

# 采用 FTIR 和电子能谱 EDS 指纹图谱直观比对鉴定右归丸济生肾气丸

王丽双, 邹华彬\*, 田芳, 杜爱琴, 董凤娟, 张新玲

山东大学化学化工学院, 山东 济南 250100

**摘要** 结合 FTIR 和电子能谱 EDS 指纹图谱, 鉴别了两种组成相近的中药复方右归丸和济生肾气丸。测定右归丸和济生肾气丸样品氯仿提取物的红外指纹图谱, 依据 W 检验理论判别方法精细建立两种中药复方红外指纹图谱的特征吸收峰组, 确定了各个特征吸收峰相对应的特征分子基团和药物成分组成。同时测量两种中药复方原药粉末样品的 EDS 指纹图谱。根据两种中药复方 FTIR 指纹图谱中的特征峰组及其对应的化合物类型和原药粉末的 EDS 谱中多种元素的种类和含量信息, 可以快速准确鉴别右归丸和济生肾气丸, 使红外指纹图谱法达到了与色谱指纹图谱法相似的鉴别能力。本文建立的 FTIR 和 EDS 指纹图谱直观比对法是一种快速准确鉴别组成复杂成分相似的同剂型中药复方的有效方法。

**关键词** 指纹图谱; 鉴定; 右归丸; 济生肾气丸; 直观比对; 电子能谱

**中图分类号:** R917 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)09-2407-05

## 引言

中药复方是中医临床用药的主要形式和手段, 其突出特点是同剂型产品外观几乎无差异, 无法通过外观对其品种进行鉴别。中药复方由多味药材组成, 含有多种化学成分, 它们是药效作用的物质基础, 仅凭测定其中一种或几种成分并不能全面准确地反映中药复方的品质, 所以综合分析中药复方的全成分组成信息是中药复方鉴别及质量评价研究的必然趋势。

指纹图谱分析是对中药及其制剂进行准确鉴别和质量评价的可行手段之一, 其中的红外光谱指纹图谱得到广泛应用<sup>[1-4]</sup>。中药红外指纹图谱是中药混合成分分子红外吸收的叠加, 通过直观比对其峰数, 峰位, 峰形和峰强度, 以及某一波数吸收峰的有无, 即可对外形相似组成相近的中药复方药品进行快速准确鉴别。

X 射线能量色散谱分析方法 EDS<sup>[5]</sup>可同时获得样品中所含多种元素成分的种类及含量信息, 据此可以对不同样品达到辅助定性鉴别的目的。

右归丸和济生肾气丸是治疗肾虚的两种著名的中成药。二者均为黑褐色小丸, 外观无差异。它们都由 10 种药材组成, 其中含有 5 种共同的药材: 熟地黄, 山茱萸, 山药, 制附子, 肉桂。两种中药复方含有成百上千种相同及相似的化学

成分, 其鉴别十分困难。目前对两种复方鉴别及质量评价的研究较少, 有文献报道薄层色谱和高效液相色谱法对济生肾气丸中个别活性成分丹皮酚, 熊果酸, 齐墩果酸的测定<sup>[6-8]</sup>, 未见利用红外及 EDS 指纹图谱技术对右归丸和济生肾气丸进行品种鉴别的研究报道。

本文采用了红外指纹图谱和 EDS 图谱分别对右归丸和济生肾气丸氯仿提取物及原药进行研究, 结果表明, 采用直观比对二者氯仿提取物红外指纹图谱中特征吸收峰组及其对应的官能团、化合物类型的不同以及原药粉末 EDS 图谱中所含元素的差异, 可以快速准确鉴别两种组成相近剂型相同的右归丸和济生肾气丸药品。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

Nicolet-5700 FTIR 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet instrument corporation), 扫描范围 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ ; 紫外-可见分光光度计(UV-240, 日本岛津公司); EDS 电子能谱分析仪(OxfordINCAxSight, 英国牛津公司), 分析元素范围: Be4-U92, Nmk(5.9 keV), 能量分辨率: 优于 133 eV; 高速粉碎机, 分析天平。

### 1.2 药材及试剂

三氯甲烷(AR)(天津科密欧化学试剂公司); 一次蒸馏

收稿日期: 2010-11-07, 修订日期: 2011-02-20

基金项目: 山东省科技攻关计划项目(2009RKA063)资助

作者简介: 王丽双, 女, 1982 年生, 山东大学化学与化工学院硕士研究生 e-mail: shuangderiji@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: huabinzou@hotmail.com

水。济生肾气丸样品 S1-S12: 由药都制药集团股份有限公司生产, S1, S2(批号 080801, 生产日期 2008.08.21), S3, S4(080602, 2008.06.26), S5, S6, S7(080405, 2008.04.30), S8, S9(080302, 2008.03.30), S10, S11, S12(070702, 2007.07.29)。右归丸样品 S13-S25: 由河南苑西制药股份有限公司生产, S13, S14(批号 080904, 生产日期 2008.09.18), S15, S16, S17(080506, 2008.05.20), S18, S19, S20(080501, 2008.05.07), S21, S22, S23(080310, 2008.03.10), S24, S25(070805, 2007.08.31)。

### 1.3 氯仿提取最佳提取条件

将以上中药样品分别用高速粉碎机制成粉末, 在 60 °C 烘干 2 h。原药粉末样品保存备用。从两种中药中各任选一个样品, 称取 0.50 g 置于索氏提取器中, 用 60 mL 氯仿为提取剂加热回流, 每隔半小时取出 1 mL 回流液稀释一定倍数, 用紫外-分光光度计测定最大吸收峰的吸光度, 至吸光度基本恒定。确定右归丸、济生肾气丸氯仿提取的最佳时间分别为 2 和 1.5 h。

### 1.4 红外测试样品制备及测试条件

准确称取 2.00 g 右归丸和济生肾气丸样品粉末(每个样品平行 3 份), 置于索氏提取器中, 用 60 mL 氯仿按上述 1.3 中最佳提取时间提取, 将提取液倒入蒸发皿, 水浴 40 °C 蒸发浓缩, 再用干燥后的氯仿溶解后装入样品管冷藏保存, 以液膜法测其指纹图谱, 仪器灵敏度为 60%, 25 cm<sup>-1</sup>平滑, 每份提取物平行测量 3 次指纹图谱, 每个样品的红外指纹图谱峰是 9 次测量组合指纹图谱的平均值。

### 1.5 原药粉末样品 EDS 测试条件

从上述 1.3 中保存的两种中药复方原药粉末样品中各任选 1 个样品, 测其 EDS 谱。重复测定 5 次。测试中所有经过分析的元素已归一化。测试中所用标准样品: C(CaCO<sub>3</sub>); O(SiO<sub>2</sub>); Mg(MgO); Si(SiO<sub>2</sub>); K(MAD-10 Feldspar); Ca(Wollastonite)。

### 1.6 精密度与稳定性实验

两种中药复方氯仿提取物样品中各任选 1 个样品, 连续测定 5 次, 所得红外吸收光谱谱线基本一致。对该 2 个样品提取物每周连续测定 3 次, 连续测定 4 周, 所得图谱谱线基本一致。两种中药复方原药粉末样品中各任选 1 个样品, 重复测定 5 次 EDS 图谱, 所得谱线基本一致。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氯仿提取物红外指纹图谱和数据分析

将 25 个右归丸和济生肾气丸氯仿提取物样品按照 1.4 部分中的实验方法进行红外光谱测定。其中 10 个右归丸、济生肾气丸氯仿提取物红外指纹图谱叠加如图 1。根据共有峰和变异峰的理论判别方法-W 检验法<sup>[9]</sup>, 确定 25 个样品红外指纹图谱的共有峰及变异峰。传统的直观对比法鉴别是通过直接观察图谱, 根据不同种中药的指纹图谱中吸收峰波数的明显差异达到鉴定的目的。由于红外吸收的波动性, 对于不同种中药中两个波数相差较小的基团的振动吸收峰, 用该法无法对其进行准确鉴别。如表 1 中右归丸样品 S19 在

1 741.9 cm<sup>-1</sup> 处有吸收, 济生肾气丸 S1 在 1 733.5 cm<sup>-1</sup> 处有吸收峰, 这两个吸收峰仅相差 8 个波数, 吸收峰位置及强度极其相近, 单凭传统的直观对比观察图谱很难对二者进行鉴别。本文通过 W 检验理论方法, 可把相差仅 8 个波数的两组吸收峰清晰地归类为两个不同的共有峰组(见表 1 中 2, 3 号峰), 并进一步确定了两种中药复方样品各自独有的特征吸收峰组。通过对比两种复方各自特征吸收峰组, 可以精细鉴别右归丸、济生肾气丸药品, 此方法比传统的直观对比法更加精确。

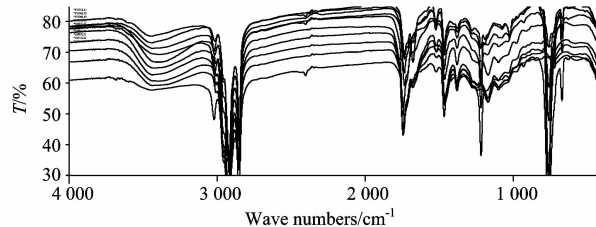


Fig. 1 Infrared (IR) fingerprint spectra of extractions of Yougui pill and Jisheng shenqi pill samples with chloroform. The IR spectra were in order of S2, S4, S9, S12, S25, S15, S13, S2, S21, S5 from top to bottom near 3 500 cm<sup>-1</sup>

另一方面, 传统的直观对比法一般只根据每种中药材的一个图谱来对它们进行鉴别, 我们的实验发现, 同一个样品指纹图谱具有一定的波动性, 某一振动吸收峰并不是在每次测量的指纹图谱中都会重复出现, 因此, 只利用一次测量所得的指纹图谱确定其特征峰可靠性较差, 分析结果可信度较低。而我们的指纹峰是 9 次测量的平均值, 依据每个样品的指纹峰确定的同类样品的特征峰组, 可靠性强, 分析结果比传统的直观对比法可信度高。根据 25 个样品共有峰组所确定的右归丸和济生肾气丸的特征吸收峰组见表 1。

根据表 1, 可以发现, 所有的济生肾气丸样品 S1~S12 在波数约为 3 017.7, 1 732.6, 1 215.6 和 668.7 cm<sup>-1</sup> 有四组特征吸收峰组, 右归丸在此特征吸收峰组处没有吸收峰。所有的右归丸样品 S13~S25 在波数约为 1 742.0 和 723.3 cm<sup>-1</sup> 有它们的特征吸收峰组, 济生肾气丸在此特征吸收峰组处没有吸收峰。且济生肾气丸 12 个样品中的至少 7 个样品在波数约为 1 074.2, 1 022.5 和 927.9 cm<sup>-1</sup> 处有吸收峰组, 而所有的右归丸样品在此波数处无吸收峰; 右归丸 13 个样品在波数约为 1 168.0 和 1 097.7 cm<sup>-1</sup> 处都有特征吸收峰组, 济生肾气丸只有一个样品在此波数处有吸收峰。这说明济生肾气丸的波数约为 1 074.2, 1 022.5 和 927.9 cm<sup>-1</sup> 三个吸收峰组和右归丸的波数约为 1 168.0 和 1 097.7 cm<sup>-1</sup> 两个吸收峰组也可以分别作为两种药品很强的辅助特征吸收峰组。通过直观对比右归丸和济生肾气丸氯仿提取物红外吸收的特征峰组, 可对两种中药复方样品进行准确可靠的鉴别。

右归丸和济生肾气丸的主要组成元素为 C, H, O, 二者中的非极性成分能够溶于氯仿, 如部分皂苷类, 木脂素类, 酚类, 甾醇类, 萜类, 苯丙素类, 挥发油类, 胡萝卜素类和酯类成分等。极性较强的黄酮类, 木质素类, 环烯醚萜类, 氨

基酸, 糖和各种糖苷, 酚苷等苷类成分则不易溶解于氯仿中。通过系统地对两类中药复方中各药材的氯仿可溶物的分

子结构和指纹图谱峰的对应对应分析, 建立了两种中药复方各自特征吸收峰对应的基团和化合物类型, 结果见表2。

Table 1 Characteristic peak groups and their wave numbers of Yougui and Jisheng shenqi pill samples/cm<sup>-1</sup>

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1	3 013.6*		1 733.5	1 215.3	1 165.6		1 074.2	1 022.5			667.6
S2	3 018.2		1 732.0	1 215.4			1 072.6	1 022.0			668.5
S3	3 017.3		1 732.4	1 215.5			1 072.4	1 022.3			668.1
S4	3 017.1		1 733.8	1 215.7			1 072.5	1 022.5			668.4
S5	3 019.0		1 732.8	1 215.5					927.9		668.9
S6	3 019.6		1 732.5	1 215.4					928.0		669.1
S7	3 018.8		1 733.1	1 215.5					928.1		669.0
S8	3 017.3		1 733.7			1 215.6	1 073.6	1 024.6	928.3		668.7
S9	3 016.9		1 734.0	1 215.8		1 095.4		1 025.0	928.5		668.6
S10	3 018.7		1 731.1	1 215.6			1 076.5	1 029.2	927.9		669.2
S11	3 020.0		1 730.5	1 215.6			1 076.5		927.9		669.5
S12	3 015.9		1 732.3	1 215.7					928.0		668.6
S13		1 741.8			1 168.0	1 097.7				723.3	
S14		1 742.1			1 167.1	1 097.8				723.6	
S15		1 742.3			1 167.8	1 098.0				723.4	
S16		1 742.1			1 167.7	1 096.9				723.2	
S17		1 742.1			1 168.4	1 096.8				723.4	
S18		1 742.2			1 166.0	1 097.4				723.1	
S19		1 742.3			1 165.5	1 097.4				723.1	
S20		1 742.2			1 165.8	1 097.3				723.1	
S21		1 741.6			1 166.4	1 097.0				723.1	
S22		1 741.6			1 166.6	1 097.5				723.4	
S23		1 741.6			1 165.9	1 097.3				723.4	
S24		1 741.7			1 167.0	1 097.6				723.4	
S25		1 742.0			1 166.7	1 097.9				723.4	

\* 3 013.6, 指样品 S1 的 1 号特征峰波数是 3 013.6 cm<sup>-1</sup>, 其余数据意义相同

Table 2 Radicals and compound species corresponding to each exclusive characteristic peak

样品	特征峰位/cm <sup>-1</sup>	基团振动类型	化合物类型	峰强
济生肾气丸	3 017.7	苯环上 C—H 伸缩振动	丹皮酚, 挥发油类成分 <sup>a</sup>	中
	1 732.6	C=O 伸缩振动	香豆素类, 柠檬酸三甲酯, 甘油棕榈酸酯	强
	1 215.6	酚类 C—O 伸缩振动	丹皮酚, 挥发油类成分 <sup>a</sup>	强
	668.7	C=C 面外弯曲振动	丹皮酚, 挥发油类成分 <sup>a</sup>	强
右归丸	1 742.0	C=O 伸缩振动	藁本内酯, 丁基酞内酯, 丁烯基酞内酯	强
	723.3	CH <sub>2</sub> 面内摇摆震动	挥发油类成分 <sup>b</sup> , α-胡萝卜素, 对羟基反式桂皮酸十八烷基酯	中

a: 2,6-二叔丁基对甲酚, 3-叔丁基-4-羟基茴香醚; b: 十二烷, 庚醛, 2-戊基呋喃

济生肾气丸和右归丸比较, 含有两味不同的中药材牡丹皮和车前子, 牡丹皮的主要成分是丹皮酚, 车前子中含有挥发油。丹皮酚和车前子部分挥发油成分的分子中都含有酚类结构, 因此济生肾气丸在约 3 017.7 cm<sup>-1</sup>处有苯环上 C—H 伸缩振动处的特征吸收, 在 668.7cm<sup>-1</sup>苯环取代区内有 C=C 面外弯曲振动的特征吸收, 1 215.6 cm<sup>-1</sup>处有苯酚类的 C—O 伸缩振动的特征吸收。而右归丸中含酚类成分极少, 所以此三处的红外吸收极弱, 在 60%灵敏度下不显示吸收峰。右归丸中很多成分的分子中都含有—(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>—(n>3)结构, 因此右归丸在 723.3 cm<sup>-1</sup>处有亚甲基的面内摇摆振动特征吸收。两种中药复方氯仿提取物的红外指纹图谱

中都有 C=O 伸缩振动吸收峰, 济生肾气丸在 1 732.6 cm<sup>-1</sup>左右, 右归丸在 1 742.0 cm<sup>-1</sup>左右。右归丸和济生肾气丸中极性较大的黄酮类成分是不溶于氯仿的, 能溶于氯仿的羧酸类成分在加热回流提取的过程中有可能与醇反应成酯, 因此两种中药复方氯仿提取液中含有羰基的大部分成分是原来存在或新生成的酯类成分。济生肾气丸酯类成分中主要是芳香酯或者链酯, 右归丸和济生肾气丸比较, 含有一味不同的药材当归, 当归挥发油中含有藁本内酯, 丁基酞内酯, 丁烯基酞内酯等内酯类成分, 因为环张力导致 C=O 伸缩振动吸收峰向高波数区移动。这也是两组 C=O 特征吸收峰存在较小差异的原因。

通过对两种中药复方各自特征吸收峰和其对应的基团和化合物类型的分析,可以从分子结构和成分组成信息层次上进一步准确鉴别两种组成相似的中药复方,分析结果与两种复方实际组成相吻合。采用该方法对中药复方进行鉴别,与传统的直观比对法相比,可以基于多层次信息得到更准确可靠的鉴别结论。通过采用 W 检验理论判别方法确定两种中药复方红外指纹图谱各自的特征吸收峰组,并进一步确定特征吸收峰组对应的特征分子结构和内在组成,使红外指纹图谱法达到了与色谱指纹图谱法同等的鉴别能力,且该方法简便快速,经济实用。

## 2.2 原药粉末电子能谱 EDS 及其直接比对分析

在电子能谱可以测定的元素范围内,济生肾气丸中只含有 C 和 O 两种元素,它们的相对质量分别为 C 51.83% 和 O 48.17%。右归丸中除了主要含有 C 和 O 元素外,还含有 Si, Mg, K, Ca 四种元素。它们的相对质量分别为 C 45.97%, O 52.37%, Si 0.75%, Mg 0.58%, K 0.23%, Ca 0.10%。右

归丸中含有一味济生肾气丸中没有的鹿角胶,其中含有大量的胶质及钙,镁,硅,钾化合物。通过 EDS 指纹图谱,可以在非 C, H, O 元素层次鉴别两种组成相似的中药复方。

## 3 结 论

本文通过 W 检验理论判别方法可对相差 8 个波数的吸收峰进行准确区分,精细确定两种中药复方各自的特征吸收峰组及各个特征吸收峰相对应的特征分子基团和药物成分组成,使红外指纹图谱法达到了与色谱指纹图谱法同等的鉴别能力。结合 EDS 指纹图谱中 Si, Mg, Ca, K 等元素的信息可以准确可靠地鉴别两种组成相近、剂型相同的右归丸和济生肾气丸样品。本文发展了传统的直观比对法,该法与传统的直观比对法相比,可以更精细的确定特征信息,利用信息更全面,可信度更高。

## References

- [1] Zou Huabin, Yang Guosheng, Qin Zhengran, et al. *Analytical Letters*, 2005, 38(9): 1457.
- [2] ZOU Hua-bin, ZHANG Xin-ling, ZHAI Hong, et al(邹华彬, 张新玲, 翟红, 等). *China Journal of Chinese Materia Medica*(中国中药杂志), 2008, 33(13): 1543.
- [3] Zhu Hongbin, Wang Yuzhi, Liang Hao, et al. *Talanta*, 2010, 81: 129.
- [4] Vodnar Dan C, Socaciu Carmen, Rotar Ancuta M, et al. *International Journal of Food Science and Technology*, 2010, 45(11): 2345.
- [5] WANG Xian-hao, GU Hui(王贤浩, 顾辉). *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*(电子显微学报), 2009, 28(4): 318.
- [6] LI Yun-fen(李云芬). *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*(中国现代应用药学杂志), 1999, 16(4): 57.
- [7] HUANG Rong-fa, TANG Chun-hua(黄荣发, 唐春华). *Journal of Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine*(江西中医学院学报), 2001, 13(3): 116.
- [8] SHE Meng-xiang(余孟祥). *Hubei Journal of Traditional Chinese Medicine*(湖北中医杂志), 1999, 22(1): 45.
- [9] ZOU Hua-bin, YUAN Jiu-rong, WANG Wei(邹华彬, 袁久荣, 王伟). *World Science Technology Modernization of Traditional Chinese Medicine*(世界科学技术-中医药现代化), 2004, 6(2): 51.

# Identification of Yougui and Jisheng Shenqi Pills with FTIR and EDS Fingerprint Spectra by New Visual Comparison

WANG Li-shuang, ZOU Hua-bin\* , TIAN Fang, DU Ai-qin, DONG Feng-juan, ZHANG Xin-ling  
School of Chemistry and Chemical Engineering of Shandong University, Ji'nan 250100, China

**Abstract** FTIR combined with EDS fingerprint spectra was first applied to the identification of two kind of traditional Chinese compound formulae—Yougui pill and Jisheng shenqi pills, which have the similar composition. The IR FPS of extraction of two kinds of pills extracted with chloroform were measured by liquid membrane method. The exclusively characteristic peak groups of these two kinds of formulae were theoretically established based on the Shapiro-Wilk W testing method, and the characteristic radicals and compound species corresponding to each characteristic peak were determined. Meanwhile, EDS fingerprint spectra of the two kinds of original powders were also measured which can reflect the element species and content information. Based on the three kinds of information (characteristic peak groups, radicals and compound species, different elements), Yougui and Jisheng shenqi pills were identified quickly, precisely and reliably. In this method, infrared fingerprint spectra possess the similar ability with chromatograph fingerprint spectra in identification of traditional Chinese compound formulae. The results show that the new visual comparison method is suitable for identifying traditional Chinese compound formulae with the same dosage-form and similar composition.

**Keywords** Fingerprint spectra; Identification; Yougui pill; Jisheng shenqi pill; Visual comparison; EDS

(Received Nov. 7, 2010; accepted Feb. 20, 2011)

\* Corresponding author