

牛膝药材的红外指纹图谱建立及多元统计分析[△]

贾豪^{1,2*}, 雷益铭³, 张维方^{1,2}, 雷敬卫^{1,2#}, 杨春静^{2,4#}, 李莹莹^{1,2}, 谢彩侠^{1,2}(1.河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2.河南省中药质量控制与评价工程技术研究中心, 郑州 450046; 3.河南中医药大学骨伤学院, 郑州 450046; 4.河南中医药大学第三附属医院药学部临床药理学室, 郑州 450046)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)02-0153-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.02.05



摘要 目的 建立不同产地牛膝药材的红外指纹图谱,并进行多元统计分析。方法 采用 Spectrum for Window 3.02 和 OMNIC 9.2 软件建立 61 批牛膝药材样品的红外指纹图谱;以红外指纹图谱共有峰的相对峰高为变量,采用 Excel 2016 软件进行正态分布分析,采用 SPSS 22.0 软件进行聚类分析和主成分分析并计算综合得分,采用 SIMCA 14.1 软件进行正交偏最小二乘法-判别分析,以变量重要性投影(VIP)>1 为标准,筛选影响牛膝药材成分质量的标志性波数。结果 61 批牛膝药材样品红外光谱图的相关系数为 0.967 2~0.997 7;共有 13 个共有峰。正态分布分析结果显示,河南产与河北产牛膝药材共有峰相对峰高的正态分布曲线未有交叉,河南产与内蒙古产牛膝药材的正态分布曲线存在交叉。聚类分析结果显示,当组间距离为 15 时,61 批牛膝药材样品可聚为 3 类,其中 N1~N12 聚为一类,N13~N45 聚为一类,N46~N61 聚为一类。主成分分析结果显示,前 3 个主成分的累计方差贡献率为 91.121%;河南省焦作市驾步村产牛膝药材(编号 N40)的综合评分最高(2.39),河北省安国市新安村产牛膝(编号 N4)的综合评分最低(-2.89)。正交偏最小二乘法-判别分析结果显示,61 批牛膝药材样品可分为 3 类,其中 N1~N12 为一类,N13~N28 为一类,N29~N61 为一类;共筛选出 7 个影响药材样品质量的标志性波数,其 VIP 值从大到小对应的波数依次为 1 059、927、2 933、813、1 732、1 128、3 367 cm⁻¹,其中 1 732 cm⁻¹ 处为皂苷类成分的特征吸收峰,1 059、1 128、927 cm⁻¹ 处为糖苷类成分的特征吸收峰。结论 红外指纹图谱结合正态分布分析、聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析可用于鉴别不同产地牛膝药材。**关键词** 牛膝;红外指纹图谱;正态分布分析;聚类分析;主成分分析;正交偏最小二乘法-判别分析;产地

Establishment of infrared fingerprints and multivariate statistical analysis of *Achyranthes bidentata*

JIA Hao^{1,2}, LEI Yiming³, ZHANG Weifang^{1,2}, LEI Jingwei^{1,2}, YANG Chunjing^{2,4}, LI Yingying^{1,2}, XIE Caixia^{1,2}
(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Provincial Engineering Technology Research Center for TCM Quality Control and Evaluation, Zhengzhou 450046, China; 3. College of Orthopedics and Traumatology, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 4. Section of Clinical Pharmacy, Pharmacy Department, the Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish the infrared fingerprints of *Achyranthes bidentata* from different producing areas, and to conduct multivariate statistical analysis. **METHODS** The infrared fingerprints of 61 batches of *A. bidentata* samples were established by Spectrum for Window 3.02 and OMNIC 9.2 software. Taking the relative peak height of common peaks of infrared fingerprint as the variable, the normal distribution analysis was carried out by Excel 2016 software; SPSS 22.0 software was used for cluster analysis and principal component analysis, and the comprehensive score was calculated; the orthogonal partial least squares-discriminant analysis was carried out by SIMCA 14.1 software, and the marker wave numbers affecting the quality of *A. bidentata* were screened by taking the variable importance in projection (VIP) >1 as the standard. **RESULTS** The correlation coefficients of infrared spectra of 61 batches of *A. bidentata* samples were 0.967 2~0.997 7; there were 13 common peaks. The results of normal distribution analysis showed that the normal distribution curve of relative peak height of common peaks for *A. bidentata* from Henan and Hebei did not cross, and the normal distribution curve of *A. bidentata* from Henan and Inner Mongolia crossed. The results of cluster analysis showed that when the distance between groups was 15, 61 batches of *A. bidentata* samples could be clustered into 3 categories, including N1-N12 were clustered into one category, N13-N45 were clustered into one category, and N46-N61 were clustered into one category. The results of principal component analysis showed that the cumulative variance contribution rate of the first three principal components was 91.121%; comprehensive score of *A. bidentata* (number N40) in Jiabu village, Jiaozuo City, Henan Province was the highest (2.39), and that of *A. bidentata* (number N4) in Xin'an village, Anguo City, Hebei Province was the lowest (-2.89). The results of orthogonal partial least squares-discriminant analysis showed that 61

[△] 基金项目:国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(No.2018YFC1707000);河南省中医药科学研究专项课题(No.2022ZY-1156)

* 硕士研究生。研究方向:中药质量分析。E-mail:1031051495@qq.com

#a 通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药质量分析。E-mail:925390812@qq.com

#b 通信作者:主任药师。研究方向:临床药学。E-mail:ycj5961@163.com

batches of *A. bidentata* samples were divided into three categories, including N1-N12 were clustered into one category, N13-N28 were clustered into one category and N29-N61 were clustered into one category. Seven marker wave numbers affecting the quality were selected. The corresponding wave numbers of VIP from large to small were 1 059, 927, 2 933, 813, 1 732, 1 128 and 3 367 cm^{-1} , 1 732 cm^{-1} was the characteristic absorption peak of saponins, 1 059, 1 128, 927 cm^{-1} were the characteristic absorption peaks of glycosides. **CONCLUSIONS** Infrared fingerprint combined with normal distribution analysis, cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis can be used to identify *A. bidentata* from different producing areas.

KEYWORDS *Achyranthes bidentata*; infrared fingerprint; normal distribution analysis; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; producing areas

牛膝始载于《神农本草经》，为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根^[1]，具有补肝肾、强筋骨、活血化瘀的功效，常用于临床治疗高血压、冠心病、心绞痛、哮喘等^[2]。牛膝主要含有皂苷类、甾酮类、多糖类等化合物^[3]，具有抗生育、抗肿瘤、抗衰老、抗炎及抗骨质疏松等药理作用^[4-5]。因牛膝产于古怀庆府（今河南焦作一带），为河南四大怀药之一，故又称为怀牛膝^[6]。目前，我国已形成三大牛膝产区，即内蒙古赤峰、河北安国和河南焦作^[7]。

关于牛膝的研究主要集中在 β -蜕皮甾酮、人参皂苷 Ro 等成分的含量测定，高效液相色谱（HPLC）指纹图谱的建立以及炮制工艺的优化等方面^[8-12]。2020年版《中国药典》（一部）规定采用薄层色谱法对牛膝中 β -蜕皮甾酮和人参皂苷 Ro 进行鉴别，采用 HPLC 法对牛膝中 β -蜕皮甾酮进行含量测定^[13]。但由于牛膝药材的化学成分复杂，仅对单一成分进行定量分析，具有一定的局限性；加之 HPLC 法多成分检测的成本较高，方法建立及测试费时、操作繁琐，所需流动相（甲醇、乙腈等）具有一定的毒性，应用受限^[14]。红外光谱法具有灵敏度高、特征性强、检测快速、无损等特点^[15]，同时该法具有一定的整体性、客观性和科学性，既能反映药材内部所有复杂成分峰的叠加，又能反映药材所含不同成分及其比例，故可全面体现药材的质量^[16]。随着红外光谱技术的发展，其分辨率及图谱识别能力均有了新的突破，已成为中药快速鉴别及质量评价的一种有效手段^[17-19]。美日韩等国药典均已将红外光谱技术作为药物鉴定的重要方法^[20]。化学模式识别分析可以数字化地表达光谱信息，其结合红外光谱能更加客观地评价中药材的质量^[21]。基于此，本研究建立了上述三大产地牛膝药材的红外指纹图谱，同时结合化学模式识别进行分析，旨在为快速鉴别牛膝提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有 Spectrum 100 型傅里叶变换红外分光光度计、Spectrum for Window 3.02 软件（美国 Pekin Elmer 公司），FW-4A 型粉末压片机（天津市拓普仪器有限公司），FW-100 型高速万能粉碎机、101-3AB 型点热恒温鼓风干燥箱（北京中兴伟业仪器有限公司），

ME204E/OL 型万分之一天平[梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

25S-牛膝甾酮对照品（批号 3737，纯度 $\geq 98.0\%$ ）、25R-牛膝甾酮对照品（批号 3736，纯度 $\geq 98.0\%$ ）、竹节参皂苷 IVa 对照品（批号 2665，纯度 $\geq 98.0\%$ ）、 β -蜕皮甾酮对照品（批号 1889，纯度 $\geq 98.0\%$ ）均购自上海诗丹德标准技术有限公司；溴化钾（光谱纯，批号 C12045707）购自天津市科密欧化学试剂有限公司；无水乙醇（分析纯，批号 20210720）购自天津市致远化学试剂有限公司；水为纯净水。

牛膝药材共 61 批（编号 N1~N61），其中 N1~N12 购自河北省安国市药材市场，N13~N28 购自内蒙古自治区赤峰市药材市场，N29~N61 采自河南省焦作市牛膝产地。所有药材经河南中医药大学药学院陈随清教授鉴定，均为苋科植物牛膝 *A. bidentata* Bl. 的干燥根。取牛膝药材，除去须根、泥沙，捆成小把，晒至干皱，将顶端切齐，晒干后，用水润透，除去残留芦头，于 55 $^{\circ}\text{C}$ 烘干，粉碎，过 200 目筛，用自封袋密封，保存至干燥器，备用。61 批牛膝药材样品的来源信息见表 1。

表 1 61 批牛膝药材样品的来源信息

编号	产地	收集时间
N1~N12	河北省安国市新安村	2020 年 12 月
N13~N18	内蒙古自治区赤峰市牛营子镇	2019 年 12 月
N19~N28	内蒙古自治区赤峰市牛营子镇	2020 年 12 月
N29~N35	河南省焦作市大封村	2017 年 12 月
N36~N45	河南省焦作市驾步村	2017 年 12 月
N46~N61	河南省焦作市温县	2019 年 12 月

2 方法与结果

2.1 红外光谱的建立

2.1.1 样品片的制备 取牛膝药材样品粉末 2 mg，加入干燥溴化钾 200 mg，研磨，混匀；取混合均匀的样品适量，置于专用压片模具中，以 8 MPa 压制 30 s，得均匀半透明的薄片，即供试样品片。同法制备溴化钾空白片和各对照品样品片。

2.1.2 测定条件 光谱扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} ，扫描前扣除 CO_2 和 H_2O 的干扰，扫描次数为 16 次/s，扫描速度为 0.2 cm/s ，光谱分辨率为 4 cm^{-1} ，实验室温度为 20~25 $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度为 25%~35%。

2.1.3 精密度试验 取牛膝药材样品(编号N1)粉末,按“2.1.1”项下方法制备供试样品片,按“2.1.2”项下条件连续测定6次,将所得红外光谱图导入OMNIC 9.2软件。结果显示,红外光谱图的相关系数为0.997 2~0.997 4($n=6$),表明方法精密度良好。

2.1.4 重复性试验 取牛膝药材样品(编号N1)粉末,共6份,按“2.1.1”项下方法制备供试样品片,按“2.1.2”项下条件测定,将所得红外光谱图导入OMNIC 9.2软件。结果显示,红外光谱图的相关系数为0.995 5~0.998 1($n=6$),表明方法重复性良好。

2.1.5 稳定性试验 取牛膝药材样品(编号N1)粉末,按“2.1.1”项下方法制备供试样品片,分别于室温下放置0、30、60、90、120、150 min时按“2.1.2”项下条件测定,将所得红外光谱图导入OMNIC 9.2软件。结果显示,红外光谱图的相关系数为0.991 3~0.997 4($n=6$),表明样品在室温下放置150 min内稳定性良好。

2.1.6 红外光谱数据分析 取61批牛膝药材样品粉末,按“2.1.1”项下方法制备供试样品片,按“2.1.2”项下条件测定,采用Spectrum for Window 3.02软件采集上述药材样品的红外光谱图,得到61批牛膝药材的红外指纹图谱,采用OMNIC 9.2软件计算红外光谱图的相关系数。结果显示,61批牛膝药材样品红外光谱图的相关系数为0.967 2~0.997 7;所得红外光谱图的峰形、峰位、峰高基本相似,表明不同产地牛膝药材中含有相似的化学成分,所含特征峰及其形状基本一致,但指纹区($400\sim 1\,350\text{ cm}^{-1}$)存在一定差异。结果见图1。

采用OMNIC 9.2软件将61批牛膝药材样品的红外光谱图进行平均处理后将透过率转化为吸光度,得到不同产地牛膝药材的平均红外光谱图,详见图2。由图2可知,61批牛膝药材样品共有13个共有峰。在 $3\,367\text{ cm}^{-1}$ 附近强而宽的吸收峰为多糖类、皂苷类、甾酮类化合物中的O—H伸缩振动峰。 $2\,933\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰

为 $-\text{CH}_2$ 不对称伸缩振动峰,结合 $1\,420$ 、 $1\,332\text{ cm}^{-1}$ 附近的C—H弯曲振动峰,表明牛膝药材所含成分具有较多的饱和烷基。 $1\,732\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是羧酸类及酯类等化合物中的C=O伸缩振动峰; $1\,638\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为水分子O—H弯曲振动峰、酰胺基N—H弯曲振动峰、共轭羰基C=O伸缩振动峰; $1\,259\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰可能是C—H弯曲振动和C—O伸缩振动的叠加峰,主要包括多糖类、糖苷类、脂类成分中的C—O和C—O—C不对称伸缩振动峰; $1\,128$ 、 $1\,059$ 、 $1\,027$ 、 927 cm^{-1} 附近的吸收峰为糖类、糖苷类等成分中的C—O伸缩振动峰。有研究表明,牛膝中主要含有皂苷类、甾酮类、多糖类等成分^[7]。现分离得到的三萜皂苷类成分主要为以齐墩果酸为苷元的皂苷类成分(如竹节参皂苷IVa、牛膝皂苷I、牛膝皂苷II等)和甾酮类成分(如 β -蜕皮甾酮、25S-牛膝甾酮、25R-牛膝甾酮等)^[8]。

采用OMNIC 9.2软件将牛膝药材样品和各对照品样品片的红外光谱图进行平均处理后,得到牛膝药材与各对照品的平均红外光谱图,详见图3。由图3可知,在 $1\,732\text{ cm}^{-1}$ 处为皂苷类成分的特征吸收峰, $1\,638\text{ cm}^{-1}$ 处为甾酮类成分的特征吸收峰。

2.2 正态分布分析

采用Spectrum for Window 3.02软件,以 $1\,027\text{ cm}^{-1}$ 附近最强吸收峰的吸光度(采用Spectrum for window 3.02软件将透过率转化为吸光度)为参照,对共有峰峰高进行归一化处理,得到13个共有峰的相对峰高,详见图4(因 $3\,367$ 、 $2\,933\text{ cm}^{-1}$ 处主要为O—H与 $-\text{CH}_2$ 的吸收峰且为强吸收峰, $1\,700\sim 1\,900\text{ cm}^{-1}$ 波段主要为酯类成分、 $1\,500\sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$ 波段主要为酸类成分、 $950\sim 1\,200\text{ cm}^{-1}$ 波段主要为糖类成分,其余5个波数为牛膝药材红外光谱中的强吸收峰且在上述3个波段内,故选择图中的7个共有峰进行分析)。由图4可知, $2\,933$ 、 $1\,732$ 、 $1\,638\text{ cm}^{-1}$ 这3个波数能将3个不同产地牛膝药材样品

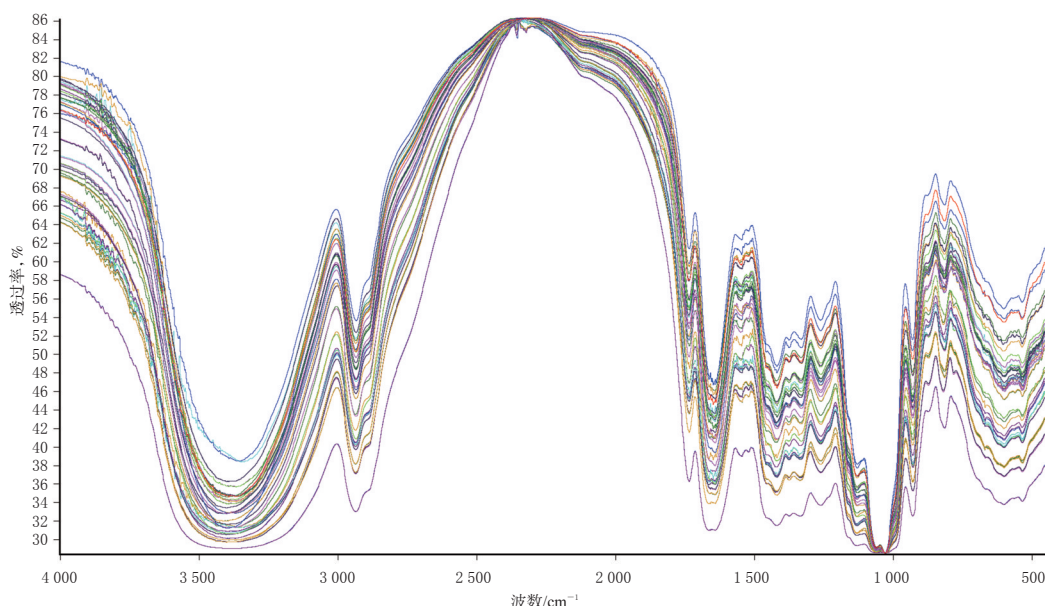


图1 61批牛膝药材样品的红外指纹图谱

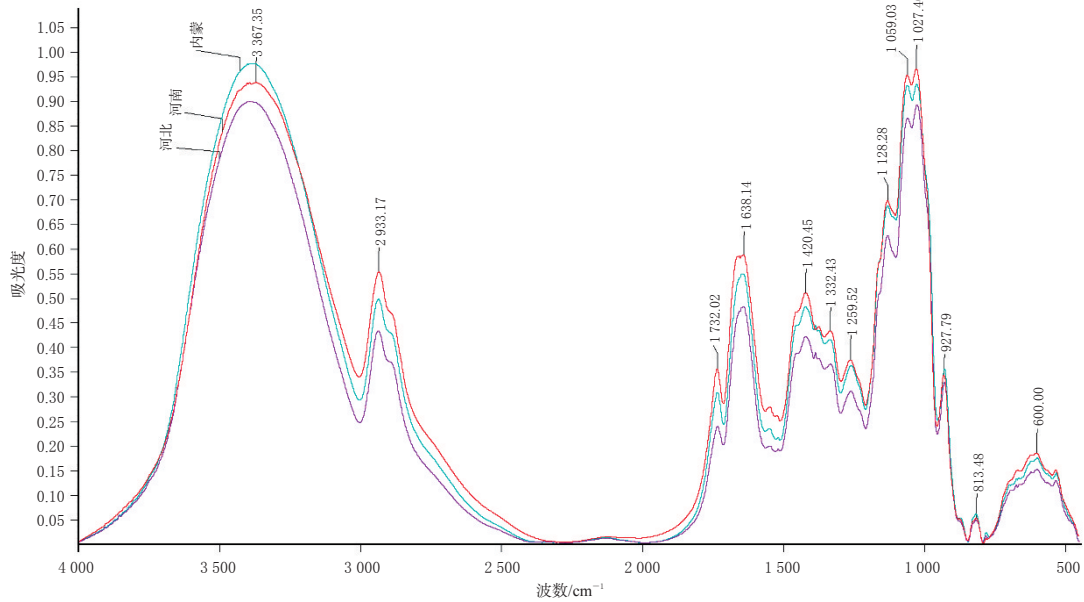


图2 不同产地牛膝药材样品的平均红外光谱图

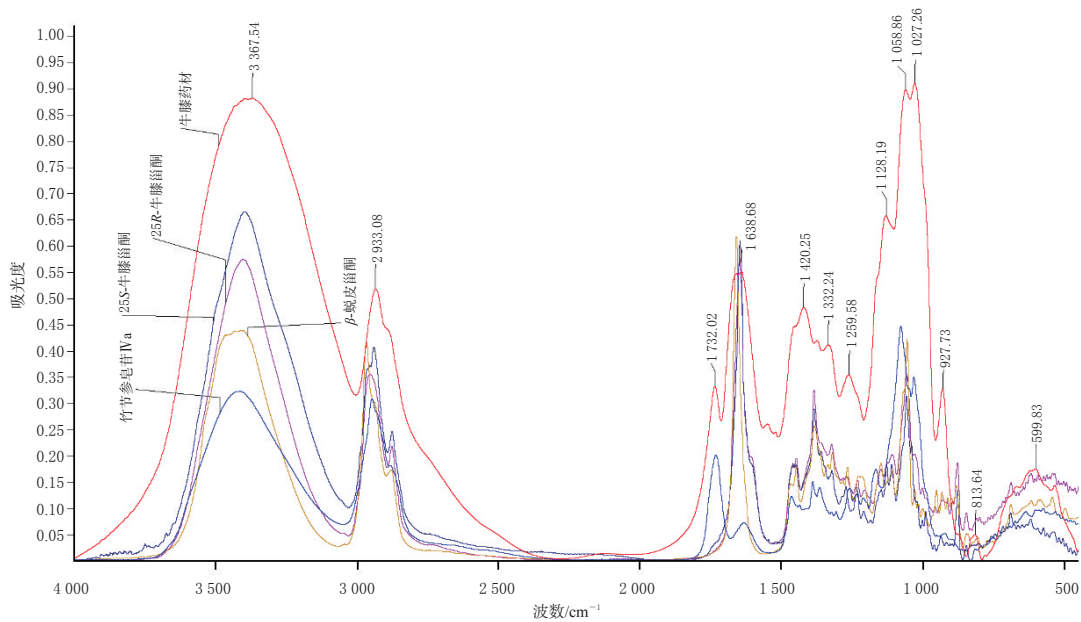


图3 牛膝药材样品与各对照品的平均红外光谱图

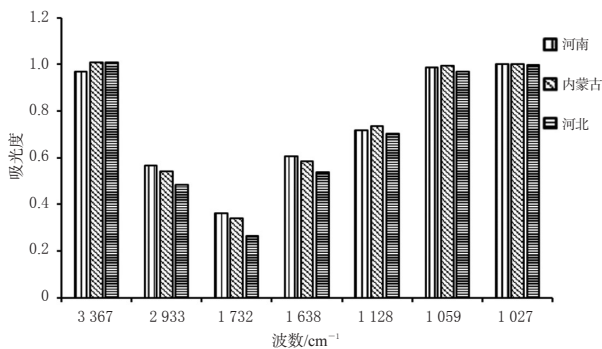


图4 不同产地牛膝药材样品中7个共有峰的相对峰高区分开来。进一步去除1732、1638 cm^{-1} 处吸收峰相对峰高的离散值(相对峰高与均值相差的较大值)后,计算1732、1638 cm^{-1} 处吸收峰的相对峰高比值,采用Excel 2016软件,以不同产地牛膝药材样品1732、1638 cm^{-1}

处吸收峰的相对峰高比值为横、纵坐标绘制正态分布曲线,详见图5。由图5可知,河南产与河北产牛膝药材的正态分布曲线未有交叉,表明两地牛膝药材样品质量存在明显差异;河南产与内蒙古产牛膝药材的正态分布曲线存在交叉,表明两地牛膝药材样品质量相近。

2.3 聚类分析

以61批牛膝药材样品中13个共有峰的相对峰高为原始数据,采用组间连接法以平方Euclidean距离为分类依据,采用SPSS 22.0软件进行聚类分析,详见图6。由图6可知,当组间距离为10时,61批牛膝药材样品可聚为4类,其中N1~N12聚为一类,N13~N18、N36~N45聚为一类,N19~N35聚为一类,N46~N61聚为一类;当组间距离为15时,可聚为3类,其中N1~N12聚为一类,N13~N45聚为一类,N46~N61聚为一类;当组间距离为

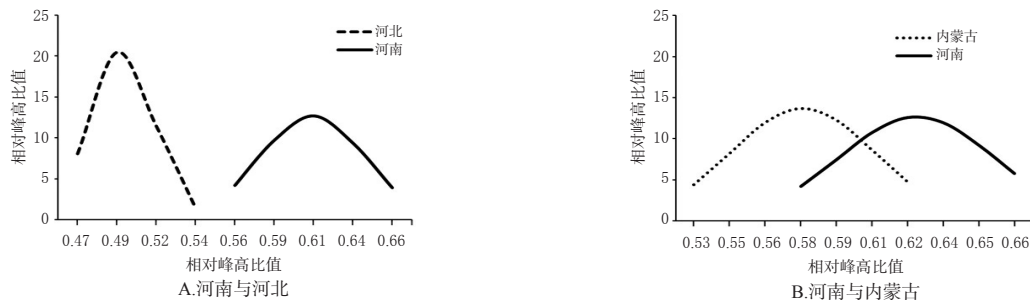


图5 不同产地牛膝药材样品的正态分布曲线图

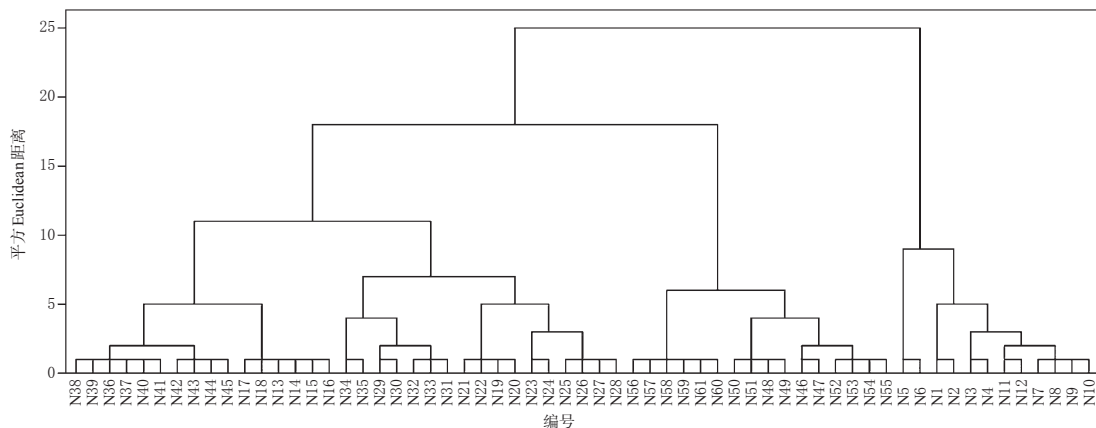


图6 61批牛膝药材样品的聚类分析树状图

20时,可聚为两类,其中N1~N12聚为一类,N13~N61聚为一类,聚类分析与正态分布分析结果基本一致。

2.4 主成分分析

主成分分析是在尽可能保持原有数据信息的前提下,通过降维处理达到简化指标的目的,目前已被广泛用于数据统计分析^[22]。以61批牛膝药材样品中13个共有峰的相对峰高为原始数据,采用SPSS 22.0软件进行主成分分析。结果显示,前3个主成分的累计方差贡献率为91.121%(>85%),表明前3个主成分可以反映牛膝药材样品中13个共有峰的基本特征和主要信息,故选取特征值大于1的前3个主成分进行后续分析。结果见表2、图7。

表2 主成分特征值与方差贡献率

主成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%	总计	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	7.330	56.383	56.383	7.330	56.383	56.383
2	3.216	24.735	81.118	3.216	24.735	81.118
3	1.300	10.003	91.121	1.300	10.003	91.121

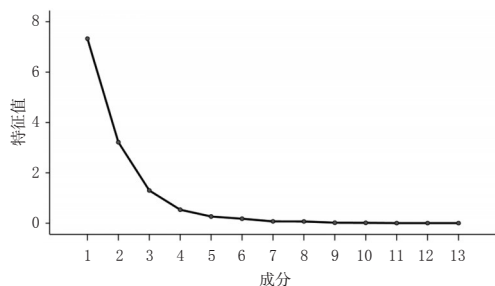


图7 牛膝药材的主成分分析碎石图

采用SPSS 22.0软件计算3个主成分的得分,以各主成分的方差贡献率为权重,对主成分得分和对应权重进行加权平均,得综合得分:综合得分=(56.383×主成分1+24.735×主成分2+10.003×主成分3)/91.121。综合得分可反映牛膝药材的质量,综合得分越高,表示质量越好^[23]。61批牛膝药材中,河南省焦作市驾步村产牛膝药材(编号N40)的综合得分最高,河北省安国市新安村产牛膝药材(编号N4)的综合得分最低。结果见表3。

2.5 正交偏最小二乘法-判别分析

为分析样品组间差异性,以61批牛膝药材样品中13个共有峰的相对峰高为原始数据,采用SIMCA 14.1软件进行正交偏最小二乘法-判别分析。结果显示,数据矩阵的解释率参数(R^2X)=0.986,模型区分参数(R^2Y)=0.943,模型预测能力参数(Q^2)=0.932,均大于0.5,表明模型拟合程度较好,具有较高的稳定性和预测能力^[24]。在95%置信区间(confidence interval, CI)内牛膝药材样品存在一定的差异性,可将61批牛膝药材样品分为3类,其中N1~N12位于得分图的右侧,为一类;N13~N28位于得分图的左下侧,为一类;N29~N61位于得分图左上侧,为一类。结果见图8。

变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)可衡量各共有峰的表达式对样本分类判别的影响强度和解释能力,从而辅助筛选影响质量差异的标志性波段^[25]。以VIP>1为标准^[26]筛选影响牛膝药材质量的标志性波段,且在95%CI内, VIP值越大,表示质量差异越显著,对区别不同产地牛膝药材的贡献越大^[27]。结果显示,共筛选出7个影响牛膝药材质量的关键波数,其

表3 61批牛膝药材样品的综合得分

编号	主成分1得分	主成分2得分	主成分3得分	综合得分
N1	-1.85	-0.61	0.56	-1.25
N2	-1.92	-0.59	0.53	-1.29
N3	-4.59	-0.06	-0.11	-2.87
N4	-4.63	-0.05	-0.07	-2.89
N5	-3.41	0.22	-0.28	-2.08
N6	-3.50	0.22	-0.27	-2.14
N7	-3.04	0.44	-0.14	-1.77
N8	-3.07	0.50	-0.14	-1.78
N9	-3.54	0.43	-0.28	-2.11
N10	-3.48	0.37	-0.17	-2.07
N11	-4.03	0.62	-0.42	-2.37
N12	-4.03	0.63	-0.43	-2.37
N13	1.87	-0.39	0.37	1.09
N14	1.87	-0.43	0.37	1.08
N15	1.71	-0.39	0.54	1.01
N16	1.69	-0.31	0.46	1.01
N17	1.86	-0.29	0.68	1.15
N18	1.87	-0.31	0.73	1.15
N19	2.84	1.45	1.33	2.30
N20	2.81	1.43	1.36	2.28
N21	1.81	1.61	0.89	1.66
N22	1.78	1.68	0.93	1.66
N23	0.45	1.78	1.06	0.88
N24	0.43	1.83	1.08	0.88
N25	0.24	0.73	0.67	0.42
N26	0.20	0.80	0.59	0.40
N27	0.03	0.99	0.14	0.30
N28	0.06	0.87	0.20	0.30
N29	1.00	0.25	1.20	0.82
N30	1.13	0.01	1.42	0.85
N31	0.09	0.21	0.81	0.20
N32	0.69	-0.10	0.54	0.46
N33	0.67	0.08	0.44	0.48
N34	-0.15	-0.17	-0.33	-0.18
N35	-0.13	-0.21	-0.30	-0.17
N36	2.91	0.17	1.09	1.97
N37	2.84	0.12	1.17	1.92
N38	3.00	0.14	0.92	1.99
N39	2.99	0.12	0.91	1.98
N40	3.57	0.28	0.96	2.39
N41	3.53	0.30	0.87	2.36
N42	3.43	-0.01	0.64	2.19
N43	3.34	0.07	0.57	2.15
N44	3.43	-0.28	1.13	2.17
N45	3.47	0.06	0.88	2.26
N46	-0.49	-0.34	-0.62	-0.46
N47	-0.92	-0.31	-0.34	-0.69
N48	-1.80	-1.11	-2.04	-1.64
N49	-1.72	-1.09	-1.95	-1.58
N50	-2.13	-1.00	-1.91	-1.80
N51	-2.14	-1.02	-1.97	-1.82
N52	-1.64	-0.56	-1.21	-1.30
N53	-1.59	-0.55	-1.16	-1.26
N54	-1.80	-0.34	-0.93	-1.31
N55	-1.80	-0.36	-0.88	-1.31
N56	-0.24	-1.07	-2.06	-0.67
N57	-0.22	-1.04	-2.06	-0.64
N58	0.08	-1.35	-1.46	-0.48
N59	0.05	-1.39	-1.44	-0.51
N60	0.06	-1.27	-1.57	-0.48
N61	0.08	-1.38	-1.51	-0.49

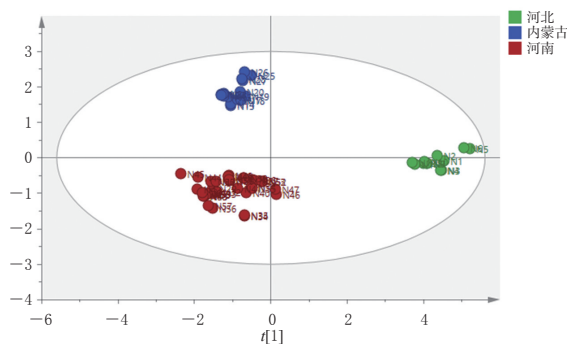


图8 61批牛膝药材样品的正交偏最小二乘法-判别分析得分图

VIP从大到小对应的波数依次为1 059、927、2 933、813、1 732、1 128、3 367 cm^{-1} ，其中1 732 cm^{-1} 处为皂苷类成分的特征吸收峰，1 059、1 128、927 cm^{-1} 处为糖苷类成分的特征吸收峰。结果见图9。

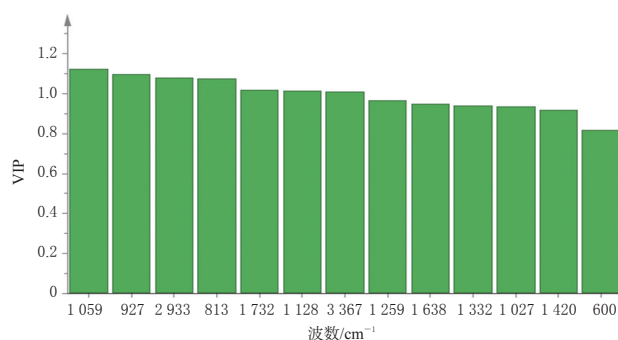


图9 牛膝药材共有峰波数的VIP

3 讨论

“药王”孙思邈在《备急千金要方》中云：“古之医者……用药必依土地，所以治十得九。”^[28]由此可见，产地因素对药材品质有一定的影响。不同产地的温度、湿度、降水量、风速、地形、土壤、微生物等因素均会通过影响药材的物候规律和生长发育、能量代谢、物质合成及气体交换等生理过程，进而影响其有效物质（次生代谢产物）的生成，继而导致不同产地牛膝中三萜皂苷类、甾酮类、多糖类等有效成分含量各有不同，最终引起药材质量及临床疗效的差异^[29]。

有研究认为，红外光谱图中1 700~1 900 cm^{-1} 波段主要为酯类成分、1 500~1 700 cm^{-1} 波段主要为酸类成分、950~1 200 cm^{-1} 波段主要为糖类成分，这些初级代谢产物在相应波段范围内的振动吸收均有差别^[30]。本研究结果显示，河南产牛膝药材中2 933、1 732、1 638 cm^{-1} 处吸收峰的相对峰高均高于内蒙古产和河北产牛膝药材。因此，笔者认为，可将这3个波数对应吸收峰的相对峰高用于区分不同产地牛膝药材。

正态分布分析结果显示，河南产与河北产牛膝药材的正态分布曲线未有交叉，表明两地牛膝药材样品质量存在明显差异；河南产与内蒙古产牛膝药材的正态分布曲线存在交叉，表明两地牛膝药材样品质量相近。聚类

分析结果显示,当组间距离为15时,61批牛膝药材可聚为3类,其中N1~N12聚为一类、N13~N45聚为一类、N46~N61聚为一类。主成分分析结果显示,前3个主成分的累计方差贡献率为91.121%;河南省焦作市驾步村产牛膝药材(编号N40)的综合得分最高,河北省安国市新安村产牛膝药材(编号N4)的综合得分最低。以上结果表明,河南产牛膝与内蒙古产牛膝的质量相似,均与河北产牛膝存在一定差异。

正交偏最小二乘法-判别分析结果显示,61批牛膝药材样品分为3类,其中N1~N12位于得分图的右侧,为一类;N13~N28位于得分图的左下侧,为一类;N29~N61位于得分图左上侧,为一类,表明不同产地牛膝药材质量具有一定差异。共筛选出7个影响牛膝药材质量的标志性波数,VIP从大到小对应的波数依次为1 059、927、2 933、813、1 732、1 128、3 367 cm^{-1} ,其中1 732 cm^{-1} 处为皂苷类成分的特征吸收峰,1 059、1 128、927 cm^{-1} 处为糖苷类成分的特征吸收峰。

综上所述,红外指纹图谱结合正态分布、聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析可用于鉴别不同产地牛膝药材;不同产地牛膝药材质量存在一定差异。

参考文献

[1] 王小燕,郭常润,常军民,等.怀牛膝多糖的柱前衍生化-HPLC指纹图谱建立及单糖成分含量测定[J].中国药房,2021,32(3):294-300.

[2] 唐维维,梁献葵,马驰虹,等.不同采收季节怀牛膝指纹图谱研究[J].中药材,2019,42(9):2079-2085.

[3] 纪亮,刘倩茹,梁献葵,等.不同规格怀牛膝不同极性部位HPLC指纹图谱[J].中国药学杂志,2020,55(8):580-587.

[4] 胡建平,孙延平,苏发智,等.怀牛膝多糖的提取分离及生物活性研究进展[J].化学工程师,2021,35(10):52-55.

[5] 罗懿飏,欧阳文,唐代凤,等.牛膝中皂苷和甾酮类物质基础及药理活性研究进展[J].中国现代中药,2020,22(12):2122-2136.

[6] 张留记,刘晓苗,屠万倩,等.HPLC法同时测定怀牛膝中5个成分的含量[J].药物分析杂志,2018,38(4):623-629.

[7] 施之琪,朱月琴,曹琰,等.基于标准汤剂的牛膝配方颗粒质量评价研究[J].中药新药与临床药理,2019,30(7):863-869.

[8] 屠万倩,张留记,刘晓苗,等.多指标正交试验法优选牛膝酒炙工艺[J].中药材,2018,41(7):1589-1592.

[9] 张振凌,胡婷婷,田双双,等.不同盐制方法对牛膝中有效成分含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(3):10-13.

[10] 屠万倩,张留记,刘晓苗,等.牛膝及其炮制品中甾酮类和皂苷类成分的含量比较[J].中药新药与临床药理,2019,30(1):89-93.

[11] 屠万倩,张钰,李桂本,等.正交试验-主成分分析法优选牛膝醋制工艺[J].中药新药与临床药理,2020,31(8):990-994.

[12] 邓颖嘉,何燕珊,刘奇越,等.基于化学计量方法建立牛膝及酒牛膝指纹图谱[J].中药材,2021,44(4):912-916.

[13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:270.

[14] 耿淑琴,樊肇胜,刘豪,等.短瓣金莲花指标成分的红外光谱快速分析[J].光谱学与光谱分析,2019,39(11):3624-3628.

[15] 王秀芬,李静,马芳,等.基于红外光谱技术对不同产区枸杞子的分析[J].医药导报,2018,37(6):721-726.

[16] 龚海燕,罗晓,雷敬卫,等.不同产地金银花中红外光谱分析[J].中医学报,2016,31(1):96-98.

[17] 范帅帅,高晗,田伟,等人参、红参、西洋参3种配方颗粒的傅里叶变换红外光谱快速鉴别方法[J].药物评价研究,2018,41(12):2242-2247.

[18] 姜泽明,周甜甜,卜洪洋,等.落叶松树皮原花青素生产过程的红外光谱分析[J].光谱学与光谱分析,2018,38(1):62-67.

[19] 张岳,罗文汇,孙冬梅.红外光谱技术在中药配方颗粒中的研究进展[J].中医药导报,2014,20(2):99-101.

[20] 胡咏川,田晓鑫,刘蕾,等.近红外光谱技术鉴定中药的进展[J].中国中药杂志,2012,37(8):1066-1071.

[21] 李燕青,丁姗姗,郭德慧.葛根提取物中麦芽糊精的中红外快速定量分析[J].现代食品科技,2020,36(2):283-291,240.

[22] 陈佳,张权,杨蕊,等.甘草药材及其炮制品炙甘草化学模式识别分析[J].药物分析杂志,2020,40(11):1963-1976.

[23] 唐维维,王娅平,雷敬卫,等.基于化学模式识别法评价明矾炮制不同果形栀子药材的质量[J].中药材,2020,43(7):1601-1606.

[24] 张桐,王玥玥,王康宇,等.基于化学模式识别法的不同品种木通药材指纹图谱研究[J].药物分析杂志,2021,41(9):1590-1597.

[25] 郭丽,杨忠杰,于晓涛,等.南、北五味子药材的HPLC指纹图谱建立及化学模式识别分析[J].中国药房,2020,31(18):2224-2229.

[26] 谭小娟,李世雄,李瓊峪,等.白术饮片的指纹图谱形状特征与质量标志物(Q-Marker)研究[J].中草药,2021,52(16):4844-4851.

[27] 王震.不同生长期穿心莲药材HPLC指纹图谱及化学模式识别[J].药物分析杂志,2021,41(3):410-420.

[28] 孙思邈.备急千金方[M].焦振廉,校注.北京:中国医药科技出版社,2011:10.

[29] 顾志荣,马天翔,孙岚萍,等.基于傅里叶变换红外光谱及化学计量学方法的不同产地锁阳药材分类鉴别[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(22):159-165.

[30] 张维方,樊克锋,雷敬卫,等.地黄药材的红外指纹图谱及多元统计分析[J].光谱学与光谱分析,2021,41(11):3392-3398.

(收稿日期:2021-08-21 修回日期:2021-12-07)

(编辑:陈宏)