

怀区熟地傅里叶变换中红外光谱指纹图谱研究

李建军¹, 连笑雅¹, 王君², 任美玲¹, 尚星晨¹, 孙斌³

(1 河南师范大学 生命科学学院;绿色药材生物技术河南省工程实验室,河南 新乡 453007;

2 漯河食品职业学院 质量检测系,河南 漯河 462000;3 河南省百辽怀药科技开发有限公司,河南 焦作 454950)

摘要:目的:建立怀区熟地的中红外指纹图谱.方法:利用傅里叶变换中红外光谱技术结合对比分析软件对不同炮制方法、炮制时间的 10 个熟地样品的红外光谱进行测定分析.结果:(1)建立了怀区熟地指纹图谱,得到 13 个共有特征峰;(2)不同熟地指纹谱相似度较好,说明怀区大多数熟地样品的组分、质量相近;(3)聚类分析结果表明,除 9 号、10 号聚为一类,其他相同方法炮制的均聚为一类,可能是因为 9 号炮制时间为 2012 年,对熟地质量有影响.说明炮制方法、贮存时间对熟地品质有影响.结论:为鉴别不同炮制方法的熟地提供了一种简单、快捷、有效的手段,为地黄的深加工质量控制提供技术支撑.

关键词:怀区;熟地黄;傅里叶变换红外光谱;指纹图谱

中图分类号:0657.3

文献标志码:A

地黄[*Rehmannia glutinosa* Libosch.]为玄参科多年生草本植物,以道地产区河南“古怀庆府”一带的怀庆地黄栽培历史最长,产量最高,质量最佳,系著名“四大怀药”之一^[1-3].地黄依据加工程度分为鲜地、生地和熟地,其中熟地黄性味甘温,入肝肾具有非常好的养血滋阴、填精益髓的功效^[4].

由于中药化学成分的复杂多样性,因此任何单一成分含量高低不能准确完整地评价该中药质量,而以指纹图谱作为中药提取物及其制剂的质量评价及控制手段,已被世界卫生组织、中国国家食品药品监督管理局、美国食品药品监督管理局等机构接受^[5-6].其中,中红外指纹图谱已应用于中药品质评价和质量的鉴定,本实验初步建立了怀区熟地的傅里叶变换中红外光谱指纹图谱分析方法,并对不同炮制方法的熟地图谱进行比较,为怀区熟地的深加工以及品质评价和质量控制提供科学依据.

1 材料与仪器

1.1 植物材料

熟地黄药材为采自河南怀区主栽品种生地混品采用不同方法加工的 10 个样品,经河南师范大学李景原教授鉴定为 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 采用烘干粉碎方法获得熟地黄测试样品,粉碎后的样品过 60 目筛子,详见表 3.

1.2 主要仪器及试剂

安捷伦 1200 系列高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)、Thermo 自动双重纯水蒸馏器(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)、R501 型旋转蒸发器(上海普渡生化科技有限公司)、TENSOR II 傅里叶变换红外光谱仪(布鲁克(北京)科技有限公司生产)、769YP-15A 型粉末压片机(天津市科器高新技术公司)、DHY-300 超微粉碎机(北京东华原医疗设备有限责任公司);ZRD-A5110 电热恒温鼓风干燥箱(上海智城分析仪器有限公司制造);FA2204B 电子分析天平(上海菁海仪器有限公司).

收稿日期:2016-06-20;修回日期:2017-02-12.

基金项目:中医药公共卫生专项(财社[2011]76 号);中医药行业科研专项(201207002);河南省重点科技攻关项目(122102310283);河南师范大学 2014 年度国家级项目培育基金资助项目(2014PL15).

作者简介(通信作者):李建军(1964-),男,河南新乡人,河南师范大学副教授,主要从事药用植物资源及育种研究, E-mail: 043081@htu.cn.

药品:乙腈、甲醇、磷酸、超纯水、毛蕊花糖苷标品、溴化钾。

2 方法

2.1 指标成分测定

取熟地粉末 1 g,加 80% 甲醇 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,加水 5 mL 溶解残渣,用水饱和正丁醇振荡提取 4 次,每次 10 mL,合并正丁醇液,蒸干,加甲醇 2 mL 溶解残渣,作为供试品溶液。另取毛蕊花糖苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取供试品溶液 5 μ L、对照品溶液 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯—甲醇—甲酸(16:0.5:2)为展开剂,展开,取出,晾干,用 0.1% 的 2,2-二苯基-1-苦肼基无水乙醇溶液浸渍,晾干。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的颜色斑点^[1]。

2.2 样品制备

选择符合药典规定的熟地样品。取 2 mg 熟地粉末与 150 mg 溴化钾于研钵中,充分研磨后抽真空,加压(20 MPa) 3 min,取下模具,对光检视,以样片均匀,半透光为佳。

2.3 测定条件

光波范围为 400~4000 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描信号累加 16 次,样品扫描时扣除 H_2O 和 CO_2 的干扰。

2.4 精密度实验

取相同地黄样品,连续扫描测定 5 次,红外光谱相关系数分别为 0.999 9、1.000 0、0.999 9、0.999 8、0.999 8,样品中共有峰波数的 RSD 为 0.008%。

2.5 稳定性试验

取同一样品,于干燥器中保存,每隔 1 h 测定 1 次,测定 5 次,所得红外光谱相关系数分别为 0.999 6、0.999 7、0.999 6、0.999 8、0.999 8,RSD 为 0.01%,表明样品的稳定度良好。

2.6 重现性实验

同一样品分别称量、压片 3 次,分别测定,红外光谱的相关系数分别为 0.999 9、0.999 9、0.999 7、0.999 8、0.999 6,RSD 为 0.013%。表明方法的重现性良好。

2.7 数据处理

用 OPUS7.5 软件对图谱进行分析,用 Origin,Excel,SPSS 软件对地黄样品的红外谱图数据进行统计、相似度评价和聚类分析。

3 结果与分析

3.1 怀区不同加工方法熟地指标成分含量比较

怀区不同加工方法熟地毛蕊花糖苷含量见表 1。由表 1 可知,10 个熟地样品的指标成分含量均高于 0.02%,符合药典规定。其中 5 号的指标成分含量最高,为 0.071%,9 号的含量最低为 0.023%。从炮制方法来看,高压蒸制的熟地指标成分含量高于文火熏蒸和三蒸三晒。

3.2 怀区熟地中红外指纹图谱建立

按 2.6 样品制备方法将熟地供试品分别进行压片,并按选定的测试条件进行检测,测定所有熟地供试品红外光谱图(图 1)。以其吸收强度的平均值为对照指纹图谱的吸收强度,借助 Origin 软件作图,最终得到怀区熟地中红外指纹图谱(图 2)。经对所有怀区熟地红外光谱图的比较分析,由图 1、图 2 可知,1~13 号吸收峰依次为:3370 cm^{-1} ,2930 cm^{-1} ,2333 cm^{-1} ,1630 cm^{-1} ,1446 cm^{-1} ,1372 cm^{-1} ,1240 cm^{-1} ,1158 cm^{-1} ,1065 cm^{-1} ,1037 cm^{-1} ,863 cm^{-1} ,784 cm^{-1} ,632 cm^{-1} 。标定 13 个峰作为怀区熟地指纹图谱的共有特征峰。

3.3 共有峰的标定

根据文献[7-8]对主要红外吸收峰进行指认和归属,见表 2。由表 2 可知,3370 cm^{-1} 的吸收峰为糖类、氨基酸类的特征吸收峰,1630 cm^{-1} 的吸收峰为芳香环、地黄脑苷类、萜类的特征吸收峰,1240 cm^{-1} 、

1158 cm^{-1} 的吸收峰为环烯醚萜苷类的特征吸收峰,1065 cm^{-1} 、1037 cm^{-1} 的吸收峰为黄酮类、糖类、地黄脑苷类的特征吸收峰。

表1 不同加工方法熟地毛蕊花糖苷含量的比较

编号	加工方法	毛蕊花糖苷含量/%
1	文火蒸 24 h	0.039±0.000 6 ^{eE}
2	364.77 kPa, 晾凉之后, 再烘干	0.042±0.000 7 ^{eE}
3	303.975 kPa 40 min	0.067±0.001 8 ^{bB}
4	303.975 kPa 40 min	0.056±0.000 7 ^{cC}
5	303.975 kPa 40min(蒸后 60 °C 烘 12 h)	0.071±0.002 5 ^{aA}
6	303.975 kPa 40 min(蒸后 60 °C 烘 12 h)	0.057±0.001 1 ^{cC}
7	文火蒸 24 h	0.034±0.000 7 ^{fF}
8	364.77 kPa, 晾凉之后, 再烘干	0.053±0.000 7 ^{dD}
9	文火蒸 24 h	0.023±0.001 2 ^{gG}
10	三蒸三晒	0.033±0.002 5 ^{fF}

注:不同大、小写字母分别表示差异达 0.01 和 0.05 显著水平。

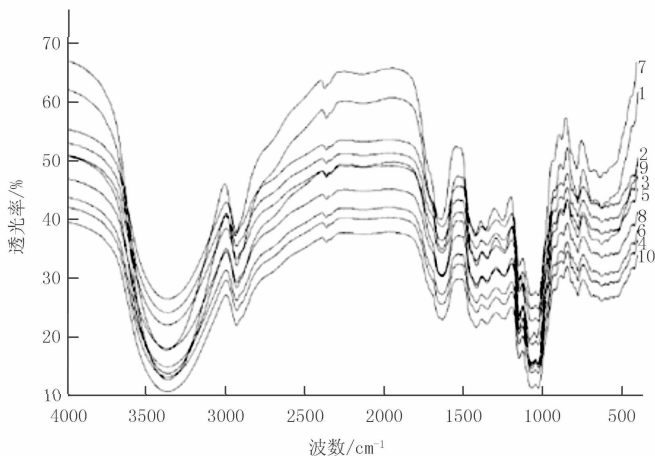


图1 怀区熟地中红外匹配图谱

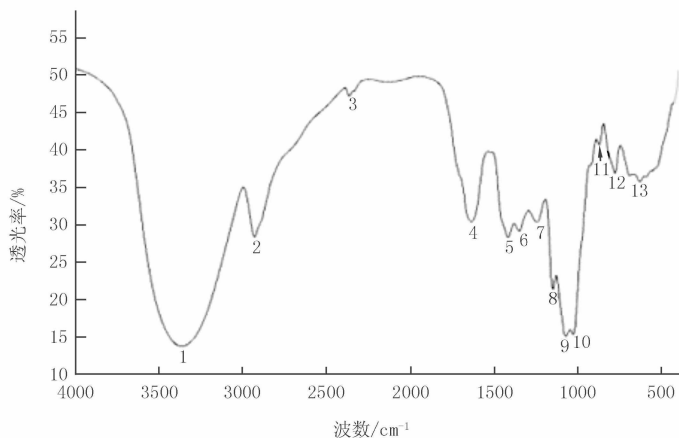


图2 怀区熟地中红外共有特征峰标定图

3.4 样品指纹图谱相似度分析

王栋等^[9]研究表明,用向量余弦法计算相似度时,不同样品的计算结果相似,而用相关系数法计算则能比较差异.因此,将怀地黄样品的红外图谱与怀地黄中红外指纹图谱进行相似度分析,采用相关系数法进行

计算,结果见表3.由表3可知,所有熟地相关系数均高于0.96,指纹谱相似度较好,说明怀区大多数熟地样品的组分、质量相近.

表2 怀区熟地中红外光谱图共有吸收峰的归属

序号	波数/cm ⁻¹	基团	归属
1	3370	$\nu(\text{O-H}), \nu(\text{N-H})$	糖类、氨基酸
2,3	2930,2333	$\nu(\text{CH}_2)$	糖类、氨基酸
4	1630	$\delta(\text{C=C}), \nu_{\text{rf}}(\text{ar})$	地黄脑苷类、萜类
5,6	1446,1372	$\delta(\text{C-H})$	地黄脑苷类、萜类
7,8	1240,1158	$\nu(\text{C-O-C})$	环烯醚萜苷类
9,10	1065,1037	$\nu(\text{C=O}), \nu(\text{C-OH})$	黄酮类、糖类、地黄脑苷类
11,12,13	863,784,632	$\nu_{\text{f}}(\text{C-C})$	长链亚甲基、糖环、烷烃类

注: ν (伸缩或骨架振动); δ (弯曲振动);ar(芳香结构); ν_{rf} (环状骨架)

表3 熟地样品中红外图谱相关系数

编号	采收时间	炮制时间	加工方法	相关系数
1	2015年	2015年	文火蒸24h	0.9912
2	2015年	2015年	364.77 kPa, 晾凉之后,再烘干	0.9779
3	2014年	2015年	303.975 kPa 40 min	0.9973
4	2015年	2015年	303.975 kPa 40 min	0.9983
5	2014年	2015年	303.975 kPa 40 min(蒸后60℃烘12h)	0.9748
6	2014年	2015年	303.975 kPa 40 min(蒸后60℃烘12h)	0.9748
7	2014年	2015年	文火蒸24h	0.9990
8	2015年	2015年	364.77 kPa, 晾凉之后,再烘干	0.9734
9	2012年	2012年	文火蒸24h	0.9636
10	2014年	2015年	三蒸三晒	0.9678

3.5 熟地黄 FTIR 数据聚类分析

采用SPSS软件对红外光谱进行比对,在400~4000 cm⁻¹选取吸光度值作为吸光度矩阵,用组间联接聚类法对怀区10个样品进行聚类分析,见图3.由图3可知,1号、7号聚为一类;3号、4号聚为一类;2号、5号、6号、8号聚为一类;9号、10号聚为一类,说明不同的加工方法、炮制时间对熟地有影响.

聚类分析结果表明,除9号(文火蒸24h)、10号(三蒸三晒)聚为一类,其他炮制方法相同的均聚为一类.可能是因为9号炮制时间为2012年,对熟地质量有一定的影响.该结果说明不同的炮制方法和贮藏时间对熟地的质量有影响.

4 结论与讨论

纵观历代本草,地黄的炮制方法有十多种,不同的炮制方法制备的炮制品质量不一,其功效也有所不同^[10].酒炖法是传统的熟地加工方法,

但是工期长,随着科技的发展以及对熟地需求量的增大,传统的炮制工艺已满足不了市场的需求.

本实验选用的熟地材料选用文火熏蒸、高压蒸制、三蒸三晒等方法,经测定毛蕊花糖苷含量均符合2015版《中国药典》规定.2号、3号、4号、5号、6号和8号采用高压蒸制,毛蕊花糖苷含量高于文火熏蒸的

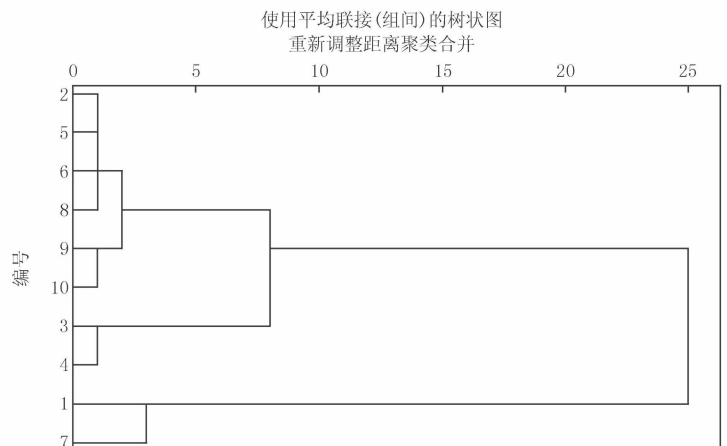


图3 熟地样品聚类分析结果图

1号、7号和9号及三蒸三晒的10号,其中9号毛蕊花糖苷含量最低,可能是因为贮存时间比较长,对熟地质量有影响,与魏国栋等^[11]研究相同。

本实验建立了怀区熟地中红外指纹图谱,得到13个共有特征峰,其红外图谱与中红外指纹图谱的相似度分析得出,所有熟地相关系数均高于0.96,不同炮制方法的熟地指纹谱相似度较好,说明怀区熟地样品的组分、质量相似。聚类分析结果表明,除9号(文火蒸24h)、10号(三蒸三晒)聚为一类,其他相同炮制方法均聚为一类,可能是因为9号炮制时间为2012年,对熟地质量有影响。说明炮制方法和贮存时间对熟地品质有影响。

本实验为鉴别怀区熟地黄优劣、区分不同炮制方法的地黄等提供了一种简单、快捷、有效的手段,为地黄的深加工及质量控制提供技术支持。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 115-117.
- [2] 王太霞, 司源, 李景原, 等. 怀地黄块根内含梓醇结构的组织化学和超微结构研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(5): 928-931.
- [3] 温学森, 杨世林, 魏建和, 等. 地黄栽培历史及其品种考证[J]. 中草药, 2002, 33(10): 946-949.
- [4] 温学森, 赵华英, 李先恩, 等. 地黄病毒病在不同品种中的症状表现[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(3): 225-227.
- [5] 彭川丛, 梁英娇. 中药指纹图谱研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2010, 26(11): 810.
- [6] Fan X H, Cheng Y Y, Ye Z L, et al. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 555: 217-224.
- [7] 刘友刚, 王威, 徐荣, 等. 肉苁蓉及其醇提物的傅里叶变换红外光谱研究[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(15): 1257-1260.
- [8] 姚霞, 孙素琴, 许利嘉, 等. 红外光谱法对野生和栽培枸杞子的鉴别与分析[J]. 医药导报, 2010, 29(8): 1065-1068.
- [9] 王栋, 王永禄, 郭啸, 等. 中药金礞石红外指纹图谱相似度分析[J]. 光谱学与分析化学, 2011, 31(10): 2715-2718.
- [10] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典: 古代部分[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1984.
- [11] 魏国栋, 刘焕, 温学森, 等. 关于中国药典熟地黄含量测定指标的商榷[J]. 中药材, 2013, 36(5): 853-856.

FTIR Fingerprint of Radix *Rehmannia glutinosa* Libosch Preparata in Fourier Transform

Li Jianjun¹, Lian Xiaoya¹, Wang Jun², Ren Meiling¹, Shang Xingchen¹, Sun Bin³

(1. Henan Engineering Laboratory, Biotechnology of Green Medicinal Materials; College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2. Department of Food Engineering Quality Inspection Department, Luohe Food Vocational College, Luohe 462000, China; 3. Henan Bai Liao Huai Yao Science & Technology Development Co., Ltd., Jiaozuo 454950, China)

Abstract: Objective: To establish the FTIR fingerprint of *Rehmannia glutinosa* Libosch in Huai Zone. Methods: The FTIR fingerprint combined with contrast analysis software was used to analyze the infrared spectra of 10 cooked samples of different processing methods and processing time. Results: (1) FTIR fingerprint of *Rehmannia glutinosa* Libosch in Huai Zone were established, 13 of them were common characteristic peaks; (2) The similarities of fingerprints of different *Rehmannia glutinosa* Libosch were good, which showed that the components and quality of most samples were similar. (3) The results of clustering analysis showed that, except for No. 9 and No. 10 were in one group, the other samples which were processed in the same methods were in one group, which was probably because the processing time of 9 was in 2012 and it affected the quality of *Rehmannia glutinosa* Libosch. The results showed that the processing method and storage time had an effect on the quality of *Rehmannia glutinosa* Libosch. Conclusion: It provided a simple, rapid and effective method for the identification of different processing methods of *Rehmannia glutinosa* Libosch, and provided a technical support for the deep processing quality control of *Rehmannia glutinosa* Libosch.

Keywords: Huai Zone; *Rehmannia glutinosa* Libosch; Fourier Transform Infrared Spectra; fingerprint