

FT-IR 和 HPLC 对不同产地大黄药材的鉴别分析¹⁷

单家明, 孟 岩, 李焜仪, 熊 豪, *杨武亮

(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 江西, 南昌 330004)

摘 要: **目的** 采用傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 和高效液相色谱 (HPLC) 方法对 37 批不同品种和产地的大黄药材进行分析。 **方法** 分别采用 FT-IR 和 HPLC 测量 37 批大黄药材的红外光谱和液相指纹图谱, 并对结果进行聚类分析。从每一产地中选择一批药材, 分析红外原始光谱, 并对原始光谱进行二阶导数处理, 根据所得二阶导数光谱对各产地大黄进行分析; 同时对 HPLC 指纹图谱进行相似度分析。 **结果** FT-IR 和 HPLC 两种方法聚类分析结果基本一致。通过分析不同产地的大黄药材原始红外光谱特征峰能够区分各产地大黄品种, 但无法区分其产地, 而二阶导数特征峰有明显的位置、形态和强度上的差异, 能够将不同产地大黄药材鉴别出来。HPLC 指纹图谱相似度分析无法将其产地进行区分。 **结论** 与 HPLC 指纹图谱相比, FT-IR 能够更加全面的反映大黄药材的化学成分, 并对其品种和产地进行区分。

关键词: 傅里叶变换红外光谱; 高效液相色谱; 大黄; 聚类分析; 产地区分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.3669/j.issn.1674-8085.2021.04.018

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF RHUBARB MEDICINAL MATERIALS FROM DIFFERENT HABITATS BY FT-IR AND HPLC

SHAN Jia-ming, MENG Yan, LI Wu-yi, XIONG Hao, *YANG Wu-liang

(Key Laboratory of Modern Preparation of TCM of Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang, Jiangxi 330004, China)

Abstract Objective: To analyze 37 batches of rhubarb medicinal materials of different varieties and origins.

Methods: FT-IR and HPLC methods were used to measure the infrared spectrum and Liquid phase fingerprint of 37 batches of rhubarb, and cluster analysis were conducted. A batch of medicinal materials from each place of origin was selected for further analysis, the original infrared spectrum was analyzed and processed with the second derivative of the original spectrum. According to the obtained second derivative spectrum, the rhubarb of each origin was analyzed; the similarity of the HPLC fingerprint was also analyzed. **Results:** The results of cluster analysis by FT-IR and HPLC were basically consistent. The varieties of rhubarb from different regions could be distinguished, but their origins could not be distinguished. The second derivative characteristic peaks had obvious differences in position, shape and intensity, which could be used to distinguish rhubarb medicinal materials from different origins. The origins could not be distinguished by HPLC fingerprint similarity analysis. **Conclusion:** Compared with HPLC fingerprint, FT-IR can reflect the chemical composition of rhubarb more comprehensively, and distinguish the varieties and origins.

Key words: FT-IR; HPLC; rhubarb; cluster analysis; origin distinction

大黄是蓼科植物掌叶大黄 (*Rheum palmatum* Balf.) 或药用大黄 (*Rheum officinale* Baill.) 的干燥根和根茎, 具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、

收稿日期: 2020-12-12; 修改日期: 2021-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81760680)

作者简介: 单家明 (1996-), 男, 江西抚州人, 硕士生, 主要从事药物分析研究(E-mail: 2547130384@qq.com);

孟 岩 (1994-), 男, 黑龙江塔河人, 硕士生, 主要从事药物分析研究(E-mail: 450220051@qq.com);

李焜仪 (1995-), 女, 山西长治人, 硕士生, 主要从事药物分析研究(E-mail: 614922601@qq.com);

熊 豪 (1996-), 男, 江西丰城人, 硕士生, 主要从事药物分析研究(E-mail: 2455386979@qq.com);

*杨武亮 (1965-), 男, 江西南昌人, 教授, 博士生导师, 主要从事中药质量评价与新药研究(E-mail: yangwuliang@163.com).

逐瘀通经、利湿退黄的功效^[1]，其中具有泻下作用的是蒽醌类物质^[2-4]。大黄主产于甘肃、青海、四川、重庆等地。作为多产区药材，由于地理环境和气候因素的影响，不同产地的大黄在化学成分的组成和含量上必定存在一些差异^[5]。高效液相色谱(HPLC)从化学成分的角度对中药进行分析，是目前中药分析鉴别最常用的方法之一^[6]，但该方法的样品制备过程往往较为复杂。傅里叶变换红外光谱(FT-IR)具有操作简单、样品需求小和分析迅速等特点^[7]，同时，红外光谱从整体性的角度对中药材进行分析，能够对中药的原始信息进行最真实的反映，对于同一中药，其化学成分的差异能够通过红外光谱中吸收峰的数目、位置、强度及形态表现出来^[8]。本研究分别采用上述两种方法对 37 批大黄药材进行分析，并对其品种和产地进行了区分。

1 仪器与试药

1.1 仪器与软件

仪器：万分之一天平（型号：Sartorius BT 224 S，北京赛多利斯仪器系统有限公司）；十万分之一电子天平（Sartorius BT 25 S，北京赛多利斯仪器系统有限公司）；Spectrum Two 傅里叶变换红外光谱仪（Perkin Elemer 公司）；Agilent 1260 高效液相色谱仪（包括四元泵、在线脱气机、自动进样器、DAD 检测器和色谱工作站）。

软件：OMNIC 8.2 红外分析软件、中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 软件。

1.2 药材与试剂

1.2.1 药材

掌叶大黄标准药材（批号：121249-201304）、药用大黄标准药材（批号：120984-201202）；芦荟大黄素（批号：110722-201815）、大黄酸（批号：110721-201818）、大黄素（批号：111857-201703）、大黄酚（110796-201621）、大黄素甲醚（110758-201616），均购自中国食品药品检定研究院。芦荟大黄素-8-O- β -葡萄糖苷（批号：PS1497）、芦荟大黄素-3-（羟甲基）-O- β -D-葡萄糖苷（批号：PS1495）、大黄酸-8-O-葡萄糖苷（批号：PS1697）、大黄酚-1-O- β -D-葡萄糖苷（批号：PS1506）、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷（批号：PS1507）、大黄素甲醚-8-O- β -D 葡萄糖苷（批号：PS1508）、大黄素甲

醚-1-O- β -D 葡萄糖苷（批号：PS1524）、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷（批号：PS1521），均购于成都普思生物科技股份有限公司，含量 HPLC 归一化均为 98%。

所有大黄均由江西樟树药都制药有限公司提供，经江西中医药大学赖学文教授鉴定。大黄品种及产地详见表 1。

表 1 样品信息
Table 1 Information of sample

编号	品种	产地
1	药用大黄	四川省平武县
2	药用大黄	重庆市奉节县
3	药用大黄	重庆市奉节县
4	药用大黄	重庆市奉节县
5	掌叶大黄	甘肃陇南市武都区
6	掌叶大黄	甘肃礼县
7	掌叶大黄	甘肃宕昌县
8	药用大黄	湖北省恩施州板桥镇
9	掌叶大黄	青海省大通县
10	掌叶大黄	甘肃礼县
11	掌叶大黄	甘肃武都
12	掌叶大黄	甘肃礼县
13	掌叶大黄	甘肃礼县
14	掌叶大黄	甘肃礼县
15	掌叶大黄	甘肃陇南市武都区
16	掌叶大黄	甘肃陇南市武都区
17	掌叶大黄	甘肃宕昌县
18	掌叶大黄	甘肃宕昌县
19	掌叶大黄	甘肃宕昌县
20	掌叶大黄	甘肃陇南市武都区
21	掌叶大黄	甘肃礼县
22	掌叶大黄	甘肃陇南市武都区
23	掌叶大黄	甘肃宕昌县
24	掌叶大黄	甘肃宕昌县
25	掌叶大黄	甘肃礼县
26	掌叶大黄	甘肃礼县
27	掌叶大黄	甘肃宕昌县
28	掌叶大黄	甘肃宕昌县
29	掌叶大黄	甘肃宕昌县
30	掌叶大黄	甘肃陇南市武都区
31	掌叶大黄	甘肃礼县
32	掌叶大黄	甘肃陇南市武都区
33	掌叶大黄	甘肃礼县
34	掌叶大黄	甘肃礼县
35	掌叶大黄	甘肃陇南市武都区
36	掌叶大黄	甘肃陇南市武都区
37	掌叶大黄	甘肃陇南市武都区

1.2.2 试剂

溴化钾（光谱纯，上海麦克林生化科技有限公司）；甲醇（AR 级）；甲醇（HPLC 级）。

2 方法

2.1 供试品与混合对照品的制备

2.1.1 红外供试品的制备

取大黄粉碎, 过五号筛, 置于烘箱中 60°C 干燥 2 h, KBr 粉末置于烘箱中 120°C 干燥 4 h, 备用。取粉碎后的大黄粉末约 2 mg 与 KBr 粉末按 1:100 混合, 在研钵中研磨, 在 10 t 的压力下压成薄片。

2.1.2 HPLC 供试品的制备

取大黄粉末(过四号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL 并称重, 水浴回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, $0.45\ \mu\text{m}$ 膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 大黄混合对照品的制备

精密称定各对照品, 分别置容量瓶中配制成母液; 用移液管精密吸取上述各对照品母液适量, 置于 25 mL 容量瓶, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得含芦荟大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷 $25.93\ \mu\text{g/mL}$ 、大黄酸-8-O-葡萄糖苷 $6.10\ \mu\text{g/mL}$ 、大黄酚-1-O- β -D-葡萄糖苷 $13.25\ \mu\text{g/mL}$ 、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷 $33.26\ \mu\text{g/mL}$ 、芦荟大黄素-3-(羟甲基)-O- β -D-葡萄糖苷 $16.24\ \mu\text{g/mL}$ 、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷 $7.97\ \mu\text{g/mL}$ 、大黄素甲醚-1-O- β -D-葡萄糖苷 $10.72\ \mu\text{g/mL}$ 、大黄素甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷 $7.13\ \mu\text{g/mL}$ 、芦荟大黄素 $7.44\ \mu\text{g/mL}$ 、大黄酸 $6.06\ \mu\text{g/mL}$ 、大黄素 $7.55\ \mu\text{g/mL}$ 、大黄酚 $6.10\ \mu\text{g/mL}$ 和大黄素甲醚 $4.87\ \mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 备用。

2.2 红外光谱条件

红外光谱扫描范围 $4000\sim 400\ \text{cm}^{-1}$, 分辨率 $4\ \text{cm}^{-1}$, 累计扫描 16 次, 扫描时去除水和 CO_2 的干扰。每个样品重复扫描 3 次, 用 OMNIC 8.2 软件得到每个样品的平均光谱, 对平均光谱进行基线校正、13 点平滑、归一化处理, 对处理后的光谱进行求导, 得到二阶导数光谱。

2.3 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C_{18} 柱($150\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$); 流动相: A 为磷酸水 ($\text{pH}=3$), B 为甲醇, 梯度洗脱, 0 min, B:20%, 0~60 min, B:20%→90%, 60~70 min, B: 90%→100%; 流速: $1\ \text{mL/min}$; 检测波长: $254\ \text{nm}$; 柱温: 25°C ; 进样量: $5\ \mu\text{L}$ 。

3 结果

采用 Spectrum Two 傅里叶变换红外光谱仪和 Agilent 1260 高效液相色谱仪测得大黄药材红外原始光谱和 HPLC 指纹图谱, 用 OMNIC 8.2 和中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 软件处理, 得到谱图见图 1、图 2。

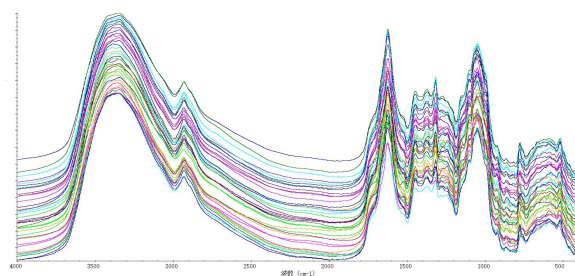
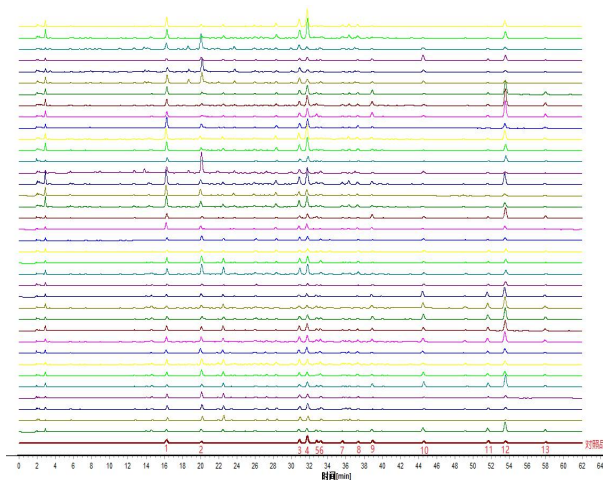


图 1 37 批大黄药材原始红外光谱图

Fig.1 Original IR spectra of 37 batches of Rhubarb



1. 芦荟大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷; 2. 大黄酸-8-O-葡萄糖苷; 3. 大黄酚-1-O- β -D-葡萄糖苷; 4. 大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷; 5. 芦荟大黄素-3-(羟甲基)-O- β -D-葡萄糖苷; 6. 大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷; 7. 大黄素甲醚-1-O- β -D-葡萄糖苷; 8. 大黄素甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷; 9. 芦荟大黄素; 10. 大黄酸; 11. 大黄素; 12. 大黄酚; 13. 大黄素甲醚

图 2 37 批大黄药材 HPLC 指纹图谱

Fig.2 HPLC fingerprint of 37 batches of Rhubarb

3.1 聚类分析

聚类分析又称集群分析, 现如今被广泛应用于中药质量控制和品种分类等方面^[9]。本研究采用 SPSS24.0 软件分别对 37 批大黄药材的红外指纹图谱和液相指纹图谱数据进行系统聚类分析, 聚类方法选择组间联接法, 区间选择平方欧式距离, 聚类结果见图 3、图 4。由图 3 可知, 当欧式距离为 20 时, 37 批大黄药材被聚为三大类, 第一类包含 3~6、11、15、16、20、22、30、32、35~37, 该类包含了甘肃武都、礼县和重庆产大黄药材; 第二类包含

2 和 8, 该类产地分别是重庆和湖北; 剩余聚为第三类, 包含了甘肃礼县、宕昌、四川和青海产大黄药材。由图 4 可知, 当欧式距离为 20 时, 37 批大黄药材同样被聚为三大类, 第一类包含了 1、5~7、11、15、16、20、22、30、32、35~37, 该类大黄产地分别是四川, 甘肃武都、礼县和宕昌; 第二类包含了 2~4、8, 产地分别是重庆和湖北; 剩余聚为第三类, 产地分别是甘肃礼县、宕昌和青海。对比两种聚类方式可知, 所有甘肃武都的大黄被聚为一类, 甘肃礼县和宕昌的大黄基本聚为一类, 其他产地大黄为一类, 两种聚类方式所得结果基本一致, 但存在少数产地相互交叉的情况。

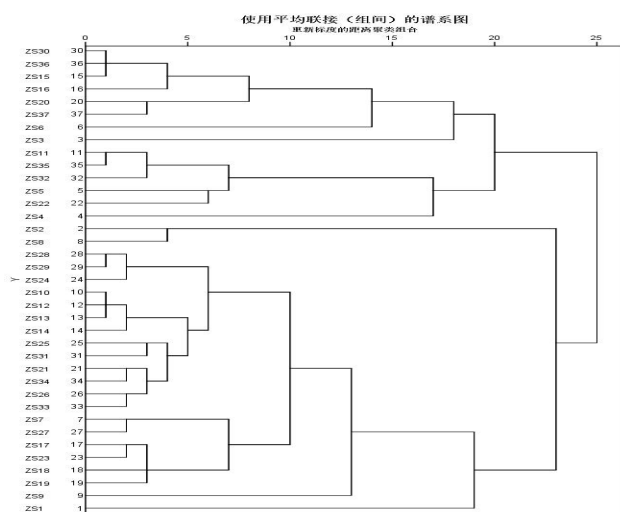


图 3 37 批大黄药材红外数据聚类分析图

Fig.3 Infrared data cluster analysis diagram of 37 batches of Rhubarb

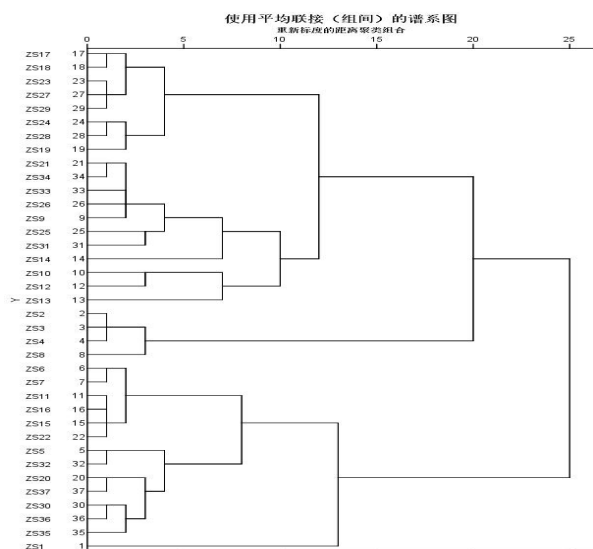


图 4 37 批大黄药材 HPLC 数据聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis of HPLC data of 37 batches of Rhubarb

3.2 大黄药材原始红外光谱分析

由聚类分析结果发现, 部分产地大黄药材聚类结果存在相互交叉的情况, 现从各产地选择一批具有代表性的大黄样品, 结合掌叶大黄和药用大黄对照药材进一步分析, 所得原始红外光谱见图 5。通过图谱可知, 大黄在 3413、2930、1627、1448、1374、1317、1051、780、518 cm^{-1} 附近有吸收峰存在。其中 3413 cm^{-1} 附近为羟基的伸缩振动吸收峰; 2930 cm^{-1} 为亚甲基的反对称伸缩振动吸收峰; 1627 cm^{-1} 为羰基伸缩振动吸收峰; 1448 cm^{-1} 附近可能包含多种成分, 如芳香环骨架伸缩振动、C-H 弯曲振动以及 (O) C-O 伸缩振动; 1373 cm^{-1} 为 C-H 弯曲振动吸收峰; 1051 cm^{-1} 附近是多个吸收峰重叠产生的宽强峰, 主要是多糖和苷类物质的 C-OH 弯曲振动产生。1317、780、518 cm^{-1} 一系列主要为草酸钙的吸收峰。大黄中含较多蒽醌类物质, 多羟基蒽醌中的羟基会与羰基发生氢键螯合, 致使羰基的伸缩振动吸收峰向低波数一端移动, 并同芳香环骨架振动吸收峰合并, 还包含了草酸钙的吸收峰, 最终形成 1627 cm^{-1} 附近的强吸收峰。

由掌叶大黄与药用大黄对照药材红外谱图比较 (见图 5) 可知, 掌叶大黄在 1317、780、518 cm^{-1} 处的吸收峰要强于药用大黄, 且峰形更加尖锐。药用大黄在 1516、1241 cm^{-1} 处存在的吸收峰, 而在掌叶大黄光谱中并无显现。这些特征峰差异能够将掌叶大黄与药用大黄进行区别。通过对图 5 中各产地大黄药材的红外图谱比较, 甘肃礼县、宕昌、武都和青海的大黄药材在 1317、780、518 cm^{-1} 附近有明显的吸收峰, 而湖北、重庆和四川产地并不明显。湖北、重庆和四川产地大黄药材图谱在 1516、1241 cm^{-1} 附近存在的吸收峰, 而甘肃礼县、宕昌、武都和青海产地大黄药材的图谱中并不存在。

以掌叶大黄对照药材作为参照, 用 OMNIC 软件计算各产地大黄药材与掌叶大黄对照药材的相关系数, 甘肃礼县、宕昌、武都, 青海、湖北、重庆和四川等地分别为: 0.9748、0.9669、0.9282, 0.9582、0.8211、0.8413 和 0.8818; 以药用大黄对照药材作为参照, 计算出相关系数分别为: 0.9199、0.9126、0.8823、0.8605, 0.9392、0.9383、0.9419。由此可知甘肃礼县、宕昌、武都和青海产的大黄与掌叶大黄对照药材更加接近, 湖北、重庆和四川产的大黄与药用大黄对照药材更加接近。

的品种,但无法区分其产地。

FT-IR 能够在谱图中反映出大黄药材的所有化学成分,经过处理后能够放大其特征,达到区分不同产地的目的。但正是由于这种整体性,使得难以从红外光谱中得到每一化学成分的准确含量。而 HPLC 无法反映出大黄药材中的全部成分,但通过色谱峰能够得到所对应化合物的准确含量。因此,在进行含量测定时,HPLC 具有其优势^[12],但对于不同产地大黄药材的区分,FT-IR 简便、迅速,在全面快速大黄药材方面有其独特的优势。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会.中国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:23.
- [2] 王亦君,冯舒涵,程锦堂,等.大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(13):227-234.
- [3] 孙玉雯,刘起华,张轩,等.大黄煮散与饮片的对比研究[J].中药材,2016,39(1):117-120.
- [4] 魏江存,陈勇,谢臻,等.紫外-可见分光光度法测定生大黄和醋大黄的总蒽醌含量[J].井冈山大学学报:自然科学版,2017,38(6):88-92.
- [5] 高亮亮.唐古特大黄、药用大黄和掌叶大黄的化学成分和生物活性研究[D].北京:北京协和医学院,2012.
- [6] 田芳,何小芳,谭梓君,等.枳壳 HPLC 特征图谱及 6 个黄酮苷类成分含量测定[J].药物分析杂志,2020,40(6):1090-1096.
- [7] 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.
- [8] 桂兰,江磊,吴楠,等.不同产地烈香杜鹃的红外指纹图谱比较研究[J].光谱学与光谱分析,2019,39(10):3193-3198.
- [9] 樊岩,黎阳,刘素香.数理统计方法在中药质量评价中的应用[J].中草药,2009,40(5):836-840.
- [10] 张慧文,宋晓玲,石松利,等.FTIR 方法和 HPLC 指纹图谱鉴别不同产地葶苈[J].光谱学与光谱分析,2020,40(1):174-178.
- [11] 冯素香,王哲,郝蕊,等.HPLC 法同时测定不同产地掌叶大黄中 10 个蒽醌类化合物[J].药物分析杂志,2017,37(5):783-788.
- [12] 宋玉鹏,陈海芳,谭舒舒,等.不同采收期江枳壳中柚皮素和橙皮素 HPLC 含量测定[J].井冈山大学学报:自然科学版,2017,38(1):83-87.