

· 基础研究 ·

基于红外光谱指纹图谱的当归快速鉴别[△]李小阳¹, 宫源², 裴纹萱³, 董玲³, 孙裕⁴, 宋学斌⁴, 陈建波^{3*}, 王晶娟^{1*}(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488; 2. 黑龙江省肇东市第一中学, 黑龙江 肇东 151100;
3. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029; 4. 兰州佛慈制药股份有限公司, 甘肃 兰州 730046)

[摘要] 目的: 建立当归药材的红外光谱指纹图谱及其相似度评价指标, 提供一种简便、客观、量化、反映整体成分信息的当归质量快速检测方法。方法: 本研究利用 PerkinElmer Spectrum One 傅里叶变换红外光谱仪对 59 批当归样品进行测定, 使用 MATLAB v7.0 软件对图谱统计分析。结果: 选取 1800~800 cm⁻¹、1800~1200 cm⁻¹ 和 1200~800 cm⁻¹ 3 个波段分别建立当归药材的相关系数识别阈值, 可以准确识别正常与异常当归样品。结论: 红外光谱指纹图谱相似度评价方法可以作为现有形性指标和化学指标的补充, 为实现当归的全程质量控制提供一种高通量、低成本的快速检测手段。

[关键词] 当归; 质量评价; 红外光谱; 指纹图谱; 相关系数

Rapid Identification of Radix Angelicae Sinensis Based on Infrared Spectroscopic FingerprintLI Xiao-yang¹, GONG Yuan², PEI Wen-xuan³, DONG Ling³, SUN Yu⁴, SONG Xue-bin⁴,
CHEN Jian-bo^{3*}, WANG Jing-juan^{1*}(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;
2. Zhaodong No. 1 Middle School, Zhaodong 151100, China;
3. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
4. Lanzhou Foci Pharmaceutical Co., Ltd., Lanzhou 730046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an infrared spectroscopic fingerprint of Radix Angelicae Sinensis and its similarity evaluation index, and provide a simple, objective and quantitative method to detect the quality of Radix Angelicae Sinensis. **Methods:** The PerkinElmer Spectrum One Fourier transform infrared spectrometer was used to determine the 59 batches of Radix Angelicae Sinensis, and the MATLAB v7.0 software was used to analyze the map. **Results:** 1800-800 cm⁻¹, 1800-1200 cm⁻¹ and 1200-800 cm⁻¹ were selected to establish the identification threshold of the correlation coefficient of Radix Angelicae Sinensis, and the normal and abnormal samples could be accurately identified. **Conclusion:** The similarity evaluation method of infrared spectroscopic fingerprint can be used as a supplement technique to the existing physical and chemical indexes. It provides a high throughput and low cost rapid detection method for the whole process quality control of Radix Angelicae Sinensis.

[Keywords] Radix Angelicae Sinensis; quality evaluation; infrared spectroscopy; fingerprints; correlation coefficients

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180418003

中药当归是伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根, 性温, 味甘、辛, 归肝、心、脾经, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效^[1]。作为传统的药食两用品种, 当归产销量大,

价格较高, 而且经常出现熏硫加工、掺假混伪、以次充好等问题。因此, 建立当归全程质量控制方法, 对于保证当归在药用或者食用时的有效性和安全性是非常必要的。

[△] [基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-GS-10-B)

* [通信作者] 王晶娟, 副教授, 研究方向: 中药鉴定与质量评价方法; E-mail: wangjj@bucm.edu.cn
陈建波, 助理研究员, 研究方向: 中药分析与质量评价方法; E-mail: chenjianbo@bucm.edu.cn

根据现行《中华人民共和国药典》(《中国药典》)规定,当归的鉴定和质量评价指标主要分为形性指标和化学指标两部分。其中,形性指标包括性状、切片和粉末显微结构,化学指标包括对照药材、阿魏酸、藁本内酯定性检测(薄层色谱)、挥发油含量测定、阿魏酸含量测定^[1]。形性指标的检查过程相对简便、快速,但是这些方法比较依赖于操作者的知识和经验,主观因素影响较大,难以严格规范。化学指标相对客观、量化,容易规范,但是检查过程需要的时间和成本也较高。而且,现有的薄层色谱、液相色谱和挥发油测定只能反映当归的部分化学成分信息,对于很多其他成分缺少控制。因此,建立一种客观、量化、简便、快速的整体成分检测方法,作为现有形性指标和化学指标的补充,可以更加全面地对当归质量进行评价,又可以提供高通量、低成本的快速检测手段,对于实现当归的全程质量控制是非常有意义的。

大量研究表明,红外光谱可以作为一种有效的中药整体化学成分快速检测方法^[2-9]。红外光谱测试对样品的前处理要求非常简单,绝大部分中药样品可以直接或者粉碎后进行测试,不需要使用有机溶剂进行分离提取。因此,红外光谱作为指纹图谱能够全面反映中药样品整体化学成分,而且具有简便快速、绿色低廉的优势。已有报道表明,使用红外光谱对当归的化学成分进行表征、对当归及其相似物种进行区分是可能的^[10-14]。因此,本研究拟通过建立当归药材的红外光谱指纹图谱及其相似度评价指标,提供一种简便、客观、量化、反映整体成分信息的当归质量快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

当归药材分别于2015年和2016年采集自甘肃岷县(19批次)、渭源县(20批次)和漳县(20批次),经北京中医药大学中药学院王晶娟副教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根。两个熏硫当归样品来自药材市场。川芎、独活、羌活、前胡为购自中国食品药品检定研究院的对照药材。中药样品粉碎后过60目筛,粉末直接进行红外光谱测试。分析纯蔗糖和溴化钾(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 红外光谱测试

红外光谱测试所用仪器为 PerkinElmer Spectrum

One 傅里叶变换红外光谱仪,DTGS 检测器,溴化钾压片法获得样品粉末的透射红外光谱。光谱测量范围 4000~400 cm^{-1} ,分辨率 4 cm^{-1} ,每张光谱累加扫描 16 次,使用空气作为光谱背景,扫描过程中自动扣除水蒸气和二氧化碳干扰。

1.3 数据处理

样品原始测量光谱经过 PerkinElmer Spectrum v10 软件的自动基线校正和归一化处理后进行谱图分析。使用 MATLAB v7.0 软件计算样品红外光谱的相关系数并进行统计分析。红外光谱的相关系数使用 ASTM 规定的夹角余弦方程式(1)定义^[15],即:

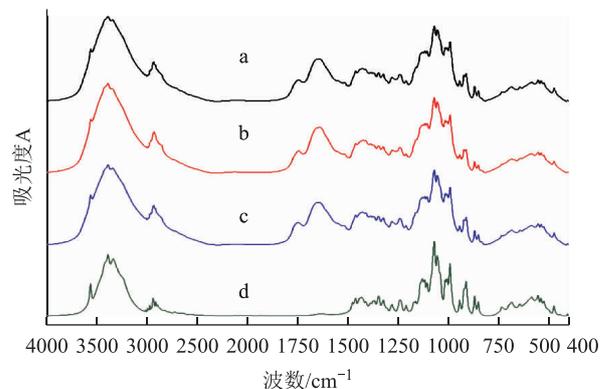
$$R_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^n x_{ik} \cdot x_{jk}}{\sqrt{\sum_{k=1}^n x_{ik}^2 \cdot \sum_{k=1}^n x_{jk}^2}} \quad (1)$$

式中: R_{ij} 为光谱 i 与光谱 j 之间的相关系数, x_{ik} 与 x_{jk} 分别是光谱 i 与光谱 j 在波数 k 处的吸光度, n 是所选择光谱区域内波数变量数目。

2 结果与讨论

2.1 当归药材红外光谱整体特征分析

图1所示为甘肃岷县、渭源县和漳县所产不同批次当归药材的平均红外光谱。3个产地的当归药材红外光谱特征比较一致,主要包括:3600~3000 cm^{-1} 区域的羟基 O-H 伸缩振动吸收峰、3000~2800 cm^{-1} 区域的 C-H 伸缩振动吸收峰、1750 cm^{-1} 附近的羰基 C=O 伸缩振动吸收峰、1640 cm^{-1} 附近的复杂叠加峰(蛋白质酰胺 I 带、羟基 O-H 弯曲振动吸收峰、芳环骨架振动吸收峰等)、1300~900 cm^{-1}



注: a. 岷县当归平均光谱; b. 漳县当归平均光谱; c. 渭源县当归平均光谱; d. 蔗糖。

图1 不同产地当归平均红外光谱

区域的复杂叠加峰(C-O 伸缩振动峰、O-H 弯曲振动峰、糖环骨架振动峰等)。可以看到,除了 $1800 \sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ 区域,当归药材红外光谱与结晶态蔗糖非常相似,说明当归药材中含有大量的结晶态蔗糖。

2.2 当归药材对照光谱与相关系数阈值计算

性状鉴定中发现,2016年漳县所产当归中有3个批次的样品异常,全归整体细小,表面黑棕色,质地硬。后续红外光谱分析也发现,这3个批次的当归样品与其他样品有显著差异,因此将其标记为异常当归样品。其余56批次的当归样品没有显著的性状或者光谱异常,均作为校正集样品使用。

鉴于中药材天然存在的成分波动性,将全部校正集当归样品的平均光谱作为当归药材对照光谱。然后,逐个计算校正集样品光谱与对照光谱的相关系数并进行统计分析,得到显著性水平为0.05时的相关系数分布下限,即为正常当归药材的相关系数识别阈值。如果待测样本与当归对照光谱的相关系数高于识别阈值,则认为该待测样本是正常当归药材;反之,认为该待测样本不是当归或者是异常当归药材。需要注意的是,光谱相关系数的最大值是1、最小值是0,因此对相关系数分布区间进行统计分析时,应该使用beta分布函数进行拟合。见图2。

由于红外光谱的不同波段所反映的化学成分信息具有一定差异,建立中药材的红外光谱指纹图谱与相似度评价指标时需要选择合适的光谱区域。原则上,作为指纹图谱所使用的光谱区域应该尽可能宽,以覆盖尽可能多的化学信息。但是,有些光谱区域对于样品识别没有显著意义甚至引入干扰,应该予以排除。对于大部分中药材来说, $1800 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$ 区域的红外光谱基本可以满足作为指纹图谱的需求。如果需要特别关注某部分化学信息,可以将光谱区域进一步缩小或进行组合。对于当归药材来说, $1800 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$ 区域反映了整体化学信息, $1200 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$ 区域主要反映了蔗糖信息,而 $1800 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 区域主要反映了蔗糖以外的其他成分信息。因此,本研究选择上述3个波段分别建立当归药材的相关系数识别阈值(结果如图3所示),所有波段的相似度同时满足要求才认为是正常的当归药材,以提高当归药材红外光谱指纹图谱相似度评价方法的特异性。使用上述3个波段的相关系数

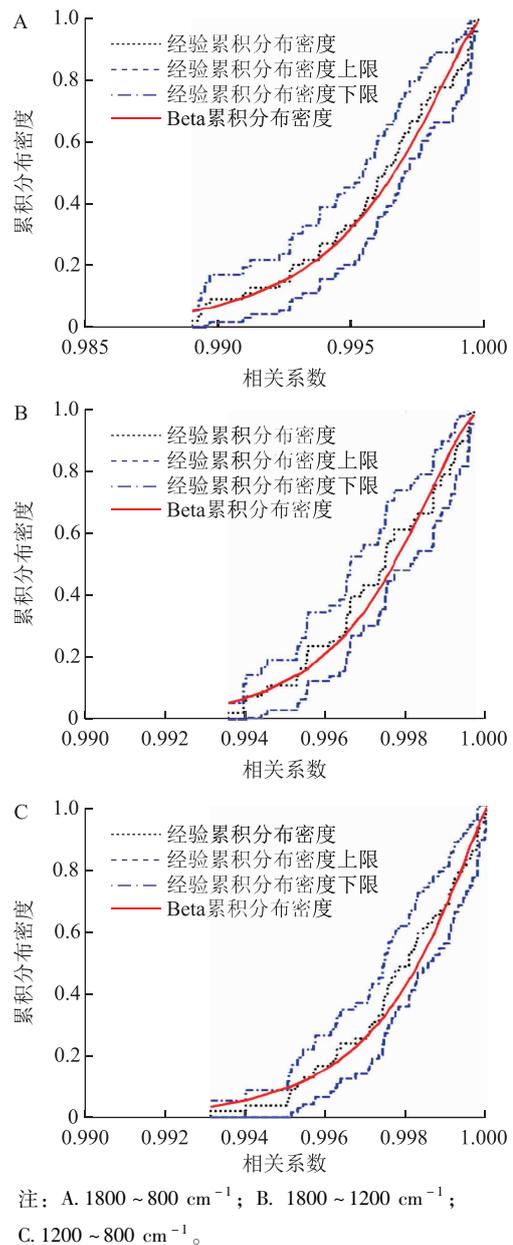
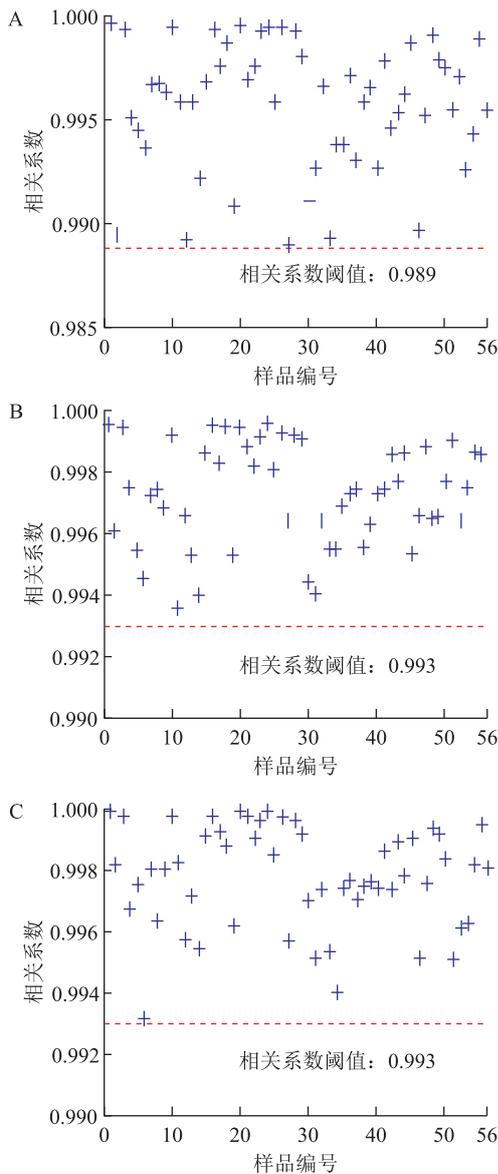


图2 不同波段校正集当归样本红外光谱相似度分析识别阈值对校正集样品进行检查,所有样品均正常,说明该方法具有很好的灵敏度。

2.3 异常当归样品的识别与分析

如图4所示,上面建立的多波段当归药材红外光谱指纹图谱相似度指标,可以有效识别出异常当归药材与伞形科其他药材。需要注意的是,仅使用 $1800 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$ 区域的红外光谱,无法发现熏硫当归、川芎、独活与正常当归药材的差异;仅使用 $1200 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$ 区域的红外光谱,无法发现部分熏硫当归、川芎与正常当归药材的差异。这说明,使用多个波段建立当归药材红外光



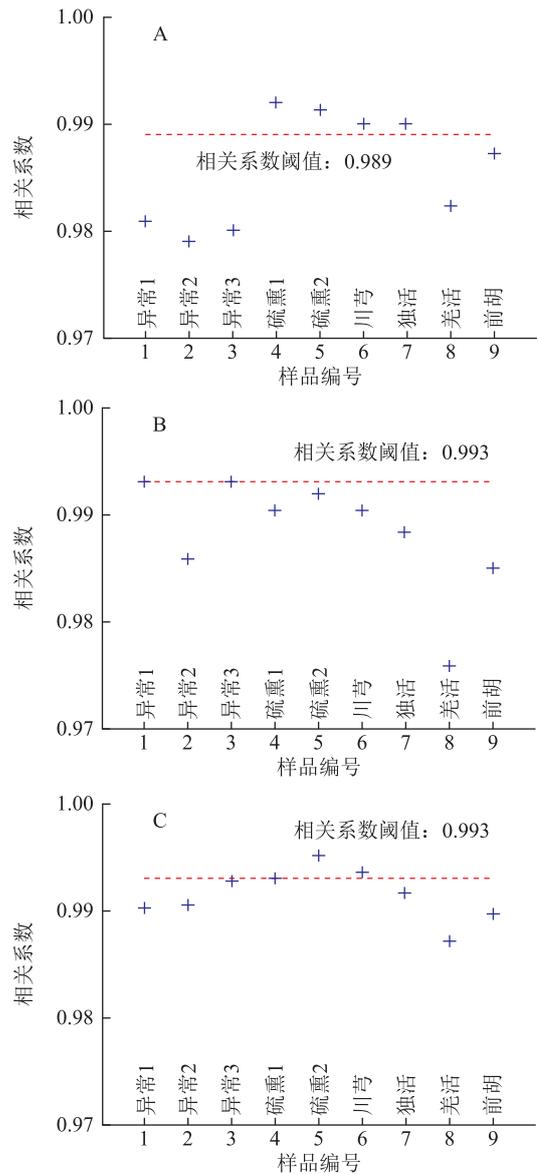
注: A. 1800 ~ 800 cm^{-1} ; B. 1800 ~ 1200 cm^{-1} ;
C. 1200 ~ 800 cm^{-1} 。

图3 不同波段相关系数阈值

谱指纹图谱相似度指标,确实可以有效提高该评价方法的特异性。

图5所示为当归药材对照红外光谱与2016年漳县所产3个批次异常当归样品的红外光谱。相比于对照光谱,异常当归样品的主要差异在于1200~800 cm^{-1} 区域的吸收峰强度下降,而且吸收峰形状明显不同,说明其中结晶态蔗糖含量较少。这些异常样品可能是生长发育不良,或者遭受了某些外界伤害,导致糖类成分积累异常。

图6所示为当归药材对照红外光谱与两个熏硫样本的吸收峰形状,与当归药材相比,熏硫样本在

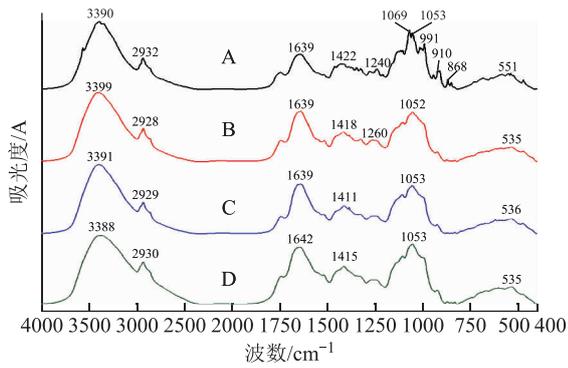


注: A. 1800 ~ 800 cm^{-1} ; B. 1800 ~ 1200 cm^{-1} ;
C. 1200 ~ 800 cm^{-1} 。

图4 不同波段异常当归样本红外光谱相似度分析

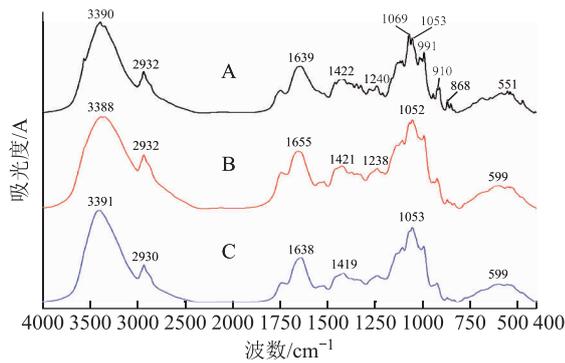
1200~800 cm^{-1} 区域的吸收峰形状也有所改变,说明硫熏对当归药材的成分影响比较明显。

图7所示为当归药材对照红外光谱与同科其他4种根类药材的红外光谱。从1200~800 cm^{-1} 区域的吸收峰形状看,伞形科根类药材中普遍含有蔗糖,说明这些药材的原植物具有相似的糖类成分代谢和积累途径,但是当归中蔗糖相对含量最高,羌活和前胡中蔗糖相对含量较低。川芎、独活、羌活、前胡这4种药材与当归的主要差异还是在1800~1200 cm^{-1} 区域,例如1740 cm^{-1} 附近的羰基伸缩振动峰。



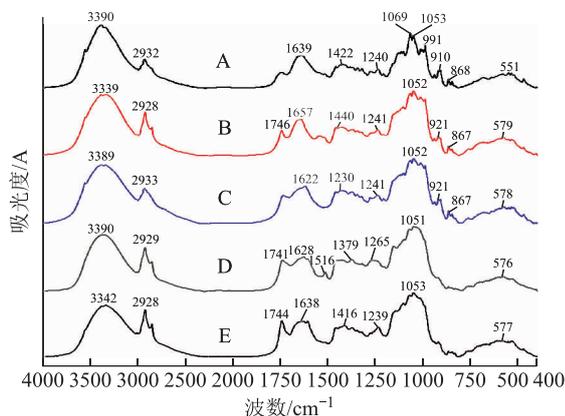
注: A. 当归对照光谱; B. 异常当归样本 1; C. 异常当归样本 2; D. 异常当归样本 3。

图 5 异常当归样本红外光谱分析



注: A. 当归对照光谱; B. 硫熏当归样本 1; C. 硫熏当归样本 2。

图 6 硫熏当归样本红外光谱分析



注: A. 当归对照光谱; B. 川芎; C. 独活; D. 羌活; E. 前胡。

图 7 当归相似药材红外光谱分析

3 结论

使用多波段红外光谱指纹图谱相似度指标, 可以对当归药材的质量进行客观量化的评价, 为当归的全程质量控制提供一种高通量、低成本的快速检

测方法。红外光谱用于中药质量评价的最根本优势在于直接无损: 一方面, 红外光谱是化合物的指纹图谱, 不需要进行衍生化等分子标记处理, 根据待测样品的光谱特征即可直接对其成分进行分析; 另一方面, 各种形态的样品都可以直接进行红外光谱测试, 不需要进行分离提取等预处理。因此, 使用红外光谱技术可以显著地节省检测过程的人力、物力、时间、化学品消耗, 而且能够反映不同类型化学成分的整体信息。但是, 中药样品不经分离提取而直接进行红外光谱测试时, 样品中各种成分的吸收信号叠加在一起, 相似成分信号重叠难以区分, 弱吸收信号被强吸收信号所掩盖, 难以找出微量成分的特征信号。因此, 在使用红外光谱对中药样品质量进行初步筛查的基础上, 还应该使用色谱、质谱等方法对特定成分进行更加精确的定性定量检测, 才能够对中药样品进行比较完善可靠的质量评价。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 133.
- [2] Sun S Q, Zhou Q, Chen J B. Infrared spectroscopy for complex mixtures[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011.
- [3] 孙素琴, 周群, 陈建波. 中药红外光谱分析与鉴定: Analysis of traditional Chinese medicine by infrared spectroscopy[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [4] 孙素琴, 周群, 秦竹. 中药二维相关红外光谱鉴定图集(精)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [5] 涂瑶生, 柳俊, 张建军. 近红外光谱技术在中药生产过程质量控制领域的应用[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2433-2436.
- [6] Chen J, Sun S, Zhou Q. Direct and model-free detection of carbohydrate excipients in traditional Chinese medicine formula granules by ATR-FTIR microspectroscopic imaging. [J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(11): 2893-2904.
- [7] Chen J, Guo B, Yan R, et al. Rapid and automatic chemical identification of the medicinal flower buds of Lonicera plants by the benchtop and hand-held Fourier transform infrared spectroscopy. [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2017, 182: 81-86.
- [8] 王夏, 孙素琴, 徐荣, 等. 红外光谱结合聚类分析法快速鉴别不同加工方式肉苁蓉[J]. 中国现代中药, 2017, 19(5): 657-661.

(下转第 1096 页)

中药成分复杂,在一个波长下难以体现所有成分的特征,故采用波长切换法。大车前苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷为苯乙醇苷类化合物,苯乙醇苷类化合物在220、247、290、330 nm均有较大吸收,一般选择样品杂峰数目更少的330 nm作为检测波长^[4]。木犀草素最大吸收波长为350 nm^[12],芹菜素最大吸收波长选择338 nm^[13]。

本研究建立的多波长切换 HPLC 用于车前草药材中大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木犀草素和芹菜素含量的同时测定,通过方法学考察表明该方法准确、简单。实验测得不同产地车前草药材质量存在较大差异,所以需要多成分同时定量以保证药材质量稳定性,该方法可以为车前草药材的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:69.
- [2] 黄桃芬,卢丹逸,喻芳君,等. HPLC法同时测定车前草中4种成分的含量[J]. 中药材,2017,40(3):645-648.
- [3] 颜佩芳,刘桂英,赵士敏,等. 平车前化学成分的研究[J]. 中国药理学杂志,2009,44(1):19-21.
- [4] 封传华,任琦,汤小林,等. 车前草中总苯乙醇苷及毛蕊花糖苷的含量测定[J]. 中国药师,2017,20(8):1477-1479.
- [5] 王锦军,张秀梅,王宏林. 反相高效液相色谱法同时测定车前草中槲皮素、木犀草素、山柰酚、芹菜素的含量[J]. 中成药,2009,31(5):772-775.
- [6] 杨洋,封传华,李刚,等. 车前草中总苯乙醇苷提取工艺研究[J]. 中国现代中药,2018,20(1):93-97.
- [7] 孙虔,耿放,程雪梅,等. 车前草中大车前苷的定性和定量分析[J]. 中国中药杂志,2010,35(16):2095-2098.
- [8] 许兵兵,黄碧涛,曾金祥,等. 车前子及车前草中毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2016(18):64-67.
- [9] 张雪芹,曲玮,梁敬钰. 车前草化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2013,25(11):1-8.
- [10] Nishibe S. Studies on the flavonoids of the Plantago herbs [J]. Nat Med,1995,49(3):340.
- [11] Janković T, Zdunić G, Beara I, et al. Comparative study of some polyphenols in Plantago, species [J]. Biochemi Syst Ecol,2012,42:69-74.
- [12] 王柯,王艳艳,赵东保,等. HPLC法测定金银花不同部位中木犀草素及其苷的含量[J]. 河南大学学报(自然科学版),2011,41(1):39-43.
- [13] 王晓静,路娟,彭纪铭,等. 密蒙花中4个化合物含量的多波长高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药,2017(10):2329-2331.

(收稿日期 2018-04-02)

(上接第1091页)

- [9] Qu L, Chen J B, Zhang G J, et al. Chemical profiling and adulteration screening of Aquilariae Lignum Resinatum by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and two-dimensional correlation infrared (2D-IR) spectroscopy [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2016, 174: 177-182.
- [10] Xiang L, Wang J, Zhang G, et al. Analysis and identification of two similar traditional Chinese medicines by using a three-stage infrared spectroscopy: Ligusticum chuanxiong, Angelica sinensis, and their different extracts [J]. J Mol Struct Mol Struct, 2016, 1124: 164-172.
- [11] Liu H, Sun S, Lu G, et al. Discrimination of extracted lipophilic constituents of Angelica with multi-steps infrared macro-fingerprint method [J]. Vib Spectrosc, 2006, 40(2): 202-208.
- [12] Liu H X, Sun S Q, Lu G H, et al. Study on Angelica and its different extracts by Fourier transform infrared spectroscopy and two-dimensional correlation IR spectroscopy [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2006, 64(2): 321-326.
- [13] 吕光华,孙素琴,梁曦云,等. 归头和归尾二维相关红外光谱法的鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2004,24(3):311-314.
- [14] Li J R, Sun S Q, Wang X X, et al. Differentiation of five species of Danggui, raw materials by FTIR combined with 2D-COS IR [J]. J Mol Struct, 2014, 1069(1): 229-235.
- [15] Chen J B, Sun S Q, Zhou Q. Data-driven signal-resolving approaches of infrared spectra to explore the macroscopic and microscopic spatial distribution of organic and inorganic compounds in plant. [J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(19): 5695-5706.

(收稿日期 2018-04-18)