

不同厂家冬凌草片的红外导数光谱和聚类分析

龚海燕, 王琳琳, 罗晓, 崔永霞, 刘伟, 白雁*
(河南中医学院, 郑州 450048)

[摘要] 目的:利用中红外光谱对不同厂家的冬凌草片进行鉴别。方法:分析不同厂家的冬凌草片的红外光谱原始、一阶导数和二阶导数光谱,并通过计算光谱间的距离将其聚类分析。结果:通过比较发现相同厂家冬凌草片的原始光谱相似度很大,不同厂家的冬凌草的红外光谱相似度比较小。差异主要体现在二阶导数图谱的 $3\ 563\ \text{cm}^{-1}$ 处的N-H伸缩振动吸收峰; $1\ 158, 1\ 117, 1\ 080, 1\ 037\ \text{cm}^{-1}$ 处的C-O伸缩振动吸收峰; $983, 862, 680, 655\ \text{cm}^{-1}$ 处的C=C的面外弯曲振动吸收峰,几处的峰形、峰位、峰强不同。并且采用聚类分析方法对不同厂家的冬凌草片进行聚类分析。结论:利用红外光谱的二阶导数光谱和聚类分析都可成功的鉴别4个不同厂家的冬凌草片。该方法具有快速、无损、绿色、直观的特点。

[关键词] 冬凌草片;中红外光谱;不同厂家;二阶导数光谱;聚类分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0066-05

[doi] 10.11653/syfy2014030066

Studies of Donglingcao Tablets from Different Manufacturers by Infrared Derivative Spectra and Clustering Analysis

GONG Hai-yan, WANG Lin-lin, LUO Xiao, CUI Yong-xia, LIU Wei, BAI Yan*
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450048, China)

[Abstract] **Objective:** To identify Donglingcao tablets from different manufacturers by infrared spectroscopy. **Method:** The infrared spectroscopy of different manufacturers were analyzed by the original spectra; first derivative and second derivative. And it is clustered by calculating the distance between the spectra. **Result:** The original spectrum of same manufacturers is very simliar, and the similarities of different manufacturers are relatively small. In the second derivative spectrum, the main difference is the N-H stretching vibration absorption at $3\ 563\ \text{cm}^{-1}$, C-O stretching vibration absorption at $1\ 158, 1\ 117, 1\ 080, 1\ 037\ \text{cm}^{-1}$ and C=C outside the plane bending vibration absorption at $983, 862, 680, 655\ \text{cm}^{-1}$. The intensity, shape and position of absorption peaks were obviously difference in all those places. The samples of different manufacturers were identified using clustering analysis. **Conclusion:** Using the infrared spectrum of the second derivative and clustering analysis can be successful in the identification of four manufacturers of Donglingcao tablets. This method is rapid, nondestructive, green and intuitive features.

[Key words] Donglingcao tablets; infrared spectroscopy; different manufacturers; second derivative; clustering analysis

冬凌草片的主要成分是冬凌草,辅料有淀粉、糊精、蔗糖、滑石粉、硬脂酸镁。冬凌草片为喉痹类非处方药,主要功效是清热解毒、消肿散结、利咽止痛,用于热毒壅盛所致咽喉肿痛、声音嘶哑、扁桃

[收稿日期] 20130607(007)

[基金项目] 河南省重大公益科研项目(081100912500);河南省杰出人才项目(084200510017);河南中医学院博士科研基金项目(BSJJ2011-15)

[第一作者] 龚海燕,硕士,讲师,从事中药质量研究,Tel:0371-65575838,E-mail:ghy_mz@163.com

[通讯作者] *白雁,教授,博士生导师,从事利用现代仪器分析方法对中药质量控制的研究,E-mail:ghy_mz@163.com

体炎、咽炎、口腔炎见上述证候者及癌症的辅助治疗^[1]。

红外光谱具有整体性、特征性和模糊性,只要其所含化学成分不同,各成分含量有差别,都必然造成其特征红外光谱的差异,犹如人的指纹差异^[2-4]。由于不同厂家的生产工艺和原辅料的不同,导致冬凌草片的疗效也会有差别,而红外光谱能够完整的反应整个中药体系中原辅料的细节信息,更具整体性,并且红外光谱法具有快速、无损、绿色、准确的特点,因而更适用于中成药的厂家鉴别^[5-8]。曾有文献^[9]报道用近红外光谱技术结合化学计量学鉴别不同厂家的冬凌草片,但是近红外光谱区谱带重叠严重,不如中红外光谱吸收带多、谱带窄和有显著的特征吸收,可以直接从光谱或导数光谱中观察出不同样品之间的差异。

本文运用中红外光谱对济世药业,安阳华安、三门峡广宇生物制药、安阳路德4个厂家的样品进行红外光谱和聚类分析研究,为不同厂家冬凌草片的质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器设备及数据处理软件 Pekin Elmer 公司 Spectrum 100 型红外分光光度计,天津市拓扑仪器有限公司 FW-4A 型粉末压片机,上海跃进医用光学器械厂 YSHT-11 型红外热辐射理疗仪。

1.2 药品 溴化钾(天津市福晨化学试剂厂,分析纯),市售各厂家的冬凌草片。

1.3 样品来源及制备

1.3.1 样品来源 冬凌草片分别来自济世药业(A 厂家)15 批次、安阳华安(B 厂家)18 批次、三门峡广宇生物制药(C 厂家)16 批次、安阳路德(D 厂家)9 批次,见表 1。

1.3.2 样品制备和光谱的采集 分别取各厂家的不同批次的冬凌草 10 片,刮去糖衣研成细粉,取其中约 2 mg 于玛瑙研钵中,再加入约 100 mg 干燥的溴化钾一起研匀,取适量的混合样品放入压片模具中,在压片机上压成半透明的薄片,然后测其红外光谱。

光谱采集条件:室温 20 ~ 25 ℃;相对湿度 20% ~ 25%;扫描范围 4 000 ~ 450 cm⁻¹。扫描次数 16 次/s,扫描速度 0.2 cm·s⁻¹,分辨率 4 cm⁻¹。

原始光谱采用 Pekin Elmer 公司的 Spectrum for window 软件获得,然后对光谱用基线校正、归一化处理,再分别进行一阶导数、二阶导数处理。相似度比较采用 Compare 软件。

表 1 4 个厂家样品及批号

No.	批号	No.	批号
A1	20111027	B15	110906
A2	20110426	B16	111001
A3	20110427	B17	120201
A4	20110428	B18	110609
A5	20110513	C1	111009
A6	20110514	C2	111204
A7	20110536	C3	111205
A8	20110551	C4	111004
A9	20111030	C5	111103
A10	20111120	C6	111104
A11	20111222	C7	111110
A12	20111102	C8	110904
A13	20110556	C9	120104
A14	20111216	C10	100909
A15	20111203	C11	100907
B1	100901	C12	110903
B2	100905	C13	111110
B3	110511	C14	111210
B4	110606	C15	120106
B5	110608	C16	120202
B6	110816	D1	110303
B7	111103	D2	110509
B8	111007	D3	110602
B9	111111	D4	110603
B10	111114	D5	110903
B11	110601	D6	111006
B12	111016	D7	111204
B13	110815	D8	111202
B14	100904	D9	111202

1.4 方法学考察

1.4.1 精密度试验 取样品 A6 在同样的环境下连续测量 5 次,得出红外光谱图,对所得光谱图进行相似度比较,相关系数分别为 1.000 0,0.999 8,0.999 5,0.999 5,0.999 4。说明仪器具有良好的精密性。

1.4.2 重复性考察 取 1.4.1 下所述的样品重复压 5 个样品片,分别测定其红外光谱,对各红外光谱进行相似度比较,得到其相关系数分别为 1.000 0,0.998 4,0.999 5,0.993 0,0.991 1。说明方法具有良好的重复性。

1.4.3 稳定性试验 取 1.4.1 下同样的一个样品测其红外光谱图,把这个样品放在干燥器内,每过 30 min 测定 1 次,得到 5 个红外光谱图,进行相似度比较,得相关系数分别为 1.000 0,0.998 0,0.997 7,0.997 7,0.997 5,说明样品具有良好的稳定性。

2 结果与讨论

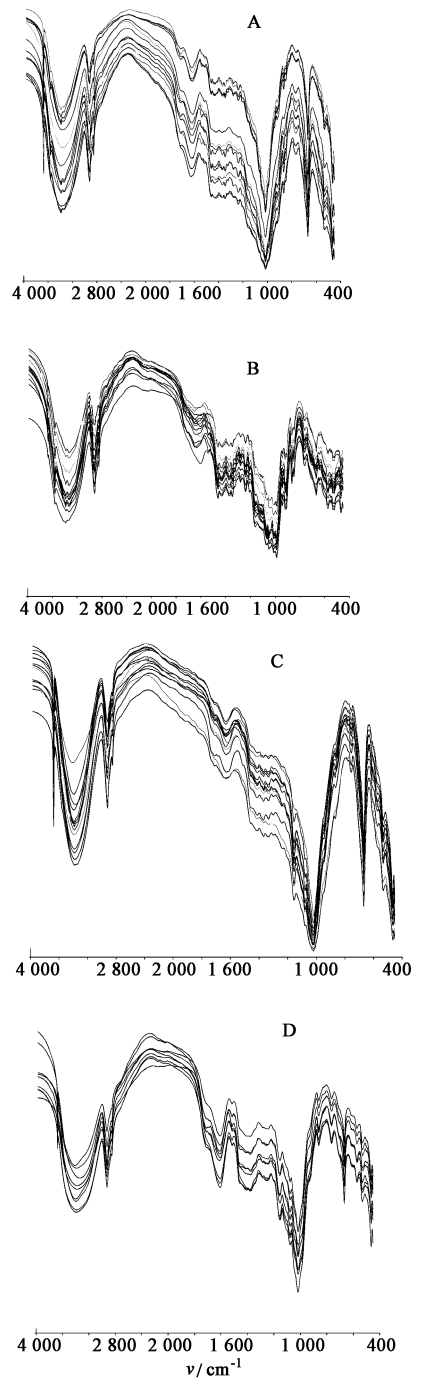
冬凌草片的主要成分冬凌草和辅料淀粉、蔗糖、糊精、硬脂酸镁,研究表明冬凌草的主要有效成分是冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸等。其主要官能团有 $-C=C$, $-COOH$, $-CH$, $-OH$, 酯键, 苷键。根据这几类成分的性质可以把冬凌草片的红外光谱图分为 3 个谱段来比较。第一谱段 $3\ 500 \sim 2\ 800\text{ cm}^{-1}$, 第二谱段 $1\ 800 \sim 1\ 500\text{ cm}^{-1}$, 第三谱段 $1\ 100 \sim 450\text{ cm}^{-1}$ 。

2.1 原始光谱分析 图 1 是 4 个不同厂家样品的红外光谱叠加图,相同厂家之间样品的红外光谱图无论是在峰形、峰位,还是峰强都显示出较高的相似性。在相似性分析中,相同厂家的各个样品之间的相似度都 $>90\%$,不同厂家的样品相似度都 $<90\%$ 。所有样品的特征吸收峰有一定的相似性,主要体现在以下 3 个区段。在 $3\ 400 \sim 2\ 800\text{ cm}^{-1}$ 区段的 $3\ 389\text{ cm}^{-1}$ 附近都有 $-OH$ 的伸缩振动吸收峰, $2\ 920\text{ cm}^{-1}$ 附近都有 $-CH_2$ 的对称伸缩振动, $2\ 851\text{ cm}^{-1}$ 附近有 $-CH_2$ 的不对称伸缩振动。在 $1\ 800 \sim 1\ 500\text{ cm}^{-1}$ 区段的 $1\ 715\text{ cm}^{-1}$ 附近有 $C=O$ 的振动吸收峰。在 $1\ 100 \sim 450\text{ cm}^{-1}$ 区段的 $1\ 015\text{ cm}^{-1}$ 附近有 $C-O$ 的振动吸收, 850 cm^{-1} 附近有 $-CH$ 的面外弯曲振动吸收。由于不同厂家的主要特征吸收峰的位置相近,说明不同厂家的冬凌草片所含主要成分相同。

2.2 不同厂家样品的鉴别

2.2.1 红外原始图谱 由于相同厂家样品的相似度很大,因此可以用 1 个厂家中的 1 个样品来代表此厂家。图 2 是 4 个不同厂家 A1, B1, C1, D1 样品的原始红外光谱图。从整体看样品的红外光谱的主要差别在于 $1\ 016\text{ cm}^{-1}$ 处 A, B, D 3 个厂家样品吸收峰的峰形、峰位和峰强都非常相似,而 C 厂家没有 $1\ 016\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰,并且附近吸收峰的强度相对较弱。因此从原始光谱中我们只能把 C 厂家给鉴别出来。

2.2.2 一阶导数光谱^[10] 一阶导数光谱通过零点处的波长即对应于常规性吸收光谱的最大吸收波长^[11]。导数光谱可以提高分辨率,增大信息量,增强信息的品质,突出谱图的特征性,分辨谱图中重叠的峰。

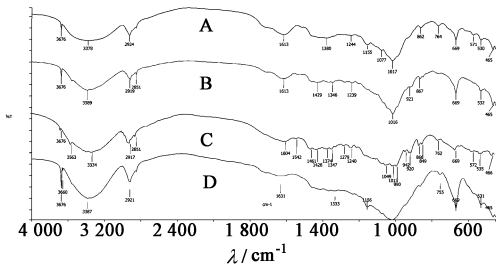


A. 济世药业; B. 安阳华安; C. 三门峡广宇; D. 安阳路德

图 1 不同厂家冬凌草片的红外光谱图

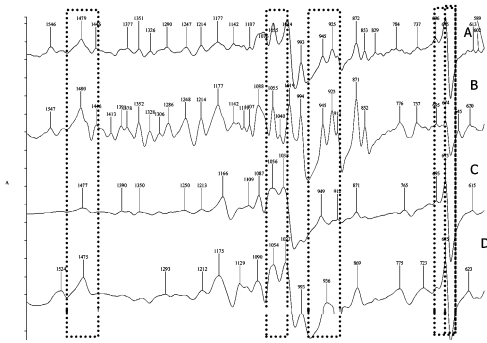
通过比较 4 个厂家的一阶导数图谱发现其差异主要在 $1\ 600 \sim 600\text{ cm}^{-1}$ 区段。见图 3。

图 3 是 4 个厂家的冬凌草片在此区段的一阶导数红外光谱图,其主要不同在于 $1\ 048\text{ cm}^{-1}$ 处 B 厂家有一个肩峰且其峰较强并且在 674 cm^{-1} 处只有 B 厂家的峰较弱。在 $1\ 040\text{ cm}^{-1}$ 和 645 cm^{-1} 处只有 B 厂家有这两个峰,其他 3 个厂家都没有,由以上 4 处可以鉴别出 B 厂家。在 $900 \sim 950\text{ cm}^{-1}$ 区, 936 cm^{-1}



A. 济世药业(A1);B. 安阳华安(B1);
C. 三门峡广宇制药(C1);D. 安阳路德(D1)

图2 不同厂家冬凌草片的红外光谱图



A. 济世药业(A1);B. 安阳华安(B1);
C. 三门峡广宇制药(C1);D. 安阳路德(D1)

图3 不同厂家冬凌草片的一阶导数
红外光谱图(1 600 ~ 600 cm⁻¹)

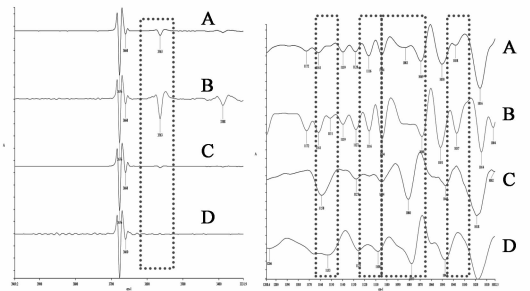
处 D 厂家只有 1 个峰,而其他 3 个厂家都有 3 个明显吸收峰,由此可鉴别出 D 厂家。因此用一阶导数除了能鉴别 B 厂家以外还能鉴别 D 厂家,而其他两个厂家无法鉴别。

2.2.3 二阶导数光谱 导数光谱在红外光谱中的应用主要是二阶导数谱,因为它能够很容易地分辨出隐蔽的叠合谱峰,这对红外光谱中信息的挖掘,如测定峰位和确定肩峰位置非常有效。

通过比较不同厂家样品的二阶导数图谱,其主要差异在 4 000 ~ 3 300 cm⁻¹, 1 200 ~ 1 000 cm⁻¹, 1 000 ~ 850 cm⁻¹和 700 ~ 600 cm⁻¹区段。见图 4,5。

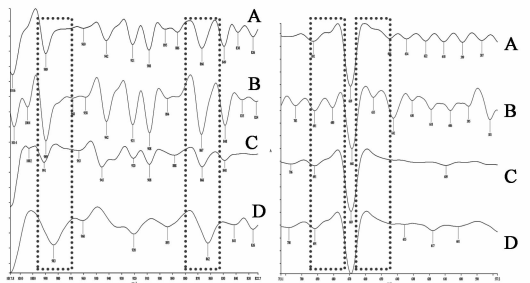
图 4~5 分别是不同厂家的冬凌草片在该区段的二阶导数图谱。在 3 563 cm⁻¹的 -NH 的伸缩振动吸收峰处, A, B 两个厂家有此峰,但是 A 厂家明显比 B 厂家弱,而 C, D 两个厂家没有此峰。在 1 037 cm⁻¹的 C - O 伸缩振动吸收峰、680 cm⁻¹和 655 cm⁻¹的 C = C 的面外弯曲振动吸收峰,在这 3 处 A 厂家都只是一个肩峰, B 厂家都是一个较明显的峰,而 C, D 无峰。由以上 4 处可以鉴别出来 A 厂家的冬凌草片。

在 3 563 cm⁻¹处 B 和 A 厂家有此峰, C, D 没有,但是 B 厂家明显比 A 厂家强,在 1 037 cm⁻¹, 680



A. 济世药业(A1);B. 安阳华安(B1);
C. 三门峡广宇制药(C1);D. 安阳路德(D1)

图4 不同厂家冬凌草片的二阶导数红外光谱
(4 000 ~ 3 300 cm⁻¹)和(1 200 ~ 1 000 cm⁻¹)



A. 济世药业(A1);B. 安阳华安(B1);
C. 三门峡广宇制药(C1);D. 安阳路德(D1)

图5 不同厂家冬凌草片的二阶导数红外光谱
(1 000 ~ 850 cm⁻¹)和(700 ~ 600 cm⁻¹)

cm⁻¹, 655 cm⁻¹ 3 处 B 是一个强峰, A 厂家只是一个肩峰, 而 C, D 两个厂家没有此峰, 在 1 004 cm⁻¹ 处的 C - O 伸缩振动吸收峰, 在此处只有 B 厂家有此峰, 而其他 3 个厂家都没有, 由以上两处可以鉴别出 B 厂家的冬凌草片。

在 1 158 cm⁻¹处只有 C 厂家是单峰,其他厂家都是双峰。在 1 080 cm⁻¹处只有 C 厂家无此峰,而其他 3 个厂家都有此峰。且在这两处的吸收峰都属于 C - O 伸缩振动吸收峰。由以上两处可以鉴别出 C 厂家的冬凌草片。

在 1 117 cm⁻¹的 C - O 伸缩振动吸收峰处只有 D 厂家无此峰,而其他 3 个厂家都有此峰。在 983 cm⁻¹和 862 cm⁻¹的 C = C 的伸缩振动吸收峰处 D 厂家比其他 3 个厂家分别向低波移动了 8, 4 个波数。由以上 3 处可以区别处 D 厂家的冬凌草片。

以上可知用二阶导数可以同时鉴别 4 个厂家。

2.2.4 不同厂家冬凌草片的中红外聚类分析模型的建立^[12] 将 58 份样品的光谱图输入到 OPUS 软件,采用聚类分析方法建立聚类分析模型。考察了不同的光谱预处理方法和建模谱段,通过筛选得到最佳建模条件,采用二阶导数对光谱进行预处理,在 450 ~ 4 000 cm⁻¹区段内的建模效果最好,再结合标

准算法计算样品光谱间的距离获得中红外聚类分析树状图。见图 6。

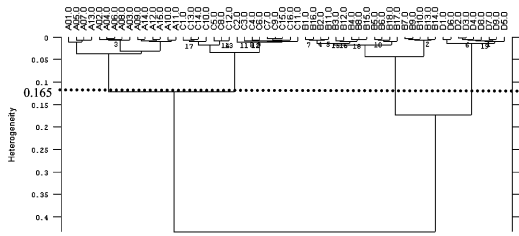


图 6 4 个厂家的冬凌草片的中红外光谱聚类分析树状图

图 6 是不同厂家冬凌草片的中红外的聚类分析图,由图可知,当类间距 > 0.165 时,样品共分为两类,A 厂家和 C 厂家的样品比较相似,被聚为一类,B 厂家和 D 厂家的样品比较相似,被聚为一类,当类间距 > 0.056 而且 < 0.165 时,样品被清晰的聚为 4 类,与实际情况相符。

3 结论

在压片时首先考察不同冬凌草片含量对红外图谱的影响。样品和 KBr 的比例分别为 0.5:100, 0.8:100, 1:100, 1.2:100, 1.5:100, 1.8:100, 2.0:100, 2.5:100 发现 $<$ 比例 2.0:100 的样品的红外光谱的百分透过率全部都在 90% 左右,整个光谱透过率太高,基线较高,比例 2.5:100 的样品整个图谱的透过率全部在 30% 以下,透光率太小,基线太低。而 2% 比例的透光率在 20% ~ 90%,且基线适中,证明此比例是最佳比例。

原始图谱和一阶导数最多只能鉴别出一两个厂家,而二阶导数图谱根据 $3\ 563\ \text{cm}^{-1}$ 的 $-\text{NH}$ 伸缩振动吸收峰, $1\ 158, 1\ 117, 1\ 080, 1\ 037\ \text{cm}^{-1}$ 处的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动吸收峰, $983, 862, 680, 655\ \text{cm}^{-1}$ 处的 $-\text{CH}$ 的面外弯曲振动吸收峰等几处的峰形、峰位、峰强的不同,并同时把 4 个厂家同时鉴别出来。

聚类分析法可以获取中成药这一复杂化学体系的红外光谱整体特征信息的差异,从不同的样本中寻找出决定样本差异的变量,从而达到对不同厂

家复方中药样本进行判别的目的,更为简便且可靠。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:66.
- [2] 谢培山. 中药制剂色谱指纹图(图像)鉴别[J]. 中成药,2000,22(6):391.
- [3] 孙素琴,周群,秦竹. 中药二维相关红外光谱集[M]. 北京:化学工业出版社,2003:428.
- [4] 张芳,张永清,于晓,等. 忍冬不同种质花蕾红外光谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):83.
- [5] 赵花荣,温树敏,王晓燕,等. 金银花道地品与非道地品的 FTIR 光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析,2005,25(5):705.
- [6] 白雁,孙素琴,范克峰,等. 红外二阶导数对地黄及其不同提取部位、炮制品的鉴定[J]. 中草药,2006,37(11):1661.
- [7] 李文渊,童丽,热增才旦,等. 玉树藏药渣驯炮制前后红外光谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):133.
- [8] 刘家水,张丹雁,郑少燕. 4 种不同栽培品系阳春砂红外光谱特征的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):82.
- [9] 李长滨,吴拥军,石杰. 近红外光谱法对不同厂家冬凌草片的判别分析[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(11):197.
- [10] 孙素琴,周群,郁鉴源,等. 分子振动光谱法与中药研究的最新进展[J]. 光谱学与光谱分析,2000,20(2):199.
- [11] 娄雅静,蔡皓,刘晓,等. 傅里叶变换红外光谱快速鉴别当归与硫磺熏蒸当归的研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(8):1127.
- [12] 龚海燕,白雁,宋瑞丽,等. 近红外光谱结合聚类分析鉴别铁棍山药和白山山药[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(9):735.

[责任编辑 顾雪竹]