

基于双指标分析法和聚类分析法的 花椒红外指纹图谱研究

Infrared Fingerprint Analysis of Zanthoxylum Based on Sequential Dual-Indexes and Cluster Analysis Method

课净璇 黎杉珊 申光辉 吴贺军

KE Jing-xuan LI Shan-shan SHEN Guang-hui WU He-jun

罗擎英 刘兴艳 陈安均 张志清

LUO Qing-ying LIU Xing-yan CHEN An-jun ZHANG Zhi-qing

(四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014)

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

摘要:为探索建立一种有效鉴别花椒产地的方法,以 17 份不同产地花椒为原料,采用傅里叶变换红外光谱技术结合双指标分析法和聚类分析法研究不同产地花椒之间亲缘远近关系,并对花椒红外二阶导数光谱图进行分析比较,研究花椒所含特征物质与产地之间的关系。结果表明,不同产地花椒红外光谱图频率分布基本一致,但在 $3\,500\sim 2\,800\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,700\sim 1\,000\text{ cm}^{-1}$ 两个波段中吸收峰数目和强度存在差异;应用双指标分析法可精确地表示样品间的亲缘关系;红外图谱经二阶导数处理,将特征峰峰高值导入 SPSS 22.0 软件进行聚类分析,17 个花椒样品被分为五类。试验探索出了一种简便、有效的花椒产地鉴别方法。

关键词:花椒;红外光谱;双指标分析法;聚类分析法

Abstract: It was focused on setting a effective way for tracing the producing area of *Zanthoxylum* in this study, by using infrared fingerprints. The methods of dual-indexes and cluster had been applied to analyze the infrared fingerprints so as to investigate similarity of 17 samples. Moreover, the relationship between the producing area and prime substances in *Z. bungeanum* Maxim. has been researched by analyzing second derivative of the infrared fingerprints of *Z. bungeanum* Maxim. The infrared spectras of *Zanthoxylum* had the similar characteristic peaks, but there were still some differences in the number and intensity of the absorption peaks in the range of fin-

gerprint region $3\,500\sim 2\,800\text{ cm}^{-1}$ and $1\,700\sim 1\,000\text{ cm}^{-1}$. The degree of similarity of 17 samples were accurate when used sequential analysis of dual-indexes. The peak heights of infrared fingerprints after reckoned second derivative were used to cluster analysis by SPSS 22.0, and 17 samples were divided into five categories, obviously. In this study, a simple and convenient method for identification of *Zanthoxylum* was explored.

Keywords: *Zanthoxylum*.; Infrared spectrum; Dual-Indexes sequential analysis; Cluster analysis

花椒为芸香科植物青花椒 (*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc.) 或花椒 (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.) 的干燥成熟果皮^[1]。全球有 200 余种^[2], 中国现有 50 余种, 主要品种有竹叶花椒、青花椒、花椒、川陕花椒和野花椒等^[3]。四川、陕西、云南、西藏、贵州、广东和广西等地区是花椒的主要产地^[4]。研究表明, 花椒中含有丰富的挥发油^[5]、酰胺类^[6]、酮类^[7]、酚类^[8] 等有效成分。但不同产地的花椒在化学成分上有较大的差别, 造成不同品种的花椒在品质和风味上存在差异^[9]。目前, 市场上花椒品种繁多, 且其加工制品品质差别较大, 在生产或应用中常会出现品种不一的情况, 使得花椒在深加工及应用领域 (如医学) 受到一定程度的限制。

化学指纹图谱技术可以对原料产地进行溯源, 判断原料及其半成品和成品品质的均一性^[10], 它强调的是化学谱图的“完整面貌”即整体性, 反映的质量信息是综合的, 可以整体地评价样品质量^[11]。指纹图谱技术与双指标序列分析法和聚类分析法结合可以分析样品之间的亲疏远近关系, 对样品进行分类^[12]。化学指纹图谱技术最初主要应用于中药地

基金项目:四川省科技厅应用基础项目 (编号: 2016JY0118); 国家林业局林业行业标准项目 (编号: 2015-LY-184)

作者简介:课净璇, 女, 四川农业大学在读硕士研究生。

通信作者:张志清 (1976—), 男, 四川农业大学教授, 博士生导师, 博士。E-mail: zqzhang721@163.com

收稿日期:2017-01-16

道药材的产地溯源,即中药指纹图谱技术。花椒作为药食同源性食物亦可用化学指纹图谱技术来评价其质量和产地鉴定。张玖等^[13]采用水蒸气蒸馏—乙醚萃方法提取花椒挥发油,建立了基于挥发油的花椒气相色谱指纹图谱,并利用气相色谱—质谱联用技术(GC—MS)确定了特征峰物质为 β -月桂烯。杜文倩等^[14]采用高效液相色谱法测定花椒乙醇提取物,建立了基于花椒麻味物质的 HPLC 指纹图谱,并通过液质联用的方法定性分析共有峰,为红花椒产地溯源提供理论依据。

红外光谱技术具有绿色、无损和操作简便等特点^[15]。红外光谱技术较多应用于中药鉴别和质量评价中^[16-17]。目前,该技术也广泛应用于食品行业中^[18]。单明秋等^[19]采用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)技术,对不同产地的侧柏叶进行红外光谱分析,并结合双指标序列分析法计算不同产地侧柏叶的相似性,得出结论为产地相同或相近的侧柏叶样品具有较高的共有峰率。齐海燕等^[20]应用红外光谱技术并结合聚类分析法,测定不同产地花椒,从样品特征吸收峰的差异性将 12 批样品分为 4 类,分类情况与实际情况相符,说明红外光谱技术可用于花椒的品质测定。目前,已有较多研究学者应用近红外光谱技术定量检测花椒中某种化学成分的含量,如吉卉^{[21]42-48}研究了基于近红外光谱技术花椒蛋白质含量的快速测定;王刚等^[22]研究了花椒挥发油含量的近红外光谱无损检测;李洋等^[23]应用近红外光谱技术研究了花椒生物碱和挥发油含量的无损检测。而花椒红外光谱指纹图谱的研究较少。吉卉^{[21]18-31}采用多类逐步判别分析和 BP 神经网络两种模式识别方法建立了同一品种不同产地花椒的鉴别模型,研究了花椒品质指标与红外光谱图之间的内在联系,但模型建立过程较为繁琐。根据齐海燕等^[20]研究,在分析花椒红外光谱时只用了聚类分析法对样品进行分类,分类结果明显,但不能具体地表现各样品之间的相似度。本研究拟采用傅里叶变换红外光谱技术测定 17 批不同产地花椒的红外光谱,并且采用双指标序列分析法结合聚类分析法分析花椒样品红外光谱,其中双指标序列分析法可精确地表示出不同产地花椒之间的相似度。又通过比较不同产地花椒红外二阶导数图谱的差异性,分析不同产地花椒所含化学物质的差异性,旨在建立一种直观、快速和有效的花椒产地鉴别方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

共计 17 个花椒样品(见表 1)。所有的花椒样品在 45 ℃ 下干燥 24 h,经高速粉碎机粉碎后,取 0.5 g 研磨过 200 目筛,储存备用;

KBr:光谱纯,北京百灵威科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

傅里叶变换红外光谱仪:FT-IR NICOLET is10 型,赛默飞世尔科技有限公司;

压片机:YP-2 型,上海山岳科学仪器有限公司;

表 1 不同产地花椒样品

Table 1 The origin of 17 samples of *Zanthoxylum*

编号	样品名称	产地
Z1	韩城大红袍	陕西韩城
Z2	凤县大红袍	陕西凤县
Z3	茂县大红袍	四川茂县
Z4	越西贡椒	四川凉山
Z5	汉源花椒(正路椒)	四川汉源
Z6	汉源大红袍	四川汉源
Z7	九龙花椒	四川九龙
Z8	武都大红袍-1	甘肃武都
Z9	武都大红袍-2	甘肃武都
Z10	武都大红袍-3	甘肃武都
Z11	河南大红袍	河南济源
Z12	昭通青花椒	云南昭通
Z13	武都青花椒(九叶青)	甘肃马街
Z14	金阳青花椒-1	四川金阳
Z15	汉源青花椒	四川汉源
Z16	三台青花椒-1	四川三台
Z17	三台青花椒-2	四川三台

分析天平:Sartorius CPA225D 型,德国赛多利斯股份公司;

高速万能粉碎机:FW-100 型,北京中兴伟业仪器有限公司。

1.2 试验方法

花椒红外光谱测定:精确称取花椒样品 0.010 0 g 和 0.990 0 g KBr 混合研磨均匀后,取 0.1 g 花椒与 KBr 混合物压制成厚薄均匀的透明样品片。压片条件为:压力 20 kPa,时间 3 min。仪器分辨率为 4 cm⁻¹,扫描范 4 000 ~ 400 cm⁻¹,空气作为背景,扫描 32 次,每个样品平行测定 3 次。所有测定光谱图均扣除空气背景光谱。

1.3 红外分析的方法学考察

1.3.1 精密度试验 取同一份花椒样品片(本研究中所取的花椒样品为 1 号样品,即 Z1 韩城大红袍)连续测定 6 次,计算光谱图透过率和共有峰波数的 RSD 值,考察仪器精密度。

1.3.2 稳定性试验 取同一份储存的花椒样品(Z1 韩城大红袍)按 1.2 方法制样,每 2 h 测定一次,共测定 6 次,计算光谱图透过率和共有峰波数的 RSD 值,考察方法稳定性。

1.3.3 重现性试验 取同一份花椒样品(Z1 韩城大红袍),按 1.2 方法平行制备 6 份样品片,分别测定其光谱图。计算光谱图透过率和共有峰波数的 RSD 值,考察方法重现性。

1.4 数据处理

1.4.1 花椒红外二阶导数光谱图分析 红外光谱经二阶导数处理后可提高其分辨率,本试验采用 Savitsky-Golay 导数 33 点波数 3 进行二阶导数处理,得到特征峰突出,噪音小的二阶导数光谱图^{[21]18-20}。且根据花椒红外二阶导数光谱图出峰数目、峰形状和强度的差异判断不同产地花椒所含特征

物质的种类和含量。其中出峰位置可以对花椒中所含特征成分进行定性分析，峰强度表示花椒所含特征物质的含量。根据花椒红外光谱图中主要出峰位置，对花椒红外二阶导数光谱图中 3 000~2 500 cm⁻¹和 1 800~1 000 cm⁻¹两个波段出现的特征峰的峰高进行计算和比较分析。

1.4.2 花椒红外光谱双指标序列分析 双指标序列分析法可以同时表示样本中两两样品间的相似性和差异性，样品之间的相似性用共有峰率表示，样品之间的差异性用变异峰率表示^[19]。相关公式如下^[24-25]：

(1) 共性指标：

共有峰率 P ： $P=(N_g/N_d)\times 100\%$ ； (1)

共有峰数 N_g ：指在比较的两张红外指纹图谱中都出现的吸收峰的总数；

独立峰：在对比的两张红外指纹图谱中不同的吸收峰， $n_{a(b)}$ 为红外指纹图谱 a(b)中相对于其共有峰的非共有峰的峰数，称为 a(b)的变异峰数；

独立峰数 N_d ：指在比较的两张红外指纹图谱中的独立峰的总数， $N_d=N_g+n_a+n_b$ 。 (2)

(2) 变异性指标：

变异峰率 P_v ：指在该红外指纹图谱中变异峰数与其共有峰数的比值；

红外指纹图谱 a(b)的变异峰率 $P_{va(b)}:P_{va(b)}=[n_{a(b)}/N_g]\times 100\%$ 。 (3)

1.4.3 聚类分析 对花椒红外二阶导数光谱图中 3 000~2 500 cm⁻¹和 1 800~1 000 cm⁻¹两个波段出现的特征峰的峰高进行计算，将得到的数据导入 SPSS 22.0。利用组间连接法，欧氏距离的平方(Squared Euclidean Distance)为测度，对 17 个产地的花椒样品红外光谱相似性进行系统聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 红外分析的方法学考察

精密度试验结果表明，按 1.2 的试验方法测定 6 次所得的光谱图透过率和共有峰波数的 RSD 值分别小于 0.87%，0.06%。稳定性试验结果表明，按 1.2 的试验方法测定 6 次所得的光谱图透过率和共有峰波数的 RSD 值分别小于 0.81%，0.21%。重现性试验结果表明，按照 1.2 方法测定 6 次所得的光谱图透过率和共有峰波数的 RSD 值分别小于 2.05%，0.09%。

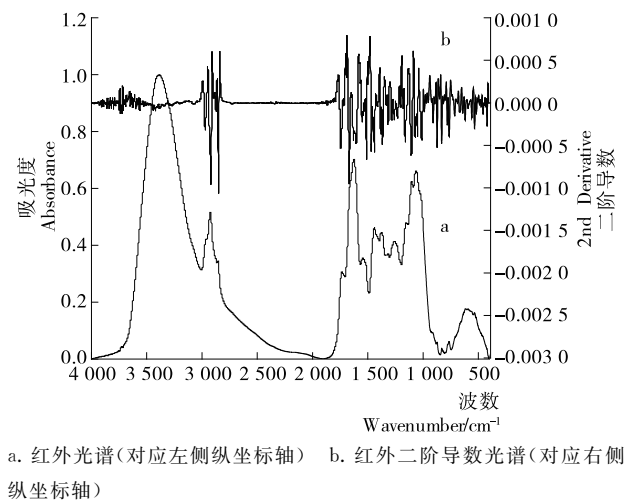
综上可知，花椒红外光谱图基本一致，且在精密度试验、稳定性试验和重现性试验中计算出 RSD 值均小于 3%，符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》(暂行)中的规定^[26]。

2.2 花椒红外光谱分析

按照 1.2 的试验方法测定 17 个花椒样品的红外光谱，并利用 OMNI 软件求出每种花椒的平均谱图。对求出的平均图谱进行自动基线校正、自动平滑、纵坐标归一化等预处理。

由图 1 中 a 曲线可知，花椒红外光谱主要分为 2 个波段：3 500~2 800 cm⁻¹和 1 700~1 000 cm⁻¹。对绝对峰值

大于 80%的峰标峰位，可以看出花椒的红外光谱图具有 17 个明显的吸收峰，其中在第一波段主要峰位置为 3 408.1, 3 363.0, 2 956.3, 2 925.8, 2 854.0 cm⁻¹。3 408.1 cm⁻¹附近宽强峰为蛋白质 N—O 伸缩振动、水分子中 O—H 收缩振动引起的吸收峰；3 375.0 cm⁻¹附近为羟基 O—H 收缩振动峰；2 956.3 cm⁻¹附近的吸收峰是甲基—CH₃的伸缩振动引起的；2 925.8 cm⁻¹和 2 854.0 cm⁻¹附近分别是亚甲基的顺式及反式伸缩振动引起的吸收峰^[27]。第二波段中主要的出峰位置为 1 738.1, 1 651.3, 1 628.3, 1 515.5, 1 441.6, 1 384.6, 1 319.3, 1 254.9, 1 156.2, 1 103.7, 1 060.0, 1 022.6 cm⁻¹。1 738.1 cm⁻¹附近是醛类物质中羰基 C=O 伸缩振动引起的吸收峰；1 651.3 cm⁻¹附近为酮的 C=C 吸收峰^[28]；1 628.3 cm⁻¹和 1 515.5 cm⁻¹附近分别为酰胺 I 带，酰胺 II 带的特征吸收峰^[18]；1 441.6, 1 384.6, 1 103.7~1 022.6 cm⁻¹为 C—H 键弯曲振动引起的吸收峰^[29]，再根据特征区 3 375.0 cm⁻¹的吸收峰基本上可判断 1 103.7~1 022.6 cm⁻¹为酚类物质的吸收峰；1 319.3 cm⁻¹和 1 254.9 cm⁻¹附近为羧酸酯类的 C—O—C 特征吸收峰。1 156.2 cm⁻¹附近为酸酐的振动吸收峰^[30]。红外光谱能从整体上反应出花椒含有化学成分的复杂性，即使不同产地花椒样品的红外光谱图大体一致，但是个别特征峰的出峰数目和强度会有所不同。直观地从图谱上得到的信息是有限的，需要对图谱进行二阶导数处理或其他方法结合以获得更多的信息。



a. 红外光谱(对应左侧纵坐标轴) b. 红外二阶导数光谱(对应右侧纵坐标轴)

图 1 5 号花椒红外光谱图与红外二阶导数光谱图

Figure 1 The infrared fingerprints and the second derivative of the infrared fingerprints of No.5 *Z. bungeanum* Maxim.

2.3 不同产地花椒红外二阶导数光谱图比较

红外光谱图经二阶导数处理后，峰宽变为原图谱峰宽的 1/3，使重叠在一起的峰相互分开，可以更准确地指认峰位，提高图谱的分辨率^[31]。在本试验中，各花椒样品的平均图谱经预处理后，采用 Savitsky-Golay 导数 33 点波数 3 进行二阶导数处理，得到特征峰突出、噪音小的二阶导数光谱图。花椒红外二阶导数光谱图可使不同特征物质吸收峰的差异性更显著，将不同产地和品种花椒红外光谱的区别进一步放

大。花椒红外光谱图经处理后得到花椒红外二阶导数光谱图见图 1 中 b 曲线。17 个花椒样品红外二阶导数光谱图分析结果:1 738 cm⁻¹ 的吸收峰为醛类物质的 C=O 的吸收峰,Z15(四川汉源)在此处的吸收峰强度最大,达到0.000 81,其次是 Z7(四川九龙)、Z8(甘肃武都)、Z13(甘肃武都)和 Z16(四川三台),峰强度最小的是 Z14(四川金阳),峰强度为 0.000 25,表明不同产地花椒醛类物质的含量有所不同;1 651 cm⁻¹ 处的吸收峰强度较大,可判断为是酮类物质的吸收峰^[32],其中 Z8(甘肃武都)的峰强度最大,峰高为0.001 91,其次是 Z12(云南昭通)、Z16(四川三台)、Z5(四川汉源)、Z6(四川汉源)和 Z2(陕西凤县),峰强度最低的是 Z1(陕西韩城)峰强度为 0.000 73,说明甘肃、云南、和四川地区花椒中含有的酮类物质较多,陕西地区花椒中所含酮类物质较少;1 628~1 515 cm⁻¹ 的吸收峰为酰胺类物质的吸收峰,可反映样品中蛋白质含量。Z16(四川三台)在此处的峰高最高分别为 0.000 72 和 0.001 03,其次是 Z17(四川三台)、Z6(四川汉源)和 Z14(四川金阳),峰高最低的是 Z8、Z9 和 Z10,这 3 个样品都是来自甘肃武都,由此可看出四川地区花椒蛋白质含量较多,产地为甘肃的花椒样品中蛋白质含量较少。该结果表明花椒蛋白质的含量与地域之间有较强的联系;1 103~1 022 cm⁻¹ 处的 3 个吸收峰对应的是酚类物质的吸收峰,花椒提取物的抗氧化活性与花椒中含有酚类物质密切相关。花椒样品在此处的吸收峰较强,这与赵晨等^[33] 研究结果中花椒提取物具有一定的抗氧化活性相一致。其中 Z1 此处的吸收峰峰高为 0.001 19,0.001 40,0.001 22,其次是 Z2,其峰高为 0.001 20,0.001 03,0.000 85,这两个样品的产地都是陕西。产自四川三台的 Z16 和 Z17 在此处的吸收峰的峰高也比较高,且峰高相近。产地为四川茂县的 Z3 在此处的吸收峰强度较小,分别为 0.000 74,0.000 45,0.000 53。根据此结果可以判断出陕西韩城大红袍和陕西凤县大红袍所含多酚类物质较多,该试验结果与张艳军^[34] 采用福林-酚比色法测定不同品种花椒多酚含量得出的相似。以上结果表明花椒所含特征成分的类型和含量与产地有较大的关系,受产地气候、土壤和当季降水量等的影响较大^{[35]16-33}。花椒所含特征成分的类型与含量的不同会影响花椒的性质与应用。如研究花椒提取物的抗氧化活性或是在医药中研究可以选择酮类或者酚类物质含量较多的花椒品种,或者选择适当产地的花椒样品。

2.4 不同产地花椒红外光谱共有峰率、变异峰率分析

共有峰是指该组内吸收峰波数差值的最大值明显小于该组吸收峰与其相邻吸收峰波数之差平均值的一吸收峰^[36]。如 2 925.8 cm⁻¹ 对应的一组峰,其平均波数为 2 922.8 cm⁻¹,组内波数差最大值为 9.0 cm⁻¹,相邻的前后两组峰的波数差平均值分别为 30.5 cm⁻¹ 和 71.8 cm⁻¹,明显大于 9.0 cm⁻¹,故可认为 2 925.8 cm⁻¹ 对应的一组为一组共有峰。

按 1.4.2 的方法对 17 批不同产地花椒的共有峰率和变异峰率进行双指标序列分析,结果表明 17 个材料可分为 3 组,即 A 组(表 2)、B 组(表 3)和 C 组(表 4),具体见表 2~4。

由以上序列可知,在表 2 中即 Z1~Z11 号样品为红花椒和大红袍,其共有峰率最大为 100%,最小为 74.6%,变异峰率最大为 12.5%,最小为 0,整体的相似度较高。共有峰率最高的是 Z8:Z10,高达 100%,Z8 和 Z10 都是产自甘肃省的武都大红袍,相同的产地,花椒的性质也几乎相同,其相似度如此之高也是符合实际情况的。共有峰率最低的是 Z1:Z5 和 Z1:Z7 都是 74.6%,Z1 是产于陕西韩城的大红袍,Z5 是产于四川越西,Z7 是产于四川省九龙县的红花椒。Z1 与 Z5 和 Z7 之间产地的地域差异较大造成共有峰率偏低,不同产地对于红花椒所含化学成分有一定的影响。

在表 3 中样品编号为 Z12~Z17,都是青花椒品种,共有峰率在 70.5%~93.3%,变异峰率在 0~17.4%,整体的相似度较低。共有峰率最高的是 Z14:Z17 和 Z16:Z17,共有峰率都是 93.3%,Z17 相对于 Z14 和 Z16 具有相同的变异峰率,为 6.7%。Z14、Z16 和 Z17 都是产自四川省的青花椒,其中 Z16 和 Z17 的产地都是四川三台,但是收获时期不同,说明青花椒所含化学成分的种类和收获时期有一定关系,受气候影响较大。纵观 A 组与 B 组数据,可以看出红花椒之间的共有峰率在整体上要高于青花椒之间的共有峰率,青花椒之间的变异峰率要高于红花椒之间的变异峰率,气候、土壤等条件对青花椒所含的化学物质影响较大,说明青花椒品质受产地的影响大于红花椒^[37]。

表 4 是红花椒与青花椒之间的对比,共有峰率最大为 87.5%,最小为 63.1%,变异峰率最大为 17.6%。不同产地红花椒与青花椒之间的相似性小于 87.5%,则表明红花椒与青花椒所含化学物质有较大的差异,说明不同种花椒品质之间相差较大,这与宋丽等^[38] 采用 HPLC 法得出的红花椒与青花椒品质相差较大结果一致,且该红外光谱技术操作较简单,无污染。

2.5 聚类分析

系统聚类可以根据样品之间的亲疏远近关系将样品分类,较适合样品数量较少时的聚类分析,最终输出树状图的聚类结果^[39]。本试验聚类分析结果表明,17 批花椒样品被分为 5 大类,花椒样品的红外光谱聚类分析树状图见图 2。其中第 I 类为 Z14、Z16 和 Z17,分别是来四川的三台和金阳,品种为青花椒;第 II 类是 Z13,其产地是甘肃武都,为青花椒;第 III 类是 Z5、Z8、Z4、Z7、Z3、Z9、Z6、Z10、Z11、Z2 和 Z1,该类是红花椒,其中 Z1 和 Z2 的距离最近,其产地都是陕西;第 IV 类是 Z15,其产地是四川汉源,品种为青花椒,根据花椒红外二阶导数图谱分析,Z15 在 1 738 cm⁻¹ 处的吸收峰最大,此处为醛类物质的吸收峰,花椒挥发油中含有较多的醛类物质,所以 Z15 被单独聚类;第 V 类是 Z12,来自云南昭通,品种为青花椒。以上结果表明,不同产地的花椒所含化学成分具有一定的差异性。在本研究中不同地区的青花椒所含化学成分差异性较大。如 Z12~Z17 都是青花椒,但是因产地相差大,而被系统分为不同类别,说明产地和环境因素对品质的影响青花椒大于红花椒,该结论与余晓琴^{[35]106-115} 对花椒 HPLC 指纹图进行聚类分析得到的结果一致。

表 2 不同产地红花椒红外光谱指纹图谱的双指标序列

Table 2 Dual-index sequential analysis of common and variant peak ratioin infrared fingerprint of *Z. bungeanum* Maxim. from different areas

序列	$(P;P_{va},P_{vb})$	序列	$(P;P_{va},P_{vb})$	序列	$(P;P_{va},P_{vb})$	序列	$(P;P_{va},P_{vb})$
Z1:Z2	(93.3;6.7,0)	Z3:Z10	(81.2;12.5,6.2)	Z6:Z8	(93.3;6.7,0)	Z9:Z5	(87.5;6.2,6.2)
Z1:Z3	(87.5;6.2,6.2)	Z3:Z11	(81.2;12.5,6.2)	Z6:Z9	(93.3;6.7,0)	Z9:Z6	(93.3;6.7,0)
Z1:Z4	(81.2;12.5,6.2)	Z4:Z1	(81.2;12.5,6.2)	Z6:Z10	(93.3;6.7,0)	Z9:Z7	(87.5;6.2,6.2)
Z1:Z5	(74.6;11.7,11.7)	Z4:Z2	(93.3;6.7,0)	Z6:Z11	(93.3;0,6.7)	Z9:Z8	(87.5;6.2,6.2)
Z1:Z6	(81.2;12.5,6.2)	Z4:Z3	(93.3;6.7,0)	Z7:Z1	(74.6;11.7,11.7)	Z9:Z10	(87.5;6.2,6.2)
Z1:Z7	(74.6;11.7,11.7)	Z4:Z5	(81.2;6.2,12.5)	Z7:Z2	(87.5;0,12.5)	Z9:Z11	(87.5;6.2,6.2)
Z1:Z8	(87.5;6.2,6.2)	Z4:Z6	(93.3;0,6.7)	Z7:Z3	(87.5;6.2,6.2)	Z10:Z1	(87.5;6.2,6.2)
Z1:Z9	(93.3;6.7,0)	Z4:Z7	(81.2;12.5,6.2)	Z7:Z4	(81.2;12.5,6.2)	Z10:Z2	(93.3;0,6.7)
Z1:Z10	(87.5;6.2,6.2)	Z4:Z8	(93.3;0,6.7)	Z7:Z5	(87.5;6.2,6.2)	Z10:Z3	(81.2;12.5,6.2)
Z1:Z11	(87.5;6.2,6.2)	Z4:Z9	(81.2;6.2,12.5)	Z7:Z6	(81.2;12.5,6.2)	Z10:Z4	(93.3;0,6.7)
Z2:Z1	(93.3;0,6.7)	Z4:Z10	(93.3;0,6.7)	Z7:Z8	(87.5;6.2,6.2)	Z10:Z5	(87.5;6.2,6.2)
Z2:Z3	(87.5;6.2,6.2)	Z4:Z11	(93.3;0,6.7)	Z7:Z9	(78.6; 0;21.4)	Z10:Z6	(93.3;6.7,0)
Z2:Z4	(93.3;6.7,0)	Z5:Z1	(74.6;11.7,11.7)	Z7:Z10	(87.5;6.2,6.2)	Z10:Z7	(93.3;6.7,0)
Z2:Z5	(81.2;6.2;12.5)	Z5:Z2	(81.2;6.2,12.5)	Z7:Z11	(87.5;6.2,6.2)	Z10:Z8	(100;0,0)
Z2:Z6	(86.7;6.7,6.7)	Z5:Z3	(87.5;6.2,6.2)	Z8:Z1	(87.5;6.2,6.2)	Z10:Z9	(87.5;6.2,6.2)
Z2:Z7	(87.5;0,12.5)	Z5:Z4	(81.2;6.2,12.5)	Z8:Z2	(93.3;0,6.7)	Z10:Z11	(87.5;6.2,6.2)
Z2:Z8	(87.5;6.2,6.2)	Z5:Z6	(87.5;12.5,0)	Z8:Z3	(81.2;12.5,6.2)	Z11:Z1	(87.5;6.2,6.2)
Z2:Z9	(93.3;0,6.7)	Z5:Z7	(87.5;6.2,6.2)	Z8:Z4	(93.3;0,6.7)	Z11:Z2	(93.3;6.7,0)
Z2:Z10	(93.3;0,6.7)	Z5:Z8	(87.5;12.5,0)	Z8:Z5	(87.5;12.5,0)	Z11:Z3	(78.5;0;21.4)
Z2:Z11	(93.3;6.7,0)	Z5:Z9	(87.5;6.2,6.2)	Z8:Z6	(93.3;6.7,0)	Z11:Z4	(93.3;0,6.7)
Z3:Z1	(87.5;6.2,6.2)	Z5:Z10	(87.5;6.2,6.2)	Z8:Z7	(87.5;6.2,6.2)	Z11:Z5	(78.6;7.2;14.2)
Z3:Z2	(87.5;6.2,6.2)	Z5:Z11	(81.2;6.2,12.5)	Z8:Z9	(87.5;6.2,6.2)	Z11:Z6	(93.3;0,6.7)
Z3:Z4	(93.3;6.7,0)	Z6:Z1	(81.2;12.5,6.2)	Z8:Z10	(100;0,0)	Z11:Z7	(87.5;6.2,6.2)
Z3:Z5	(87.5;6.2,6.2)	Z6:Z2	(87.5;6.2,6.2)	Z8:Z11	(87.5;6.2,6.2)	Z11:Z8	(87.5;6.2,6.2)
Z3:Z6	(93.3;6.7,0)	Z6:Z3	(93.3;6.7,0)	Z9:Z1	(93.3;6.7,0)	Z11:Z9	(87.5;6.2,6.2)
Z3:Z7	(87.5;6.2,6.2)	Z6:Z4	(93.3;0,6.7)	Z9:Z2	(93.3;0,6.7)	Z11:Z10	(87.5;6.2,6.2)
Z3:Z8	(81.2;12.5,6.2)	Z6:Z5	(81.2;12.5,6.2)	Z9:Z3	(81.2;12.5,6.2)		
Z3:Z9	(81.2;12.5,6.2)	Z6:Z7	(81.2;12.5,6.2)	Z9:Z4	(81.2;6.2,12.5)		

表 3 不同产地青花椒红外光谱指纹图谱的双指标序列

Table 3 Dual-index sequential analysis of common and variant peak ratioin infrared fingerprint of *Z. schiniifolium* Sieb. et Zucc. from different areas

序列	$(P;P_{va},P_{vb})$	序列	$(P;P_{va},P_{vb})$	序列	$(P;P_{va},P_{vb})$	序列	$(P;P_{va},P_{vb})$
Z12:Z13	(93.3;6.7,0)	Z13:Z16	(81.2;6.2,12.5)	Z15:Z13	(93.3;6.7,0)	Z16:Z17	(87.5;6.2,6.2)
Z12:Z14	(87.5;6.2,6.2)	Z13:Z17	(86.7;6.7,6.7)	Z15:Z14	(93.3;6.7,0)	Z17:Z12	(87.5;0,12.5)
Z12:Z15	(81.2;12.5,6.2)	Z14:Z12	(87.5;6.2,6.2)	Z15:Z16	(81.2;6.2,12.5)	Z17:Z13	(87.5;6.2,6.2)
Z12:Z16	(74.6;11.7,11.7)	Z14:Z13	(87.5;6.2,6.2)	Z15:Z17	(93.3;0,6.7)	Z17:Z14	(93.3;0,6.7)
Z12:Z17	(81.2;12.5,6.2)	Z14:Z15	(93.3;6.7,0)	Z16:Z12	(74.6;11.7,11.7)	Z17:Z15	(93.3;0,6.7)
Z13:Z12	(93.3;0,6.7)	Z14:Z16	(87.5;6.2,6.2)	Z16:Z13	(87.5;6.2,6.2)	Z17:Z16	(93.3;6.7,0)
Z13:Z14	(87.5;6.2,6.2)	Z14:Z17	(93.3;6.7,0)	Z16:Z14	(93.3;6.7,0)		
Z13:Z15	(93.3;6.7,0)	Z15:Z12	(81.2;12.5,6.2)	Z16:Z15	(87.5;6.2,6.2)		

表 4 不同产地红花椒与青花椒红外光谱指纹图谱的双指标序列

Table 4 Dual-index sequential analysis of common and variant peak ratioin infrared fingerprint between *Z. bungeanum* Maxim. and *Z. schiniifolium* Sieb. et Zucc. from different areas %

序列	(<i>P</i> ; <i>P</i> _{va} ; <i>P</i> _{vb})	序列	(<i>P</i> ; <i>P</i> _{va} ; <i>P</i> _{vb})	序列	(<i>P</i> ; <i>P</i> _{va} ; <i>P</i> _{vb})	序列	(<i>P</i> ; <i>P</i> _{va} ; <i>P</i> _{vb})
Z1:Z12	(76.4;11.7,11.7)	Z3:Z17	(87.5;6.2,6.2)	Z6:Z16	(86.6;6.7,6.7)	Z9:Z15	(86.6;13.3,0)
Z1:Z13	(87.5;6.2,6.2)	Z4:Z12	(78.9;10.5,10.5)	Z6:Z17	(70.5;17.6,11.7)	Z9:Z16	(87.5;6.2,6.2)
Z1:Z14	(86.6;13.3,0)	Z4:Z13	(81.2;12.5,6.2)	Z7:Z12	(82.3;11.7,5.8)	Z9:Z17	(87.5;6.2,6.2)
Z1:Z15	(85.7;14.2,0)	Z4:Z14	(75.0;12.5,12.5)	Z7:Z13	(70.5;17.4,11.7)	Z10:Z12	(76.4;11.7,11.7)
Z1:Z16	(86.6;6.7,6.7)	Z4:Z15	(80.0;13.3,6.7)	Z7:Z14	(82.3;11.7,5.8)	Z10:Z13	(81.2;12.5,6.2)
Z1:Z17	(87.5;6.2,6.2)	Z4:Z16	(87.5;6.2,6.2)	Z7:Z15	(81.2;12.5,6.2)	Z10:Z14	(87.5;6.2,6.2)
Z2:Z12	(86.6;6.7,6.7)	Z4:Z17	(82.3;5.8,11.7)	Z7:Z16	(75.0;12.5,12.5)	Z10:Z15	(87.5;6.2,6.2)
Z2:Z13	(86.6;6.7,6.7)	Z5:Z12	(63.1;15.7,15.7)	Z7:Z17	(75.0;12.5,12.5)	Z10:Z16	(87.5;6.2,6.2)
Z2:Z14	(87.5;6.2,6.2)	Z5:Z13	(87.5;6.2,6.2)	Z8:Z12	(66.6;16.6,16.6)	Z10:Z17	(86.6;13.3,0)
Z2:Z15	(92.8;7.1,7.1)	Z5:Z14	(70.5;17.4,11.7)	Z8:Z13	(81.2;12.5,6.2)	Z11:Z12	(76.4;11.7,11.7)
Z2:Z16	(92.8;7.1,7.1)	Z5:Z15	(81.2;12.5,6.2)	Z8:Z14	(86.6;6.7,6.7)	Z11:Z13	(81.2;12.5,6.2)
Z2:Z17	(88.2;5.8,5.8)	Z5:Z16	(81.2;12.5,6.2)	Z8:Z15	(86.6;13.3,0)	Z11:Z14	(87.5;6.2,6.2)
Z3:Z12	(76.4;11.7,11.7)	Z5:Z17	(77.7;11.1,11.1)	Z8:Z16	(86.6;6.7,6.7)	Z11:Z15	(86.6;13.3,0)
Z3:Z13	(81.2;12.5,6.2)	Z6:Z12	(64.7;17.6,17.6)	Z8:Z17	(86.6;6.7,6.7)	Z11:Z16	(87.5;6.2,6.2)
Z3:Z14	(87.5;6.2,6.2)	Z6:Z13	(75.0;12.5,12.5)	Z9:Z12	(76.4;11.7,11.7)	Z11:Z17	(87.5;6.2,6.2)
Z3:Z15	(86.6;6.7,6.7)	Z6:Z14	(85.7;7.1,7.1)	Z9:Z13	(86.6;13.3,0)		
Z3:Z16	(87.5;6.2,6.2)	Z6:Z15	(80.0;13.3,6.7)	Z9:Z14	(86.6;13.3,0)		

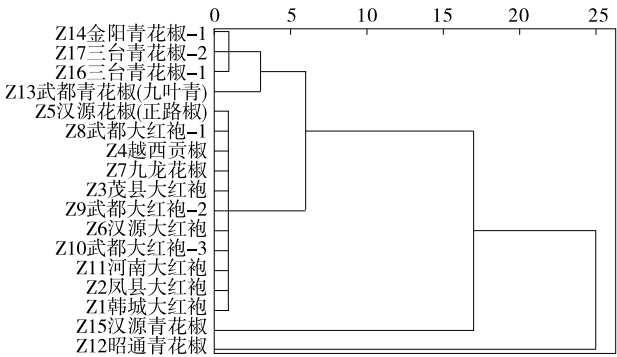


图 2 不同产地花椒红外光谱聚类分析结果

Figure 2 Result of clustering analysis with second derivative

3 结论

花椒药食同源,含有复杂的化学物质,其所含特征物质的类型和含量受土壤条件、气候变化等环境因素的影响,其中产地是影响花椒品质最主要的因素之一,具有较明显的本草学特点。红外光谱可以综合地反应不同产地或品种花椒之间化学成分的差异性和多样性。经过对花椒红外二阶导数光谱图的分析可比较出花椒中主要特征物质含量的情况,由分析结果可以清楚地看出花椒中醛类、酮类、酚类和蛋白质的含量受产地的影响较大。通过共有峰率、变异峰率双指标序列法可清楚地得知两种花椒之间的相似性。通过系统聚类分析可直观地看出不同产地花椒的分类情况,且分类情况与实际情况相符。故采用红外光谱技术结合共有峰率、变异峰率双指标分析法和聚类分析法等分析方法可快速、有效地对花椒进行产地鉴别。另外,本研究只对中国西

部地区所产花椒进行测定和分析比较,其他产地的花椒尚未涉及,且本研究采用红外光谱技术对花椒中所含化学物质进行了初步的定性测定,具体化学物质的定量测定还需深入研究。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 110.

[2] LI Ke-you, ZHOU Rui, JIA Wang-wang, et al. *Zanthoxylum bungeanum* Essential Oil Induces Apoptosis of HaCaT Human Keratinocytes.[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 186: 351-361.

[3] 阎红, 辛松林, 彭德川. 四川汉源地区青花椒和红花椒的气味指纹图谱分析[J]. 中国调味品, 2010, 35(4): 89-91.

[4] HUANG Shuai, ZHAO Lei, ZHOU Xian-li, et al. New alkyl-amides from pericarps of *Zanthoxylum bungeanum* [J]. Chinese Chemical Letters, 2012, 23(11): 1 247-1 250.

[5] 朱琳, 余晓琴, 阚建全. 花椒质量等级新要素探讨与分析[J]. 食品与机械, 2009, 25(2): 160-166.

[6] HATANO T, INADA K, OGAWA T O, et al. Aliphatic acid amides of the fruits of *Zanthoxylum piperitum* [J]. Phytochemistry, 2004, 65(18): 2 599-2 604.

[7] 徐林, 蒲彪, 蒋燕, 等. 藤椒水提液的体外抗氧化能力[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(2): 140-143.

[8] LI Wei, ZHOU Wei, SANNG S H, et al. Chemical constituents of *Zanthoxylum schiniifolium* (Rutaceae) [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 55(2): 60-65.

[9] 李倩. 不同产地青花椒主要营养及香气成分对比分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011: 14-19.

[10] CAO Yu-hua, GONG Wen-jun, LI Nan, et al. Comparison of microemulsion electrokinetic chromatography with high-performance liquid chromatography for fingerprint analysis of resina draconis[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 392(5): 1 003-1 010.

[11] 肖花艳, 易延遂. 中药材指纹图谱的研究概况[J]. 中国医药指南, 2012, 10(25): 292-294.

[12] 王燕, 王斌, 徐峰峰, 等. 基于聚类分析法和双指标分析法的淡菜红外指纹图谱比较研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(1): 178-182.

[13] 张玖, 姜洪芳, 张卫明. 花椒呈香部位的气相色谱指纹图谱研究[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(5): 49-52.

[14] 杜文倩, 史波林, 欧克勤, 等. 基于麻味物质构成特征的红花椒高效液相色谱指纹图谱建立研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 1 138-1 144.

[15] 董小玲. 菜籽品种可见近红外光谱鉴别研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(2): 64-67.

[16] 蔡皓, 秦昆明, 刘晓, 等. 用共有峰率和变异峰率双指标序列分析法分析百合的红外指纹图谱[J]. 红外, 2010, 31(11): 38-43.

[17] 董彬, 孙素琴, 周红涛, 等. 红外光谱和聚类分析法无损快速鉴别赤芍[J]. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(2): 232-234.

[18] 刘海静, 许长华, 李伟明, 等. 基于红外指纹图谱的螺旋藻品质分析和蛋白含量测定[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(4): 977-981.

[19] 单鸣秋, 姚晓东, 池玉梅, 等. 侧柏叶红外指纹图谱共有峰率和变异峰率双指标序列分析法[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(8): 2 092-2 095.

[20] 齐海燕, 武亚会. 花椒的红外光谱指纹图谱研究[J]. 中国调味品, 2014, 39(5): 111-113.

[21] 吉卉. 基于红外光谱的花椒品质快速检测技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.

[22] 王刚, 祝诗平, 阙建全, 等. 花椒挥发油含量的近红外光谱无损检测[J]. 农业机械学报, 2008, 39(3): 79-81.

[23] 李洋, 魏安智, 杨途熙, 等. 花椒生物碱和挥发油含量的近红外光谱无损检测[J]. 食品工业, 2012, 33(5): 122-125.

[24] 邹华彬, 袁久荣, 杜爱琴, 等. 甘草水提物红外指纹图谱共有峰率和变异峰率双指标序列分析法[J]. 中成药, 2004, 26(10): 779-783.

[25] 庞涛涛, 张绪言. 苦丁茶紫外图谱共有峰率和变异峰率双指标序列分析法[J]. 长江大学学报: 自科版, 2012, 9(1): 486-489.

[26] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671-675.

[27] 王燕, 王斌, 徐焕志, 等. 基于聚类分析和主成分分析法的淡菜醇提物红外指纹图谱[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1 146-1 152.

[28] 陈前锋, 侯鹏, 刘巧, 等. 红外光谱法快速鉴别不同产地中药党参的研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2016, 38(6): 188-194.

[29] BARTH A. Infrared spectroscopy of proteins[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2007, 1 767(9): 1 073-1 101.

[30] 毛晓丽, 覃禹, 蔡鹃, 等. 两面针红外指纹图谱与抗癌活性的谱效研究[J]. 红外与毫米波学报, 2013, 32(1): 91-96.

[31] 麦曦, 欧阳婷, 曹郁生, 等. 红外二阶导数指纹图谱用于紫花地丁药材的产地分类[J]. 理化检验: 化学分册, 2011(1): 12-14.

[32] 徐柏颐, 谈献和, 朱华云, 等. 黄蜀葵花红外指纹图谱的研究[J]. 中国现代中药, 2011, 13(4): 12-14.

[33] 赵晨, 李蓉, 邹国林. 桂丁、花椒挥发油抗氧化活性及其方法研究[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2008, 54(4): 447-450.

[34] 张艳军. 花椒黄酮和多酚含量及抗氧化活性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013: 33-36.

[35] 余晓琴. 花椒品质评价方法及其应用研究[D]. 北碚: 西南大学, 2010.

[36] 孔德鑫, 黄庶识, 黄荣韶, 等. 基于双指标分析法和聚类分析法的鸡骨草红外指纹图谱比较研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(1): 45-49.

[37] 余晓琴, 张丽平, 阙建全. 红花椒和青花椒 HPLC 指纹图谱的分析[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4): 171-174.

[38] 宋丽, 刘友平. 花椒与青椒 HPLC 指纹图谱的比较研究[J]. 中药材, 2012, 35(1): 39-42.

[39] 李晓燕, 李忠海, 杨代明, 等. 基于模糊聚类分析的辣椒制品表观辣度分级研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(2): 42-47.

(上接第 50 页)

[11] DEVI A F, LIU L H, HEMAR Y, et al. Effect of high pressure processing on rheological and structural properties of milk-gelatin mixtures[J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 1 328-1 334.

[12] MEULLENET J F C, CARPENTER J A, LYON B G, et al. Bi-cyclical instrument for assessing texture profile parameters and its relationship to sensory evaluation of texture[J]. Journal of Texture Studies, 1997, 28(1): 101-118.

[13] MESSENS W, WALLE D V D, AREVALO J, et al. Rheological properties of high-pressure-treated Gouda cheese[J]. International Dairy Journal, 2000, 10(5): 359-367.

[14] JOHNSTON D E, DARCY P C. The effects of high pressure treatment on immature Mozzarella cheese[J]. Milchwissenschaft-milk Science International, 2000, 55(11): 617-620.

[15] JUAN B, FERRAGUT V, GUAMIS B, et al. The effect of high-pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewes' milk cheese[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(2): 129-138.

[16] CHARLESOR O, JOHN R P, CARL J S. Influence of high-pressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(1): 61-67.

[17] KOCA N, BALASUBRAMANIAM V M, HARPER W J. High-pressure effects on the microstructure, texture, and color of white-brined cheese[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(5): E399-E404.

[18] SERRANO J, VELAZQUEZ G, LOPETCHARAT K, et al. Effect of moderate pressure treatments on microstructure, texture, and sensory properties of stirred-curd cheddar shreds[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(10): 3 172-3 182.