

## 蛇足石杉及其近缘种表征关系的 FTIR 主成分分析

郭水良<sup>1,2</sup>, 李沛玲<sup>1</sup>, 方芳<sup>1</sup>, 黄华<sup>1</sup>, 程存归<sup>1</sup>

1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

2. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234

**摘要** 蛇足石杉是一种重要药用植物, 其种内变异程度高, 近缘种多, 植株体型小, 可供鉴别性状少。运用 OMNI 采样器-傅里叶变换红外光谱直接测定法, 获得了蛇足石杉(*Huperzia Serrata*)及其 5 个近缘种: 四川石杉(*Huperzia Sutchueniana*)、闽浙马尾杉(*Phlegmariurus Mingchegensis*)、石松(*Lycopodium Japonicum*)、深绿卷柏(*Selaginella Doederleinii*)和异穗卷柏(*Selaginella Heterostachys*) 16 个叶片样品的红外光谱, 以 666~3 145  $\text{cm}^{-1}$  范围内吸收峰吸光度为指标, 以红外光谱图为对象, 应用主成分分析(Principal Component Analysis), 比较了 16 个样品在红外光谱上的差异程度。发现基于傅里叶变换红外光谱的主成分分析排序图能够在一定程度上表征 16 个样品的分类关系。应用 FTIR 直接测定法能够鉴别蛇足石杉及其近缘物种。

**主题词** 红外光谱指纹图谱; 主成分分析; 蛇足石杉

**中图分类号:** R282.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)05-0693-05

### 引言

蛇足石杉 [*Huperzia Serrata* (Thunb.) Trev.] 为蕨类植物, 属石杉科 (Huperiaceae), 石杉属 (*Huperzia* Bernh.), 1972 年国内首次报道该植物的生物碱石杉碱甲 (Huperzine A, Hup A) 在动物试验上有横纹肌松弛作用, 之后又证明 Hup A 具有抑制胆碱酯酶的活性。Hup A 对重症肌无力、记忆力减退和老年性痴呆具有较好的效果。它是一种低毒、高效、可逆和高选择性的 Ach E 抑制剂。由于蛇足石杉独特的药用价值, 该植物资源利用的前景十分诱人, 日益受到国内外学者的重视<sup>[1]</sup>。

研究表明, 不同地区的蛇足石杉所含 Hup A 的量有一定差异<sup>[2]</sup>。由于蛇足石杉本身的生长状况和石杉碱甲的含量受各种环境因素的影响较大。生产中遇到的石杉碱甲含量不稳定这一问题还与蛇足石杉的种内变异有关。目前分类学家认定的蛇足石杉是一个有着丰富种内变异的物种<sup>[3]</sup>, 人们尚没有系统地研究该种的种内变异规律。不清楚石杉碱甲高含量居群的快速、准确的鉴别特征。

中药材的指纹图谱鉴别是中药鉴定学的重要手段<sup>[4]</sup>, 主成分分析在植物分类学、植被生态学中被广泛地应用于反映对象间的相似关系<sup>[5]</sup>。程存归等曾用主成分分析来判别红外光谱图间的差异程度, 并通过二维图来反映这种差异<sup>[6]</sup>。本文应用主成分分析, 通过三维排序图来反映蛇足石杉及它的近缘种的关系, 以期在红外光谱在药用蕨类植物鉴别中的应

用提供证据。

### 1 研究材料与方法

#### 1.1 研究材料

用于测定的蛇足石杉及它的近缘种采自浙西天目山开山老殿、浙西天目山三毛屏、浙中金华北山双龙洞、浙中金华北山盘前村、浙南丽水白云山、浙南庆元百山祖、浙南遂昌九龙山、浙南遂昌大西坑、闽北武夷山, 种类涉及到蛇足石杉、石松、闽浙马尾杉、四川石杉、深绿卷柏、异穗卷柏等 6 种石松亚门的蕨类植物(见表 1)。

#### 1.2 测定方法

仪器为美国 NICOLET NEXUS 670 型 FTIR 仪, 分辨率 0.1  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描累加次数 64 次, OMNI 采样器, 光谱范围 3 415~666  $\text{cm}^{-1}$ 。分别将待测植物成熟孢子体的叶背面直接置于红外光谱仪中采样器的锗晶片上, 记录红外吸收光谱。为了解茎上不同部位叶片对红外光谱图的影响, 以浙南大西坑蛇足石杉居群的植株为样品, 从植株基部→中部→顶部, 取叶片分别测定其红外光谱, 比较它们的差异。

#### 1.3 数据分析

以样品的红外光谱为对象, 以 3 415~666  $\text{cm}^{-1}$  波峰的吸光度为指标, 构建数据矩阵, 应用主成分分析法对 16 个样品进行排序分析, 得到不同光谱的三维排序图, 分析样品在排序图上的位置关系与它们分类关系间的对应性。

收稿日期: 2003-09-26, 修订日期: 2004-03-05

基金项目: 浙江省自然科学基金(302104, 301028)资助项目

作者简介: 郭水良, 1964 年生, 浙江师范大学化学与生命科学学院教授, 理学博士

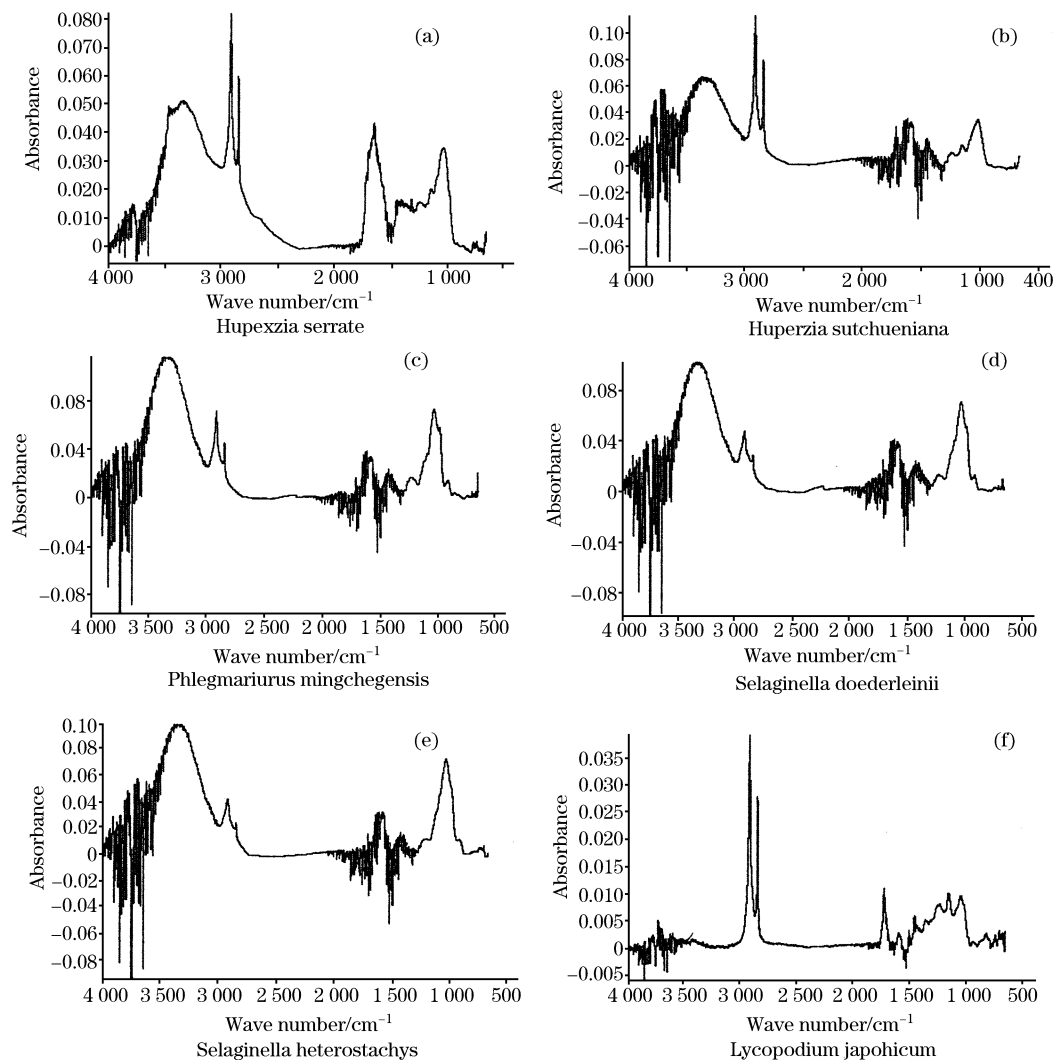


Fig. 1 FTIR spectra of the 16 leaf samples including *Huperzia serrata* and other five closely related species

(a) sample 7; (b) sample 6; (c) sample 5; (d) sample 1; (e) sample 2; (f) sample 3

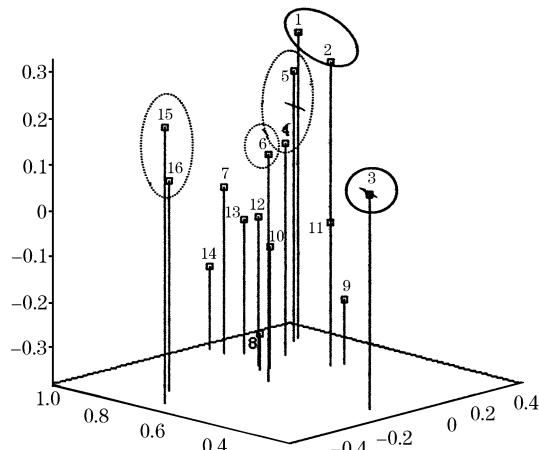


Fig. 2 Three-dimensional plots of FTIR spectra of the 16 leaf samples including *Huperzia serrata* and its closely related species based on PCA

(Note: Population 1-16 are listed in Table 1)

## 2 结果与分析

通过傅里叶变换红外光谱直接测定法获得 16 个蕨类植物样品的叶片(背面)的红外光谱图。由于篇幅有限见表 2。列出了其中 6 幅图谱(见图 1)。16 个样品在  $3145 \sim 666 \text{ cm}^{-1}$  指纹区共获得 104 个波峰, 吸光度在  $0.141 \sim 0.005$  之间, 运用主成分分析对以上数据运算, 得到 16 个样品的主成分分析排序三维散点图(见图 2)。16 个样品的 FTIR 所对应的数据见表 2。三维排序图中, 前 3 个主成分的累计贡献率为 83.51%, 说明排序图 2 很好地反映了表 2 中的数据信息。

从排序图上可以发现, 蛇足石杉等近缘种红外光谱在三维排序图上的位置关系与它们间的分类关系有较好的对应性。例如 3 号样品为石松, 属于石松科植物, 与其他样品的区别非常明显, 说明该种在植物化学上的组成与其他样品有明显区别, 1、2 样品分别是深绿卷柏和异穗卷柏, 属于卷柏科植物, 位置相对接近, 与石松科的石松(3)和石杉科的 13

个样品(4~16)的区别也比较明显,能够从排序图上将它们区别出来。4~16号样品虽然均属于石杉科植物,但是它们间也存在较大的差异。其中,4,5号为闽浙马尾杉,属于马尾杉属植物,6号为四川石杉,属于石杉属植物。排序图的位置比较好地反映了不同种间的亲缘关系。排序图上同时也反映出同一种植物在不同产地的差异情况。15和16号样品均产于浙西天目山,这两个蛇足石杉的样品与其他产地的差异较为明显;相比较,浙南庆元百山祖蛇足石杉居群(8)、浙南丽水市北郊白云山蛇足石杉居群(9)的红外光谱图也表明出与众不同的特点,说明这两个居群在植物化学组成上有一

定的特殊性。

以浙南遂昌大西坑蛇足石杉居群为对象,测定植株茎上不同部位叶片的红外光谱图,结果见图3,图3清楚地显示出,同一种植物的不同部分叶片的红外光谱图变化并不大,红外光谱图具有指纹识别的优点。

从鉴别的角度,104个吸收峰在前3个主成分的信息负荷量反映了它们在鉴别上的作用,其绝对值越大,则其作用越明显(见图4)。直观地讲,16个样品在主成分分析的三维排序图分散效果即为表征分类的有效性,在排序图上与相关的类群距离越远,则越容易以红外光谱法来鉴别。以104个

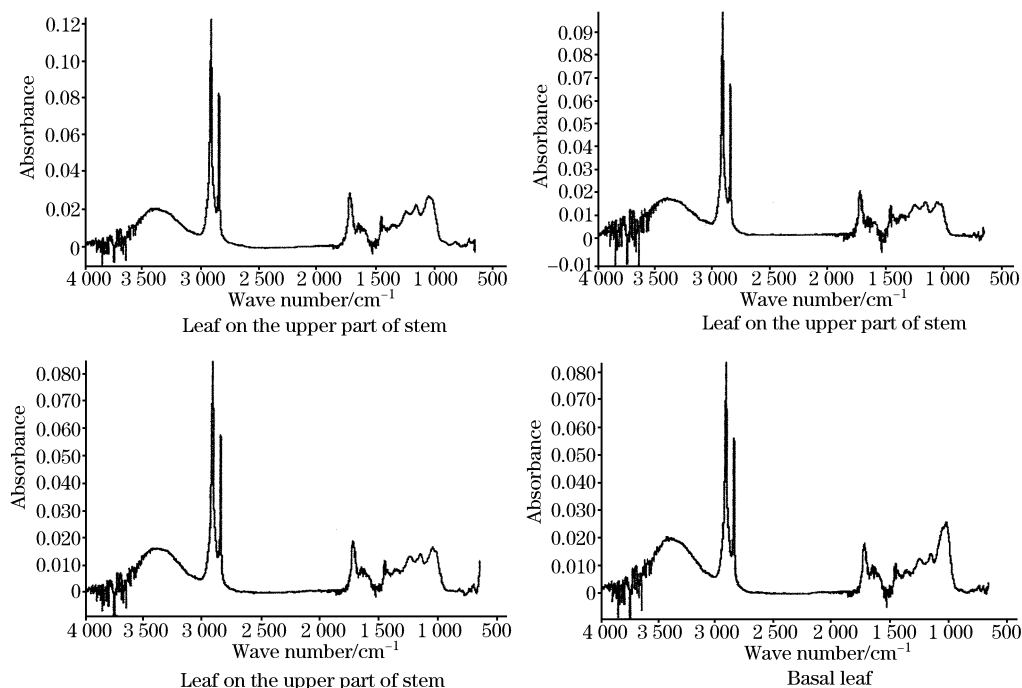


Fig. 3 FTIR spectra of the four leaf samples on the different locations of the stems  
(*Huperzia serrata* collected from Da Xiken in the southern parts of Zhejiang province)

Table 1 Species of 16 samples and their locations

序号	种类	地点
1	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i>	闽北武夷山 Wuyishan, Northern Fujian
2	异穗卷柏 <i>Selaginella heterostachys</i>	闽北武夷山 Wuyishan, Northern Fujian
3	石松 <i>Lycopodium japonicum</i>	闽北武夷山 Wuyishan, Northern Fujian
4	闽浙马尾杉 <i>Phlegmariurus mingchegensis</i>	浙南遂昌大西坑 Daxikeng, Suichang, Southern Zhejiang
5	闽浙马尾杉 <i>Phlegmariurus mingchegensis</i>	浙南遂昌九龙山 Jiulongshan, Suichang, Southern Zhejiang
6	四川石杉 <i>Huperzia sutchueniana</i>	浙南庆元百山祖 Baishanzhu, Qinyuan, Southern Zhejiang
7	蛇足石杉 <i>Huperzia serrata</i>	浙南遂昌九龙山 Jiulongshan, Suichang, Southern Zhejiang
8	蛇足石杉 <i>Huperzia serrata</i>	浙南庆元百山祖 Baishanzhu, Qinyuan, Southern Zhejiang
9	蛇足石杉 <i>Huperzia serrata</i>	浙南丽水白云山 Baiyunshan, Lishui, Southern Zhejiang
10	蛇足石杉 <i>Huperzia serrata</i>	浙南遂昌大西坑 Daxikeng, Suichang, Southern Zhejiang
11	蛇足石杉 <i>Huperzia serrata</i>	浙中金华南山 Nanshan, Jinhua, Middle Zhejiang
12	蛇足石杉 <i>Huperzia serrata</i>	闽北武夷山 Wuyishan, Northern Fujian
13	蛇足石杉 <i>Huperzia serrata</i>	浙中金华北山双龙洞 Double dragon caves, Beishan, Jinhua, Middle Zhejiang
14	蛇足石杉 <i>Huperzia serrata</i>	浙中金华北山盘前村 Pangqian village, Beishan, Jinhua, Middle Zhejiang
15	蛇足石杉 <i>Huperzia serrata</i>	浙西西天目山开山老殿 Laodian, Xitianmushan, Western Zhejiang
16	蛇足石杉 <i>Huperzia serrata</i>	浙西西天目山三毛屏 San maoping, Xitianmushan, Western Zhejiang

**Table 2 The absorbance values at the different wave numbers of the 16 samples including *Huperzia serrata* and other closely related species (parts)**

波数/cm <sup>-1</sup>	样品															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
666	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000
673~677	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.001	0.000	0.005	0.007	0.005	0.000	0.000
681	0.011	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002
685~688	0.000	0.000	0.003	0.007	0.005	0.007	0.001	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
699~703	0.000	0.000	0.003	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000
718~721	0.006	0.007	0.003	0.003	0.006	0.002	0.000	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001	0.004	0.005	0.003	0.004
740~747	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.001
751~755	0.004	0.006	0.003	0.003	0.004	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.003	0.000	0.004	0.005	0.002	0.001
776~781	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.001
803~806	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.003	0.000
821~825	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.003	0.000	0.000	0.000
832	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
854~858	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000
866	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
910~913	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.000	0.000	0.008	0.008	0.000	0.000	0.000
924	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
925~928	0.014	1.011	0.000	0.008	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
995~998	0.052	0.000	0.000	0.000	0.060	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1 028~1 032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.035	0.000	0.035	0.000	0.037	0.000	0.052	0.044	0.053	0.044	0.038
1 036~1 039	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.035	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1043	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1 047~1 050	0.071	0.073	0.000	0.000	0.074	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1 058	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.039
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1 708~1 715	0.017	0.010	0.006	0.013	0.011	0.021	0.033	0.028	0.015	0.030	0.012	0.019	0.022	0.032	0.032	0.038
1 723~1 727	0.026	0.017	0.000	0.021	0.018	0.030	0.026	0.031	0.015	0.034	0.013	0.021	0.025	0.036	0.000	0.044
1 734~1 738	0.012	0.004	0.011	0.010	0.006	0.021	0.025	0.028	0.009	0.030	0.005	0.014	0.017	0.027	0.042	0.045
1 745	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1 752~1 756	0.014	0.007	0.000	0.003	0.005	0.010	0.000	0.012	0.006	0.012	0.005	0.006	0.010	0.011	0.000	0.000
1 760~1 763	0.014	0.007	0.000	0.003	0.004	0.008	0.000	0.009	0.004	0.008	0.005	0.005	0.008	0.009	0.000	0.000
1 778	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.003	0.005	0.008
1 785~1 789	0.012	0.005	0.001	0.002	0.004	0.006	0.003	0.004	0.003	0.004	0.004	0.002	0.006	0.005	0.000	0.000
1 800~1 804	0.011	0.004	0.000	0.001	0.004	0.005	0.000	0.003	0.003	0.003	0.004	0.002	0.005	0.004	0.003	0.004
1 811~1 815	0.011	0.005	0.001	0.000	0.000	0.006	0.001	0.003	0.003	0.004	0.004	0.003	0.006	0.004	0.002	0.000
1 819	0.000	0.000	0.000	0.002	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1 833~1 837	0.007	0.003	0.001	0.001	0.004	0.005	0.001	0.002	0.003	0.002	0.003	0.001	0.003	0.002	0.001	0.002
1 848~1 852	0.009	0.004	0.001	0.003	0.005	0.007	0.002	0.003	0.004	0.003	0.004	0.003	0.005	0.004	0.002	0.002
1 870~1 874	0.007	0.003	0.001	0.003	0.005	0.006	0.001	0.003	0.004	0.003	0.004	0.003	0.004	0.004	0.000	0.002
1 896~1 900	0.004	0.003	0.001	0.002	0.005	0.006	0.001	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.002	0.002
1 911~1 915	0.004	0.002	0.000	0.000	0.000	0.005	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.001
1 926~1 930	0.004	0.003	0.001	0.003	0.004	0.006	0.001	0.002	0.002	0.003	0.003	0.002	0.002	0.003	0.000	0.002
1 948~1 952	0.004	0.003	0.000	0.002	0.003	0.006	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.001	0.003	0.000	0.002
1 956~1 959	0.000	0.003	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002	0.002	0.000	0.000	0.002	0.000
1 970	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
1 974~1 978	0.004	0.003	0.001	0.002	0.000	0.006	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.002	0.001	0.002
1 996~2 000	0.004	0.003	0.001	0.002	0.002	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.002	0.000	0.002	0.002	0.002
2 844	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.073	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2 852	0.029	0.024	0.028	0.051	0.046	0.080	0.000	0.076	0.030	0.000	0.024	0.051	0.050	0.074	0.095	0.089
2 859	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2 919	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.111	0.047	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2 926	0.048	0.042	0.040	0.077	0.073	0.119	0.083	0.000	0.000	0.019	0.039	0.079	0.075	0.123	0.141	0.133
3 415~3 407	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.076	0.064

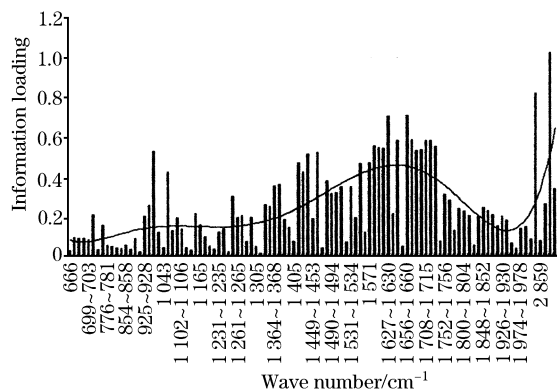


Fig. 4 Information loading of 104 absorbance peaks to principal component

吸收峰的信息总负荷量为基础作出图 4。图 4 表明,在不同的波数区间,对蛇足石杉及 5 个近缘种间,以及蛇足石杉不同地理居群间的鉴别效果是不同的。以  $1\ 656\sim 1\ 660\ \text{cm}^{-1}$  为中心范围的吸收峰以及  $2\ 859\ \text{cm}^{-1}$  以上的吸收峰,对 16 个样品的鉴别效果最好。

### 3 结束语

应用傅里叶变换红外光谱直接测定法已对药用种子植物开展过较多的研究,但是尚没有关于这一方法在蕨类植物中的应用报道。对 16 个蕨类植物样品的测定表明,红外光谱图的差异基本上与它们间的表征分类关系相对应,分类关系相近的样品,它们的红外光谱图比较接近,利用傅里叶变换红外光谱图的差异能够一定程度上帮助人们对蕨类植物样品进行鉴别。通过主成分分析,能够了解不同波数范围上的吸收峰对分类鉴别的效果。

### 参 考 文 献

- [1] YU Hong-ying, SUN Yuan-ming, YANG Yue-jin (余红英,孙远明,杨跃进). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 2001, 32(3): 279.
- [2] YU Hong-ying, SUN Yuan-ming, YANG Yue-jin (余红英,孙远明,杨跃进). Lishi Zhen Medicine and Materia Medica Research (时珍国医国药), 2002, 13(3): 176.
- [3] ZHANG Li-bing, KONG Xian-xu (张丽兵,孔宪需). Acta Phytotaxonomica Sinica(植物分类学报), 2000, 38(1): 13.
- [4] LIU Hui-qiong, GUO Shu-hao(刘慧琼,郭书好). Acta Chinese Medicine and Pharmacology(中医药学报), 2002, 30(2): 35.
- [5] ZHANG Jin-tun(张金屯). Methods of Quantitative Vegetation Ecology. Beijing: Chinese Science and Technology Publishing House (北京:中国科学技术出版社), 1995. 111, 139.
- [6] CHENG Cun-gui, GUO Shui-liang, CHEN Jian-hua(程存归,郭水良,陈建华). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2002, 22(6): 954.

## FTIR Spectra-Principal Component Analysis of Phenetic Relationships of *Huperzia Serrata* and Its Closely Related Species

GUO Shui-liang<sup>1,2</sup>, LI Pei-ling<sup>1</sup>, FANG Fang<sup>1</sup>, HUANG Hua<sup>1</sup>, CHENG Cun-gui<sup>1</sup>

1. College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

2. College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Teachers' University, Shanghai 200234, China

**Abstract** *Huperzia serrata* is an important medicinal plant. This species is rich in inner-specific variation with various closely related species, and their individuals are also small with few identification characters. In the present paper, the method of Fourier transform infrared spectrometer with an OMNI collector was applied to obtaining the infrared spectra of 16 leaf samples including *Huperzia serrata* and its five closely related species (*Huperzia sutchueniana*, *Phlegmariurus mingchengensis*, *Lycopodium japonicum*, *Selaginella doederleinii*, *Selaginella heterostachys*). Based on the indices of wave number-absorbance, the differences of the 16 infrared spectra were compared by the method of Principal Component Analysis (PCA). The results showed that there is good correspondence between the position relationship of PCA three-dimensional plot of the samples based on the indices of wave number-absorbance of FTIR spectra and their phenetic relationship. Therefore, the infrared spectra could be applied to identifying the samples of *Huperzia serrata* and its closely related species.

**Keywords** Infrared spectra; Principal component correspondence analysis; *Huperzia serrata*

(Received Sep. 26, 2003; accepted Mar. 5, 2004)