

红外光谱技术对生地黄整体评价

樊克锋¹, 汤法银¹, 赵建平¹, 王长林¹, 孙素琴²

(1 河南牧业经济学院, 郑州 450000, 2 清华大学, 北京 100084)

[收稿日期] 2016-12-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 03-0055-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为对中药材进行整体化学信息表征, 针对中药化学成分的整体多样性, 红外光谱特征具有化学信息整体全面性的特点, 采用红外光谱技术结合 HPLC 对生地黄进行较为全面的整体分析, 把生地黄生态、形态、化学及药学等特征和变化规律作了整体相关性讨论和量化分析, 对生地黄整体质量评价具有重要意义。

[关键词] 红外光谱; 生地黄; 整体分析; 相关峰值比

Integrated Evaluation of *Radix Rehmanniae* by FTIR Spectroscopy

FAN Ke-feng¹, TANG Fa-yin¹, ZHAO Jian-ping¹, WANG Chang-lin¹, SUN Su-qin²

(1. Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450000, China;

2. Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The chemical compositions of traditional Chinese medicine are diverse and complex, and they need to be analyzed and characterized objectively. While the infrared spectral is able to characterize and analyze the overall chemical information comprehensively by peak characterization and correlation peaks ratio calculation. In this study, infrared spectroscopy combined with HPLC are applied to analyze the overall chemical information for *Radix Rehmannia* comprehensively. The *Radix Rehmannia*'s biological, morphological, chemical and pharmaceutical properties are quantified, analyzed and discussed for its variation and correlation to each other. This study has a great significance for exhaustive quality evaluation of *Radix Rehmannia*.

Key words: FTIR; *Radix Rehmannia*; integrated evaluation; correlation peak ratio

地黄是最常用中药之一, 系玄参科植物地黄 (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) 干燥根茎。本品因加工炮制不同, 分为鲜地黄、生地黄和熟地黄。鲜地, 偏寒, 清热生津; 生地, 用以凉血止血; 熟地, 则偏于滋补阴血。地黄主产于河南, 山西、河北等地也有栽培。而产于河南武陟、温县等地(旧怀庆府)的地黄药材, 以其历史悠久、加工考究、质量上乘、

疗效确切等被列为著名的“四大怀药”道地药材之一。

红外光谱技术分析复杂混合体系的中药, 其光谱特征具有化学信息整体综合性特点与优势, 其指纹性如同单一组分一样, 光谱中的峰位、峰形、峰强度代表着体系中所含相应各种基团的谱峰, 它反映的是混合体系中各种成分的叠加谱, 不同混合体系

基金项目: 河南省青年骨干教师项目基金(2013GGJS-191)

作者简介: 樊克锋, 硕士, 从事利用现代分析手段对中药品质控制方面研究。E-mail: fanke333@aliyun.com

其相应的化学组成不同,会引起分子光谱整体谱图的变化,因此便构成谱图的整体宏观“指纹”性。凭借这些整体宏观“指纹”特征,可以直接地或者借助数学处理进行中药的鉴定与质量评价。针对红外光谱分析中药复杂混合体系,清华大学孙素琴教授根据混合物红外光谱整体宏观特征建立了一系列针对性方法,即“多级红外光谱宏观指纹分析法”^[1],其原则为:从整体分析到特征分析,先定性分析再量化分析。具体指导方法:首先,不分离,即分析。即样品无损、无化学处理,不破坏中药化学成分的整体性。次之,边分离,边分析。依光谱特征进行特定波段(特征峰)及特定化学部位分析。再者,边结合,边分析。第一,结合《中华人民共和国药典》^[2]及其他文献资料,把药学特征数字化图谱化(即“靠谱”);第二、结合其他如 HPLC 等方法进行分析,把中药生物学特征、化学性质及药学特点等进行相关分析,做到宏观整体定性分析和微观化学指标定量分析相结合,相互佐证,综合评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 自然阴干生地黄片 鲜地黄切片后置阴凉处室温直接阴干,粉末呈灰白色。作参考样品。

1.1.2 微波烘干生地黄片 鲜地黄切片后经过“微波特殊”加工制备,粉末呈淡黄色,功效相当于鲜地黄,具有清热生津、凉血、止血之功效,同时可以做茶煲、菜肴、罐头等功能食品新开发用途。

1.1.3 蒸气烘干生地黄 按照生地黄传统产地加工方法(土炕焙干法:装焙、看火候、翻焙、传焙、打圆等多个环节)通过改进给热方式,利用热蒸气进行生地黄产地加工。

上述3样品源均来自河南武陟饮片厂鲜地黄通货。前两者由河南中医药大学药学院实验室制备,后者由河南武陟饮片厂加工制备。

1.1.4 野生地黄 采集于河南沁阳神农山百草坡,低温烘干。

1.1.5 丹参及玄参饮片 购于北京同仁堂(郑州药店)。

以上5样品均经河南中医药大学药教研室

鉴定;均低温干燥、粉碎,过80目筛,备用。

1.1.6 地黄醚提物样品制备 分别定量称取生地黄和野生地黄粗粉样品,10倍量石油醚(30~60)浸提过夜,过滤,回收溶剂,浸提物放置至石油醚完全挥发,分别得醚提物,称量。备用。

1.1.7 水苏糖 中国药品生物制品检定所。

1.2 方法

1.2.1 仪器设备 Spectrum GX 型付里叶变换红外光谱仪,DTGS 检测器(Perkin-Elmer)。

1.2.2 测试条件 测定范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 中红外 DTGS 检测器,OPD 速度 $2 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,增益为1,扫描信号累加16次,分辨率 4 cm^{-1} ,实时扣除 H_2O 和 CO_2 。

1.2.3 红外方法 KBr 压片法制样,取过100目筛供试样品粉末3mg与200mg溴化钾(碎晶)混合研磨充分均匀,压片测定。

1.2.4 色谱方法 参照《中华人民共和国药典》(一部)地黄项下梓醇含量高效液相法测定^[2]。色谱条件:ODSC18 色谱柱,流动相乙腈-水(0.6:99.4);流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 210 nm;柱温 25°C 。

2 结果

2.1 生地黄经典红外光谱分析

2.1.1 生地黄主体成分特征峰分析 首先从宏观整体出发,“不分离,即分析”,分析生地黄主体成分红外特征峰。生地黄是主成分为高水苏糖类中药^[3],主成分峰(1051 cm^{-1})为单强峰,形似“菩萨身”。也就是说生地黄是主成分为水苏糖为主的低聚糖类中药,其经典红外光谱主成分峰具“菩萨身”典型特征(图1)。

2.1.2 中药红外光谱分类分析 中药中往往含有一种多种分子结构相近的化学成分,因其包含相同或相近的官能团而具有相似的红外吸收特征。某一成分含量越高,其对应吸收峰的红外光谱特征也强。所以,可根据中药的红外光谱特征对其主成分或特征成分进行分类分析或特征分析。

如图2所示,根据主成分峰似“菩萨身”红外整体特征,常见中药如生地黄、玄参、黄精、玉竹、丹

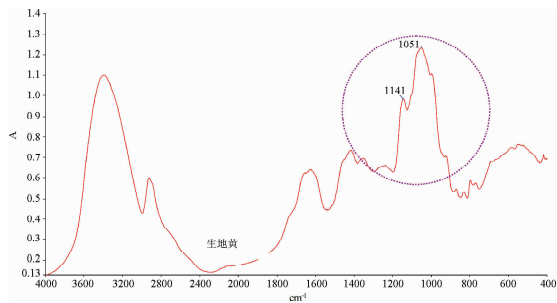


图1 生地黄整体红外光谱及主成分“菩萨身”特征峰

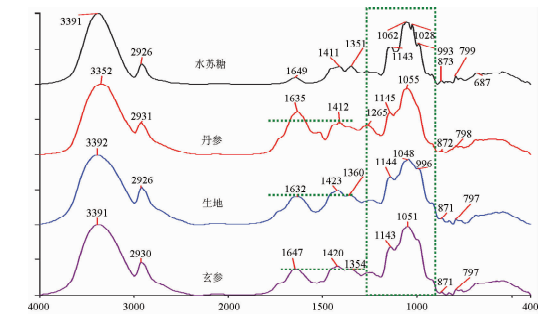


图2 菩萨身特征的中药红外分类法

参、天冬、麦冬、巴戟天等,这些中药的主体成分都是以多糖类化合物为主。尽管这些中药具有相似的主体“菩萨身”特征峰,但图谱还有其他特征差异,如图2所示,丹参、生地和玄参经典红外光谱很相似,但其1635和1412 cm⁻¹等峰位和相对峰强还有明显差异。为了提高差异性,也可通过二阶导数谱和二维相关谱进行鉴定和分析^[4-10]。

2.2 生地黄红外光谱特征峰或特定化学部位分析

在“不分离,即分析”的基础上,根据光谱特征及分析需要进行特定波段或特定化学部位的“边分离,边分析”。

如图3所示,通过图谱选点(1632 cm⁻¹)归一化处理,能够明显分辨野生和栽培生地黄主成分“菩萨身”单强峰(1051 cm⁻¹)相对强度有差异。再者是特征峰(1710 cm⁻¹)有明显差异,即野生地黄有明显的1710 cm⁻¹特征峰,而栽培生地黄略显特征,由此判断野生地黄较栽培含有较高油脂类成分。试验测定其醚提物含量:野生地1.2%、栽培生地0.4%,符合红外光谱1710 cm⁻¹特征峰表征。

同时,分别对野生和栽培生地黄二者醚提物进

行红外分析,结果如图4所示,二者均有很强的-CH₂-伸缩振动吸收峰如2925、2854 cm⁻¹,有较-CH₂-弯曲振动吸收峰如1464、1377 cm⁻¹,且都有一个中等强度吸收峰722 cm⁻¹,说明二者醚提部位中-(CH₂)_n-亚甲基链较长(n≥4);由宽强峰3410或3433 cm⁻¹、中强峰1713或1740 cm⁻¹ C=O吸收以及1275和1168 cm⁻¹-COOH弯曲振动吸收双峰可以推断二者醚提部位成分中均有-COOH基团,从而推知二者醚提部位主要是长链脂肪酸。

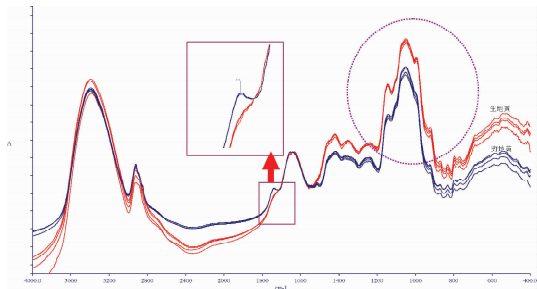


图3 野生和栽培生地黄选点(1632 cm⁻¹)归一化红外特征光谱

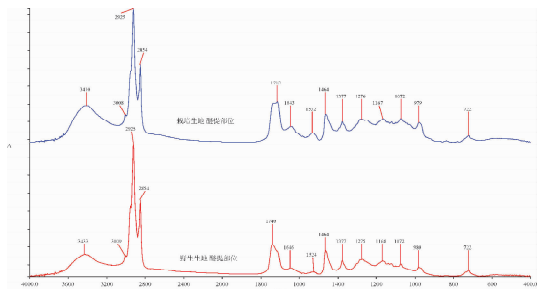


图4 野生和栽培生地黄醚提部位红外光谱

2.3 红外光谱对生地黄产地加工整体分析

2.3.1 生地黄多因素综合相关性评价分析

生地黄质量不仅受到生态环境影响,其不同加工方法和加工程度对生地黄质量也有影响。

对于(自然阴干、微波烘干和蒸气烘干)三个不同加工的生地黄样品,分别对其进行整体红外光谱分析和梓醇的HPLC分析,结合粉末颜色特征变化及药典描述,结果如图5-图7及表2所示,三者加工方法和加工程度不一样,其粉末颜色、主成分峰相对强度及梓醇含量都不一样,但具有良好的相关性。



图5 自然阴干、微波烘干和蒸气烘干生地黄粉末颜色

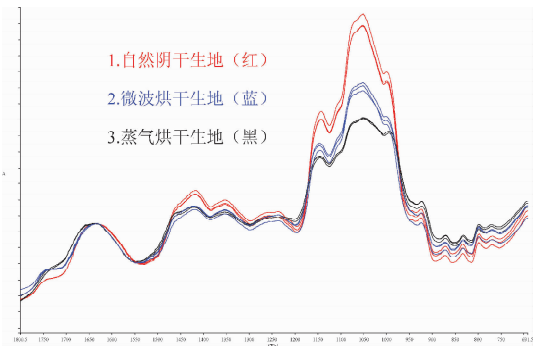


图6 自然阴干、微波烘干和蒸气烘干生地黄选点(1632 cm⁻¹)归一化红外光谱

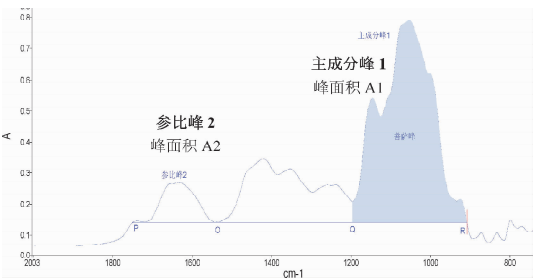


图7 生地黄红外光谱主成分峰-1和参比峰-2归一化处理图谱

表2 生地黄加工方法-加工程度-粉末颜色-梓醇含量-性状特征和红外图谱等相关性分析表					
加工方法	加工程度	粉末颜色	菩萨身段	梓醇含量	《中国药典》中生地黄性状特征描述
自然阴干	自然态	灰白	瘦高	3.98%	表面棕灰色,断面棕黑或乌黑色,有光泽,具黏性。
微波加热	轻加工	淡黄	微胖	3.06%	气微,味微甜。粉末深棕色,有橙黄色或橙红色油滴状物。梓醇≥0.20%。
蒸气烘干	深加工	棕黄	肥胖	2.49%	

如表2所示,三样品相比较加工程度加深,粉末颜色也由“灰白-淡黄-棕黄”加深,菩萨身段也由“瘦高-微胖-肥胖”,三因素呈正相关。而梓醇含量是由高到低,与前因素呈负相关。所以,利用这种正负相关性多因素综合评价生地黄质量比用指标成分(梓醇)评价更加客观。严格来说,《药典》单纯规定梓醇含量不低于0.2%是不客观的评价指标。

2.3.2 生地黄产地加工程度量化分析 为了避免样品用量、光程长度等因素导致的单一特征“菩萨峰”光谱强度差异的影响,需要选择相关吸收峰做为参比峰,其二者确定的相关峰值比(峰面积比A1/A2或比峰高H1/H2)是可信的量化指标。如图7所示,对三样品红外光谱分别基线校正及归一化处理,即:基线校正后以O点为最低基点进行归

一化处理,其水平基线分别与样品红外光谱交与P、R两点,另选主成分峰光谱特征点引竖直垂线交与水平基线于Q点,分别选定QR波段和OP波段做为主成分峰-1和参比峰-2,若设其峰面积分别

为A1和A2,则A1/A2表示为“相关峰值比”。用“相关峰值比(A1/A2)”来量化表征生地黄加工过程中主成分“菩萨峰”的变化趋势和变化程度,则得到如表3量化值。

表3 生地黄不同加工方法和加工程度相关因素量化分析表

加工方法	批次1 A1/A2	批次2 A1/A2	批次3 A1/A2	平均 A1/A2	标准 偏差	主成分峰 菩萨身特征	梓醇 含量
自然阴干	7.73	7.58	7.82	7.71	0.099	瘦高	3.98%
微波烘干	6.77	6.58	6.82	6.72	0.103	微胖	3.06%
蒸气烘干	5.12	5.42	5.20	5.25	0.127	肥胖	2.49%

由表3可知,(自然阴干、微波烘干和蒸气烘干)三个不同批次加工的生地黄样品,不同的加工方法其加工程度不同。加工程度越深,相关峰值比(A1/A2)越小,主成分“菩萨身”特征峰身段越胖,而梓醇含量越低;从平均A1/A2值和标准偏差结果来看,不同加工方法差异显著,而不同加工批次差异微小,表明其结果具有较高的可信度。即利用“相关峰值比”评价生地黄产地加工程度具有“整体客观性和标准量化性”特点,相比用一个或几个指标成分更可靠可行。

3 讨论

3.1 红外光谱对生地黄整体质量评价的意义 对于中药来说,大多都会受到诸如生态环境、种植采收、产地加工等多种因素影响,因而其中药化学成分也极其复杂,不仅是“整体多样性”,同时也具“个体差异性”;再者还要受炮制加工、复方组合、制剂工艺、研究水平等因素影响,进而还存在或产生不少“灰色未知性”。所以单靠一个或几个指标成分(尤其非专属性指标成分)是无法全面客观真实表征中药整体内在质量的。

对于地黄来说,其产地加工的方法技术和工艺水平是影响其内在质量的一个重要因素,而单用指标成分梓醇或毛蕊花糖苷是无法客观整体评价生地黄的质量品质。试验利用红外光谱技术结合HPLC分析方法,“从整体到特定,先定性再定量”,对生地黄生态特征、化学成分及药学特点等进行整体相关分析,得到比较客观真实的整体量化标准,进而可有效评价生地黄产地加工程度,对控制生地黄内在质量品质具有重要指导意义和可行性探讨。

3.2 生地黄(中药)红外光谱质量标准建立的可行性探讨 虽然红外光谱能提供生地黄(中药)复杂

混合物的整体特征信息,但利用红外光谱技术对生地黄(中药)进行内在质量评价目前还更多的处于方法学探讨之中^[11-13]。那么要建立生地黄(中药)红外光谱质量标准还是一个艰巨的任务并有一定的距离。完成这一任务需要一定的突破和大量的工作:即包括“中药质量标准的客观认识、生地黄(中药)标准样品的合理选定、红外光谱方法学的科学制订及生地黄(中药)红外光谱数据库的合作建立”。

4 结论

中药和红外是一对天然组合。和中医思想一样中药化学成分的特点同样具有“整体观”:即天然的、多样的、相关的、相对的、相生的……,此整体多样性特点满足了中医临床整体辩证施治的需要。而红外光谱特征的信息整体性能够客观表征中药化学成分的整体多样性。所以,通过本试验表明,利用红外光谱技术并结合计算机软件、数学理论和化学语言能够较好的客观表征中药化学成分的整体多样性及个体差异性,在中药整体质量评价方面具有很好的指导意义和可行性探讨。

中(兽)药现代化的发展进程中,必须处理好继承与创新的关系,应把中(兽)药按照“传统中药和现代中药”分类管理,在标准、法规、政策等上应区别对待。尤其传统中药应重在传承应用,完善并修订检验标准,构建适合中药特点的标准化体系,重点突出“整体质量评价和过程质量控制”,红外光谱技术以其方便、快捷、无损等优势和特点将具有巨大的应用前景。

参考文献:

[1] 孙素琴,周群,陈建波. 中药红外光谱分析与鉴定[M]. 北

- 京:化学工业出版社,2010,30.
- [2] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》(一部)[S].
- [3] 孙素琴,周 群,陈建波. 中药红外光谱分析与鉴定[M]. 北京:化学工业出版社,2010,78.
- [4] 孙素琴,周 群,秦 竹. 中药二维相关红外光谱鉴定图集[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [5] 孙素琴,梁曦云,杨显荣. 六色灵芝的 FTIR 快速无损鉴别. 光谱学与光谱分析[J],2002,22(2):226-228.
- [6] 孙素琴,王米渠,梁曦云,等. 枸杞子四种原性状的 FTIR 光谱法鉴别. 光谱学与光谱分析[J],2001,21(6):787-789.
- [7] 王 琪,胡鑫尧. 三维光谱学——二维红外光谱和时间分辨光谱[J]. 光谱学与光谱分析,2000,20(2):175-179.
- [8] 孙素琴,袁子民,白 雁. 红外指纹图谱与计算机辅助解析技术鉴别山药的道地性[J]. 计算机与应用化学,2002,19(1):77.
- [9] 白 雁,孙素琴,樊克锋,等. 红外二阶导数谱对地黄及不同提取部位、炮制品的鉴定. 中草药,2006,37(11):1661-1663.
- [10] 樊克锋,汤法银,孙素琴,等. FTIR 多级图谱对山茱萸及其掺伪品的鉴别. 光谱学与光谱分析,2008,28(10):93-94.
- [11] 樊克锋,汤法银,孙素琴,等. 酒制熟地黄炮制过程中梓醇变化趋势和变化机理. 中国兽药杂志,2007,41(10):22-24.
- [12] 樊克锋,赵建平,汤法银,等. 现代 FT-IT 对固体制剂过程质量控制的探讨[J]. 河南畜牧兽医,2006,27(10):37-38.
- [13] 白 雁,樊克锋,李 军,等. 不同方法加工生地黄地的 2D-IR 和 HPLC 检测结果相关性比较[J]. 中国中药杂志,2005,30(7):504-507.

(编辑:陈 希)