

FTIR 方法和 HPLC 指纹图谱鉴别不同产地萆薹

张慧文^{1,2}, 宋晓玲², 石松利², 张莎莎¹, 梁越³, 王焕芸^{1*}

1. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010110
2. 包头医学院药学院, 内蒙古 包头 014040
3. 内蒙古自治区人民医院, 内蒙古 呼和浩特 010017

摘要 萆薹是药食同源性中药,也是蒙、藏、维医的习用药材,临床用于治疗胃痛、腹泻等,也被用作香料或调味剂,因此其质量控制非常重要。已报道采用高效液相色谱法检测胡椒碱或萆薹宁,该方法缺乏整体性。傅里叶红外光谱法和 HPLC 指纹图谱联合应用考察 4 个产地 6 批次萆薹,基于共有峰率和变异峰率双指标序列分析萆薹的红外光谱,并建立萆薹的 HPLC 指纹图谱。结果显示两种方法对萆薹的评价结果相互印证,各批次萆薹的化学成分基本相同,质量比较稳定,其中云南产萆薹(S1)与其余 5 批次萆薹有一定差异。红外光谱共有峰率和变异峰率与 HPLC 指纹图谱均能从化学成分的角度评价药材的质量,具有整体性和综合性。萆薹的红外光谱由药材中多种化学成分的红外光谱叠加产生,而指纹图谱仅显示在波长 254 nm 条件下有紫外吸收的化合物,因此红外光谱在分析药材品质中更具有优势。同时考察了胡椒碱和萆薹宁的含量,云南(S1)和海南(S5, S6)较安徽亳州(S2)和广西(S3, S4)低,结果与红外和 HPLC 指纹图谱的结果有一定的差异,提示中药材的质量评价应更注重整体性。将 FTIR 和 HPLC 指纹图谱联合应用于萆薹的质量控制研究,两种方法互为补充,操作简便,样品使用量少,可做为药材快速鉴别的新方法,为萆薹的化学成分、质量控制和开发应用提供研究基础和依据。

关键词 萆薹; 指纹图谱; HPLC; 红外光谱; 质量评价

中图分类号: R282.5 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)01-0174-05

引言

萆薹(*Piper longum* L.)是药食同源性中药,也是蒙、藏、维医的习用药材^[1]。其辛,热,归胃、大肠经。现代药理研究表明萆薹具有抗氧化、降血脂等药理活性,临床常用于治疗胃痛、腹泻等消化系统疾病^[2],日常被用作香料或调味剂。萆薹富含多种酰胺类生物碱,《中国药典》采用高效液相色谱法检测胡椒碱^[3],已有文献报道了其中萆薹宁的含量检测,这些质量控制方法缺乏整体性和创新性^[4]。

中药材以多组分整体入药,其中单个或几个目标成分的检测和控制难以反映药材质量,因此人们采用红外或 HPLC 指纹图谱等方法进行药材的整体性分析。萆薹的 HPLC 指纹图谱具有整体性,可全面反映药材质量,但是需要大量的标准品才能确定其成分含量,萆薹的化学成分中仅胡椒碱有市

售标准品,其余成分均需自行制备。标准品的缺乏制约了萆薹的含量测定和深入研究。而红外光谱具有快速、高效、用量少,操作简便的特点,宏观整体特征性强,可以补充 HPLC 指纹图谱的不足。联合应用傅里叶红外光谱法和 HPLC 指纹图谱对 4 个产地 6 批次的萆薹进行分析,为萆薹的综合质量评价提供一种有效的方法,用以控制中医临床用药质量,并为萆薹的食品安全提供保障。

1 实验部分

1.1 仪器与参数

Thermo Ultimate3000 DGLC 双三元梯度高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher); NICOLET-6700 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Fisher); JP-031S 型超声波清洗仪(中国深圳市洁盟清洗设备有限公司);多功能粉碎机(中国浙江

收稿日期: 2018-10-08, 修订日期: 2019-02-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760782, 81641137), 内蒙古自然科学基金项目(2017BS0806, 2017MS0842), 内蒙古医科大学科技百万工程(联合)项目(YKD2016KJBW(LH)033)资助

作者简介: 张慧文,女,1982年生,内蒙古医科大学药学院讲师 e-mail: bjlemonzhw@126.com

* 通讯联系人 e-mail: whuanyun999@163.com

高鑫工贸有限公司); BT25S型微量电子分析天平(十万分之一, 美国 Sartorius); GenePureUV/UF-TOC超纯水仪(美国 Thermo Fisher)。

1.2 试剂

胡椒碱购自成都曼斯特生物科技有限公司(批号: MUST-17041301, 质量分数 $\geq 98\%$), 茛菪宁为实验室自制。溴化钾为光谱纯, 甲醇为色谱纯, 实验用水为超纯水, 其他试剂为分析纯。

1.3 样品制备

茛菪分别购自于云南、亳州、广西和海南, 经内蒙古医科大学药教研室张慧文博士鉴定为胡椒属植物茛菪。生产批号见表1。

表1 不同产地茛菪的主要信息

Table 1 Informations of *Piper longum* L. from different areas

编号	产地	生产厂家	生产批号
S1	云南	广东天诚中药饮片有限公司	20160802
S2	亳州	大西北药业有限公司	20170306
S3	广西	四川御鼎堂中药饮片有限公司	20160818
S4	广西	亳州市永刚饮片有限公司	20170214
S5	海南	内蒙古腾翔中药饮片有限公司	20141015
S6	海南	内蒙古腾翔中药饮片有限公司	20150805

2.4 HPLC 指纹图谱的测定

精密称取1.0 g 茛菪, 25 mL 70% 甲醇超声提取30 min, 过滤, 得供试品溶液。色谱条件如下: 色谱柱: Welch Ultimate LP-C18 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m, 上海月旭科技股份有限公司); 流速: 1 mL \cdot min $^{-1}$; 进样量: 10 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 254 nm; 流动相甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱(0~8 min, 80%~83% A; 8~11 min, 83%~85% A; 11~15 min, 85%~95% A; 15~30 min, 95% A)。

2 结果与讨论

2.1 茛菪的红外光谱研究

2.1.1 茛菪红外指纹图谱和数据

茛菪药材分别经干燥、粉碎后, 过60目筛, 与KBr粉末混合研磨, 压片, 放入FTIR仪中测定。茛菪药材的红外光

谱较为复杂, 是由多种化学成分的吸收光谱重叠形成。3 000~3 500 cm^{-1} 是由于苯环上C—H的伸缩振动产生的; 2 926 cm^{-1} 附近为不饱和碳上C—H的伸缩振动; 2 855 cm^{-1} 为一—CH₂基的对称伸缩振动; 1 637 cm^{-1} 是烯烃的C—C伸缩振动; 1 558, 1 490和1 445 cm^{-1} 为苯环的特征谱带; 1 253 cm^{-1} 是六氢吡啶环上C—H弯曲振动。

胡椒碱的红外光谱中, 3 009.34 cm^{-1} 是苯环上C—H的伸缩振动; 2 940.40 cm^{-1} 是不饱和碳上C—H的伸缩振动; 1 634.40 cm^{-1} 为较宽的中强吸收峰, 是酰胺基特征吸收峰, 由于共轭造成红移, 强度增加; 1 583.99, 1 491.73和1 448.77 cm^{-1} 为苯环的特征谱带, 由于共轭, 波数降低, 而强度增强; 1 252.93 cm^{-1} 为六氢吡啶环上C—H弯曲振动; 1 611.98 cm^{-1} 是羰基特征吸收峰。茛菪宁的红外光谱中, 3 290.24 cm^{-1} 是N—H伸缩振动吸收峰; 1 645.02 cm^{-1} 为羰基伸缩振动吸收峰; 1 549.92, 1 503.92, 1 489.09 cm^{-1} 为苯环上的骨架C伸缩振动; 2 985.98和2 871.02 cm^{-1} 为烷基上C—H的对称、不对称伸缩振动吸收峰。

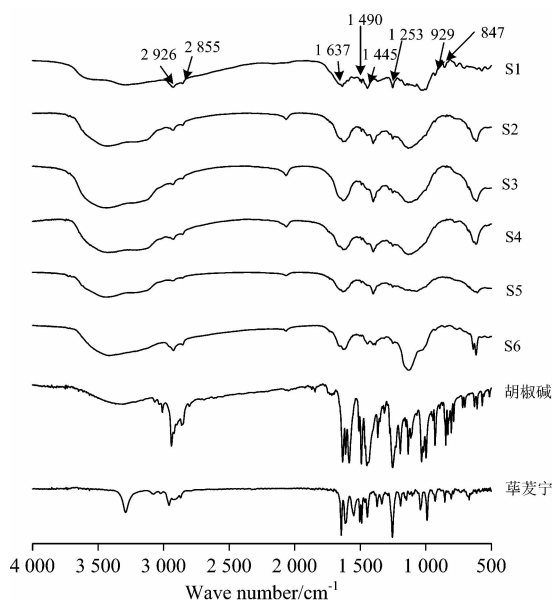


图1 茛菪、胡椒碱和茛菪宁的红外光谱图

Fig. 1 IR spectra of piperine, piperlonguminine and *Piper longum* L. from different areas

表2 不同产地茛菪红外指纹图谱吸收峰

Table 2 Absorption peaks of the infrared spectra of *Piper longum* L. from different areas

样品编号	红外光谱吸收波数/ cm^{-1}							
S1	3 854.6	3 726.95		3 518.88		3 292.8		
S2	3 853.21	3 726.95	3 692.13	3 518.82	3 424.49	3 230.51		
S3	3 932.34	3 880.45	3 856.04	3 724.84	3 515.8	3 424.84	3 226.27	
S4	3 933.4		3 853.43	3 723.99		3 430.74	3 215.78	
S5	3 927.43	3 883.67	3 850.6	3 723.75		3 416.93		
S6	3 933.98	3 886.39	3 853.2	3 726.85	3 697.61	3 443.06	3 215.88	
S1	2 927.37	2 855.3	2 160.94					
S2	2 926.67	2 855.13			2 066.35	1 891.27	1 773.2	1 751.78
S3	2 926.27	2 856.97			2 056.58	1 867.25		

续表 2

S4	2 931.33	2 855.85			2 066.45		1 772.79	1 751.75
S5	2 925.77	2 855.57		2 093.69	2 064.83			
S6	2 926.81	2 854.44			2 067.07	1 871.29	1 773.37	1 751.85
S1		1 655.42	1 637.49	1 614.35	1 592.23	1 545.16	1 503.07	1 490.58
S2	1 734.67	1 654.13	1 632.77	1 617.5		1 546.6	1 503.97	1 491.53
S3	1 737.72	1 658.28	1 622.11	1 613.5		1 558.36	1 516.02	1 490.09
S4	1 733.16	1 651.49	1 632.5	1 624.94		1 560.89	1 512.56	1 491.37
S5	1 734.71	1 654.29	1 630.21			1 560.71	1 504.07	1 491.18
S6	1 734.73	1 654.03	1 632.63			1 560.66	1 511.99	1 491.79
S1	1 445.78		1 387.92	1 367.7	1 319.93		1 253.02	1 194.5
S2	1 448.47	1 401.21	1 386.34		1 316.68	1 276.33	1 252.82	
S3	1 447.32	1 400.94			1 318.07	1 275.86	1 252.58	
S4	1 448.53	1 401.17	1 386.48		1 317.86	1 278.47	1 252.69	
S5	1 445.39	1 401.24	1 385.33		1 319.11		1 251.61	
S6	1 448.98	1 401.3				1 277.53	1 252.73	
S1	1 156.58	1 135.22	1 117.49	1 080.57		1 034.86	1 020.82	998.68
S2		1 134.58	1 115.6					999.32
S3		1 134.61	1 114.2					
S4		1 134.65	1 115.28					
S5		1 134.37						
S6	1 152.76	1 134.92			1 068.43			
S1	929.44	858.16		767.02	703.94	680.77	668.18	646.32
S2	929.97	847.46	831.5	763.82		678.97	668.38	634.74
S3	930.33	847.73	831.83	781.33		678.94	668.07	635.59
S4	930.16	847.25	830.83			679.23	668.31	632.85
S5	929.29	854.25		763.81			668.74	638.81
S6	929.84	847.34	831.08			678.7	668.44	624.02
S1	609.34	573.96	527.09	523.82	480.44	436.61		
S2	615.78		534.84	517.65	474.1			
S3	616.38		536.29		473.63	422.83		
S4	611.48		531.57		461.72	423.66		
S5	616.9	576.91	532.17			428.86		
S6	607.35		531.6	516.62	473.38	427.95		

2.1.2 共有峰率和变异峰率双指标序列

依据红外光谱共有峰率和变异峰率计算公式^[5], 建立萆苳的双指标分析序列(表 3)。广西产萆苳(S3 和 S4)的共有峰率最高为 82%, 亳州(S2)和广西产萆苳(S3 和 S4)的共有峰率均较高, 分别为 79%和 80%; 样品 S6 与样品 S2, S3, S4 共有峰率较高为 73%, 74%, 76%。样品 S1 与其他样品的共有峰率是最低的, 而变异峰率是最高的, 提示 S1 与其他样品的差异较大。

2.2 萆苳的指纹图谱研究

使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012》分析, 标定 17 个指纹图谱共有特征峰, 相似度结果均大于 0.96, 相似度良好。由于 2 号峰(胡椒碱)的重现性和分离度都较好, 峰形对称, 峰面积较大, 因此将胡椒碱的色谱峰定为参照峰(S 峰)。HPLC 指纹图谱结果表明各产地萆苳药材所含成分

基本相同(在 254 nm 下测定), 其中胡椒碱是含量最大的生物碱, 但从峰面积看, 含量大小有所区别。萆苳中胡椒碱和萆苳宁的含量在 4 个产地中, 安徽亳州和广西较高。

3 结 论

同时采用傅里叶红外光谱法和 HPLC 指纹图谱考察 4 个产地 6 批次萆苳, 结果显示两种分析方法对药材评价结果基本一致, 各批次萆苳的化学成分基本相同, 质量比较稳定, 其中云南产萆苳(S1)与其余 5 批次萆苳有一定差异。中药红外光谱中包含多种化学成分的重叠峰, 需要建立共有峰率和变异峰率双指标序列, 从整体上评价药材品质。结果表明红外光谱与 HPLC 指纹图谱均能从化学成分的角度评价药材的质量, 具有整体性和综合性^[6], 指纹图谱仅显示在固

表 3 不同产地萆葇的双指标序列

Table 3 Dual-index sequences of *Piper longum* L. from different areas

序列	P%	Pva%	Pvb%	序列	P%	Pva%	Pvb%	序列	P%	Pva%	Pvb%
S1/S2	58	38	34	S2/S1	58	34	38	S3/S1	55	33	48
S1/S3	55	48	33	S2/S3	79	18	9	S3/S2	79	9	18
S1/S4	53	54	35	S2/S4	80	18	6	S3/S4	82	13	9
S1/S5	49	74	30	S2/S5	57	56	20	S3/S5	69	33	11
S1/S6	45	67	54	S2/S6	73	22	15	S3/S6	74	16	19
S4/S1	53	35	54	S5/S1	49	30	74	S6/S1	45	54	67
S4/S2	80	6	18	S5/S2	57	20	56	S6/S2	73	15	22
S4/S3	82	9	13	S5/S3	69	11	33	S6/S3	74	19	16
S4/S5	67	35	15	S5/S4	67	15	35	S6/S4	76	19	13
S4/S6	76	13	19	S5/S6	59	20	48	S6/S5	59	48	20

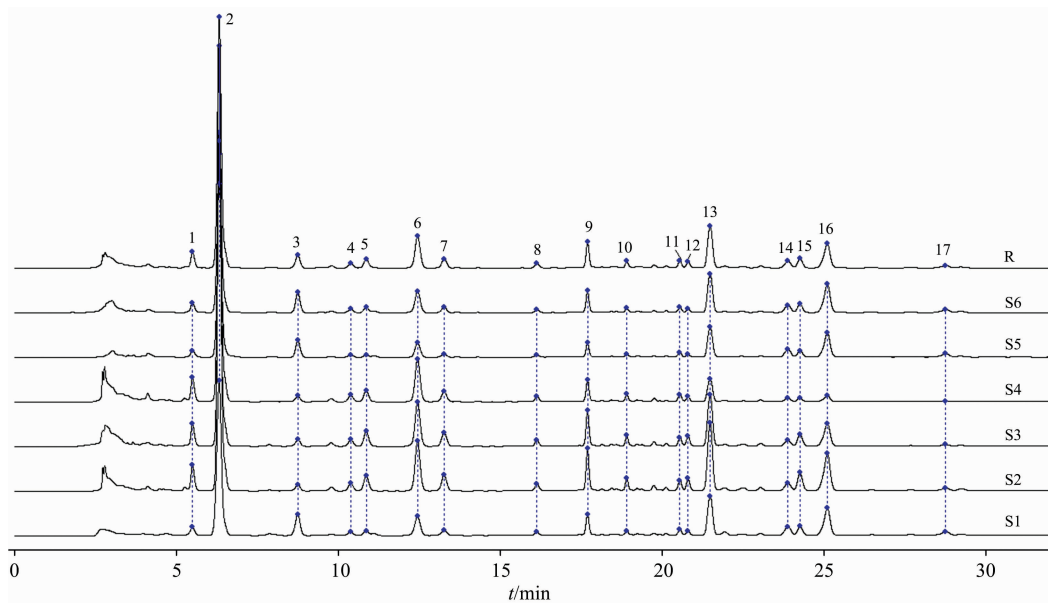


图 2 萆葇的 HPLC 指纹图谱

1: 萆葇宁; 2: 胡椒碱

Fig. 2 HPLC fingerprint and control fingerprint (R) of *Piper Longum* L. from different areas

1: Piperlonguminine; 2: Piperine

表 4 指纹图谱相似度结果

Table 4 HPLC fingerprint similarity of *Piper longum* L. from different areas

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	对照
S1	1	0.987	0.985	0.987	0.998	0.989	0.992
S2	0.987	1	0.999	0.999	0.993	0.999	0.999
S3	0.985	0.999	1	0.998	0.992	0.999	0.999
S4	0.987	0.999	0.998	1	0.992	0.999	0.999
S5	0.998	0.993	0.992	0.992	1	0.994	0.996
S6	0.989	0.999	0.999	0.999	0.994	1	1
对照	0.992	0.999	0.999	0.999	0.996	1	1

表 5 胡椒碱和萆葇宁的含量

Table 5 Contents of piperine and piperlonguminine in 6 batches of *Piper longum* L.

编号	胡椒碱/(mg · g ⁻¹)	萆葇宁/(mg · g ⁻¹)
S1(云南)	39.243	1.498
S2(亳州)	68.248	2.906
S3(广西)	56.092	2.645
S4(广西)	68.564	2.763
S5(海南)	38.255	1.246
S6(海南)	39.335	1.577

定波长条件下有紫外吸收的化合物,同时红外光谱具有多种优点,如操作简便、无化学污染、分析速度快等,因此红外光谱在分析复杂中药的成分体系中更具有优势。

萆葇的 HPLC 指纹图谱显示有 17 个共有峰,其中含量最大的是胡椒碱,相似度结果表明云南产萆葇(S1)与其余 5 批次萆葇差异略大,其结果与红外光谱结果相同。同时进行了主要成分胡椒碱和萆葇宁的含量检测,云南(S1)和海南

(S5, S6)产萆薢中胡椒碱和萆薢宁含量较低, 而安徽亳州(S2)和广西(S3, S4)的含量较高, 与红外光谱和 HPLC 指纹图谱的结果有一定的差异, 说明中药材的质量控制方法应考虑整体性。将红外光谱和 HPLC 指纹图谱联合应用于萆薢的

质量控制研究, 两种方法互为补充, 操作简便, 样品使用量少, 可做为药材快速鉴别的新方法, 为萆薢的化学成分、质量控制和开发应用提供研究基础和依据。

References

- [1] GONGBAO Dong-zhi, LUO Qing-fang, YU Yang-yang, et al(贡保东知, 罗晴方, 余羊羊, 等). China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2018, 43(16): 3368.
- [2] MEI Li, ZHANG Xiao-fei, CHENG Hong-mei, et al(美丽, 张小飞, 陈红梅, 等). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 2018, 49(8): 1957.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典): One Edition. Beijing: China Medical Science Press, 2015. 235.
- [4] BAO Gui-rong, MENG He, HU Chang-feng(宝贵荣, 孟和, 胡长峰). Journal of International Pharmaceutical Research(国际药学研究杂志), 2013, 40(1): 108.
- [5] YANG Bo, ZHANG Juan-juan, SUN Sheng-jie, et al(杨波, 张娟娟, 孙胜杰, 等). Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志), 2017, 37(3): 438.
- [6] ZHOU Ye, LI Wei, HAN Li-feng, et al(周晔, 李薇, 韩立峰, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2015, 35(4): 1056.

Identification of *Piper longum* L. from Different Areas by FTIR and HPLC Fingerprint Methods

ZHANG Hui-wen^{1, 2}, SONG Xiao-ling², SHI Song-li², ZHANG Sha-sha¹, LIANG Yue³, WANG Huan-yun^{1*}

1. Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010110, China

2. Baotao Medical College, Baotou 014040, China

3. Inner Mongolia People's Hospital, Huhhot 010017, China

Abstract *Piper longum* L. is an edible Traditional Chinese Medicine (TCM), and used as mongolian, tibetan and uyghur medicines, and listed in the Chinese Pharmacopoeia to treat disease, such as stomachache and diarrhoea, which is also used as spice and flavoring. Active Ingredients in *Piper longum* L. are amide alkaloids. While reported articles mostly focus on the contents of piperine or piperlonguminine by high performance liquid chromatography, and the quality control method is relatively simple and lack of holism and innovation. This paper analyzed six batches of *Piper longum* L. from four areas by FTIR and HPLC fingerprint. The common peak ratio and variant peak ratio were calculated by FTIR spectroscopy of the six samples, and the dual index sequence of common peak ratio and variant peak ratio were established. Entire compositions of *Piper longum* L. were analyzed by HPLC fingerprint, and the contents of piperine or piperlonguminine were listed. The result showed that the evaluation results of the samples by the two methods were mutual corroboration. Six batches of *Piper longum* L. contained similar compositions with relatively stable quality. Among them, *Piper longum* L. rised in Yunnan (S1) was different from the other five batches. Results showed that common peak ratio and variant peak ratio of IR could evaluate the quality of the compositions in TCM integrally and comprehensively, as well as HPLC fingerprint. while the HPLC fingerprints only showed the compounds with ultraviolet absorption at 254 nm. Therefore, IR was suitable to analyze the composition system of complex TCM. The absorption peak strength and peak shape in the IR are the results of the interaction of various functional groups and generated by the superposition of various chemical components in the infrared spectrum of *Piper longum* L., The HPLC fingerprint of *Piper longum* L. showed 17 common peaks and the similarity verified the results of IR. Contents of piperine and piperlonguminine were higher in *Piper longum* L. from Bozhou and Guangxi than Yunnan and Hainan, and results demonstrated single component was difficult to represent the entire quality of TCM. This paper reported the FTIR and HPLC fingerprint methods in the quality control of *Piper longum* L. for the first time, and the two methods were simple and rapid with small usages, and complemented each other. The methods provided research basis for chemical compositions, quality controls, developments and application of *Piper longum* L., and probed the influence of planting resources on herbal medicines.

Keywords *Piper longum* L.; Fingerprint; HPLC; IR spectra; Quality evaluation

* Corresponding author

(Received Oct. 8, 2018; accepted Feb. 22, 2019)