、自然生长环境类似的桔梗间共有峰率高,反之则变异峰率高,可反映实际情况,说明该质量控制方法可指导实际生产。

3 讨论

红外光谱可用于定性鉴别和结构分析,且不需要进行样品前处理,具有无损、快捷等优点,可用于不同产地桔梗的鉴别。多维共有峰率和变异峰率双指标序列法可建立不同样品间最直接的相似性联系^[14-15],与单指标分析法相比,双指标指纹图谱分析法具有较高的分辨率。如产地C:G(70.0%;14.9%,28.6%),产地G:CDEF(70.0%;28.6%,14.3%)中,产地C与产地G具有相同的共有峰率,而变异峰率不同,可更好地区分不同产地的桔梗样品。

本研究中构建了7个产地桔梗样品的红外光谱指纹图谱,通过多维共有峰率和变异峰率双指标序列法对不同产地的桔梗样品进行鉴别分析及质量评价。结果不同产地桔梗样品的红外光谱图基本相似,部分特征吸收峰的位置、数目和强度存在一定差异,表明不同产地桔梗整体上具有相似性,但其化合物成分和含量仍存在一定差异。产地接近的共有峰率大,变异峰率小,如安徽李兴镇尹寨村与太和县谢千村谢千庄、湖南、河南黄土楼村的桔梗药材来源接近,其变异峰率相差较小,而陕西与其他产地的共有峰率相差最大。由此推测不同产地桔梗药材的化学成分及其含量受当地温度、光照、土壤、水文等生态环境影响,与司雨柔等^[11]的研究结果一致。

综上所述,红外光谱技术结合多维共有峰率和变异峰率双指标序列法可准确、直观地鉴别不同产地的桔梗,为不同中药产地的鉴定提供试验基础,也为鉴别中药的真伪及品质提供了新思路。

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: 中医药科技出版社, 2020: 289.