

甘草的红外光谱研究

索婧侠¹, 孙素琴², 王文全^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 清华大学化学系, 北京 100084

摘要 利用傅里叶变换红外光谱法对 59 份来自中国 6 个不同产地的野生和栽培甘草原药材及其提取物进行了分析研究。通过比较甘草原药材及其提取物与甘草的指标成分甘草酸和甘草苷的一维及其二阶导数光谱, 发现 $1\ 100\sim 1\ 000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的峰是甘草多糖类成分的特征峰; $1\ 318\text{ cm}^{-1}$ 是草酸钙的特征峰; $1\ 745$, $1\ 386$ 和 $1\ 612$, $1\ 512\text{ cm}^{-1}$ 分别是甘草酸和甘草苷的特征指纹峰; 特征峰的强度可代表相应化学成分的含量。根据上述特征峰强弱对所有样品进行横纵向比较, 结果显示: 野生甘草特征峰强, 相应指标成分含量高; 栽培甘草特征峰弱, 相应指标成分含量低; 甘草药材质量与生长年限密切相关。

关键词 甘草; FTIR; 甘草苷; 甘草酸; 甘草多糖

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)05-1218-06

引言

《中华人民共和国药典》(2005 年版)记载药用甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根及根茎^[1]。习惯认为产于内蒙古伊克昭盟杭锦旗一带的“梁外草”及产于宁夏巴盟阿拉善左旗的“王爷地草”品质最优, 为地道药材^[2]。

在甘草的化学成分研究中, 主要研究对象有: 甘草甜素类 (Glycyrrhizin)、甘草多糖类 (Glycyrrhiza polysaccharide) 和甘草黄酮类 (Glycyrrhiza flavonoides)^[3-11]。甘草酸是最主要的甘草皂苷成分, 药典要求不低于 2%。研究者已发现了 10 大类 160 多个甘草黄酮类化合物^[3]。甘草苷是最主要的甘草黄酮类成分。2005 年中国药典添加甘草苷作为甘草的质量控制指标之一, 含量不得少于 1%。甘草中甘草多糖类成分的含量在 11%~15%^[2]。

由于野生甘草资源紧张, 导致栽培产品的需求剧增, 对质量监测和相关分析技术的要求也越来越高。在甘草质量评价研究中, 经常采用高效液相测定分析方法^[12-14]。此外也有利用红外和紫外光谱技术, 以双指标序列法对甘草水提物和氯仿提取物进行研究^[15, 16]。虽然结果证明这些方法是准确可靠的, 但是操作实施上都存在着明显的缺陷: 费时、繁琐。

近年来, 已有多篇报道证明利用红外光谱技术可对中药

材原粉进行无损的质量检测, 重复性和稳定性好, 实验结果可靠有效^[17-19]。因此本文选择红外光谱分析技术研究不同来源的甘草, 期望可以研究出更加快速方便的测定方法用于甘草的质量监控。

1 材料与仪器

1.1 仪器设备和参数设置

采用 Perkin Elmer 公司的 Spectrum One 傅里叶变换红外光谱仪, 硅碳棒光源, DTGS 检测器, 4 cm^{-1} 分辨率, 16 次扫描累加, $4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 光谱范围。

1.2 样品来源和试剂

样品来源: 所有甘草样品均为 2008 年 7 月~2008 年 9 月本课题组成员在中国境内亲自采集得到, 由王文全鉴定, 见表 1。

对照品来源: 甘草苷, 购于上海融禾医药科技有限公司, 甘草酸铵, 淀粉, 蔗糖, 草酸钙均购于化学试剂公司。

本实验所用试剂均为分析纯。

2 样品制备与数据处理

2.1 样品制备

将甘草样品粉碎, 过 80 目筛, 干燥, 称取甘草样品 200

收稿日期: 2009-05-10, 修订日期: 2009-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30572328) 资助

作者简介: 索婧侠, 1984 年生, 北京中医药大学中药学院硕士研究生

e-mail: suojingxia@hotmail.com

*通讯联系人 e-mail: wwq57@126.com

Table 1 Information of samples

名称	产地	数量
栽培两年生乌拉尔甘草	内蒙古鄂托克前旗上海庙	3 份
野生乌拉尔甘草	内蒙古鄂托克前旗上海庙	7 份
栽培两年生乌拉尔甘草	内蒙古杭锦旗巴音乌素	3 份
野生乌拉尔甘草	内蒙古杭锦旗巴音乌素	13 份
栽培八年生乌拉尔甘草	内蒙古乌审旗无定河镇	3 份
野生乌拉尔甘草	内蒙古乌审旗无定河镇	7 份
栽培七年生乌拉尔甘草	宁夏灵武市马家滩	3 份
野生乌拉尔甘草	宁夏灵武市马家滩	4 份
野生乌拉尔甘草	宁夏吴忠市红寺堡开发区红寺堡镇	8 份
栽培三年生乌拉尔甘草	宁夏吴忠市红寺堡开发区红寺堡镇	1 份
野生乌拉尔甘草	宁夏盐池县高沙窝	4 份
栽培两年生乌拉尔甘草	宁夏盐池县高沙窝	3 份

mg, 加入 10 mL 60 %乙醇溶液和 30 μ L 氨水, 超声振荡提取 60 min, 抽滤, 取下层澄清液, 用烘干法挥去溶液, 冷冻干燥制成冻干粉。

取甘草原药材和提取物的少量粉末与溴化钾混合, 研磨, 压片, 将成片放进样品槽内进行测定。

2.2 数据处理

通过 Perkin-Elmer 公司 Spectrum v5.0 操作软件得到红外光谱图及其二阶导数谱图。所有光谱都进行了预处理, 包括基线校正、自动平滑和 4 000 cm^{-1} 处归一化。每个产地野生或者栽培样品的平均谱均采用软件自带的 Spectrum Calculator 功能。相似度比较采用 Compare 功能。

3 实验结果与讨论

3.1 红外光谱解析

图 1 显示的是甘草原药材样品和草酸钙的一维光谱图。二阶导数谱可以提高分辨率, 提供更丰富的信息, 见图 2。从上图中可以看出草酸钙的特征峰在甘草原药材的一维和二阶导数谱中均能很好地对应。1 622, 1 318, 780, 667, 517 cm^{-1} 处的峰体现了草酸钙的存在, 这与甘草的显微鉴定结果相符^[20]。1 318 cm^{-1} 是草酸钙的第二大强峰, 具有专属性, 可为草酸钙的特征峰, 其峰强可以用来判断草酸钙的含量。

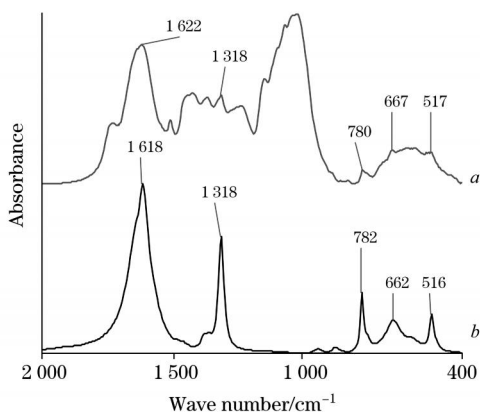


Fig 1 IR spectra of a herbal sample b calcium oxalate

观察图 1a 可以发现 1 700 ~ 1 600 cm^{-1} 和 1 200 ~ 1 000 cm^{-1} 这两个区域为甘草的两大特征区。1 200 ~ 1 000 cm^{-1} 主要为甾醇类和多糖 C—O 伸缩振动^[21]。图 3 为甘草样品在 1 200 ~ 400 cm^{-1} 的一维光谱。当甘草药材在 1 020 cm^{-1} 左右出峰时, 甘草样品与淀粉在 1 200 ~ 400 cm^{-1} 范围内可以很好的对应, 推断此时甘草样品中淀粉含量较高, 见图 3(a)。甘草样品提取后的红外光谱[图 3(b)]显示 1 020 cm^{-1} 的峰蓝移了 27 个波数左右到 1 047 cm^{-1} 附近, 且 995 cm^{-1} 处出现明显的肩峰, 925 cm^{-1} 处的峰也变得尖锐, 而 1 150 cm^{-1} 左右的峰消失。通过与蔗糖进行光谱比对发现, 此时多糖类成分多为蔗糖。

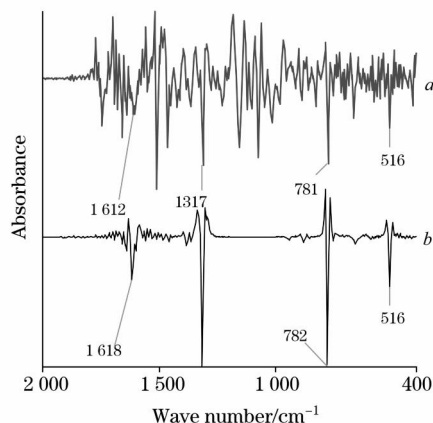


Fig 2 Second derivative spectra of a herbal sample b calcium oxalate

1 700 ~ 1 600 cm^{-1} 主要为与芳香环相连的 C=O 的伸缩振动及酰胺化化合物的特征吸收谱带 和甾醇类中 C=O 伸缩振动的吸收峰^[22]。考虑到甘草中的化学成分, 推测该区域应为甘草黄酮的特征区。甘草苷结构式见图 4(a)。图 5 显示的是杭锦旗野生甘草样品及其提取物、甘草苷、甘草酸铵的一维红外谱图比较。甘草样品及其提取物谱图进行了平均化处理。在提取以前, 样品在 1 731, 1 615 和 1 512 cm^{-1} 处有峰。提取后, 1 615 cm^{-1} 处的峰红移了 5 个波数至 1 609 cm^{-1} , 而 1 512 cm^{-1} 处的峰不变, 1 731 cm^{-1} 左右的肩峰消失。提取后样品的峰位 1 609 和 1 512 cm^{-1} 都与甘草苷对照

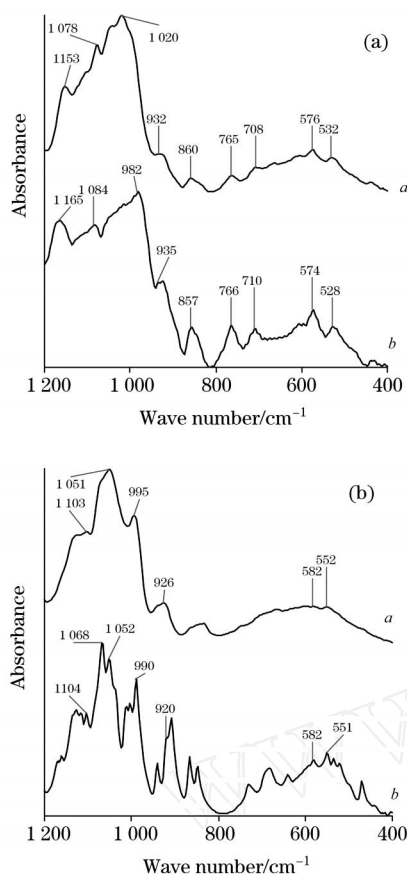


Fig 3 IR spectra of (a) : a herbal sample, b starch, (b) : a extract sample; b sucrose

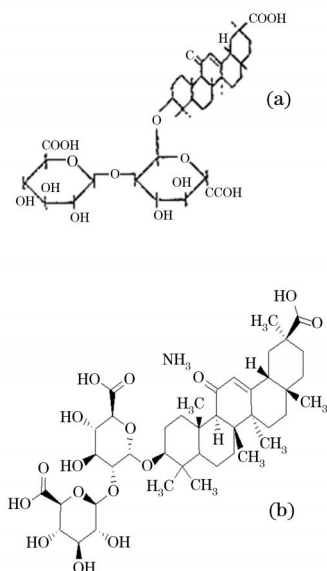


Fig 4 Liquiritin (a) and monoammonium glycyrrhizinate (b)

品一致, 见图 5。因此证明 $1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 范围内的主峰越接近 1609 cm^{-1} 时, 判断该样品中所含的甘草苷的含量越高。 1512 cm^{-1} 可作为甘草黄酮类成分的特征峰位。

图 5 显示甘草原药材 1731 cm^{-1} 处肩峰与甘草酸铵对照

品[结构见图 4(b)]极相似。峰的叠加导致从甘草药材的一维原谱中无法看出甘草酸其他专属性的特征峰的存在。所以将图谱进行二阶导数变换, 增加图谱的分辨率。图 6 为甘草样品与对照品的二阶导数图谱, 显示 $1745, 1648, 1467, 1386, 1362, 1213 \text{ cm}^{-1}$ 等处的峰可体现甘草酸铵的存在, 尤以 1745 和 1386 cm^{-1} 处的峰特异性最强; $1649, 1612, 1577, 1512, 1468, 1311, 1286, 1229 \text{ cm}^{-1}$ 等处的峰可体现甘草苷的存在, 其中的 1512 和 1612 cm^{-1} 处的峰依然是甘草苷最具代表性的特征峰。所以, 1745 和 1386 cm^{-1} 处的峰越强, 甘草酸含量越高; 1612 和 1512 cm^{-1} 处的峰强则可以代表甘草苷的含量。

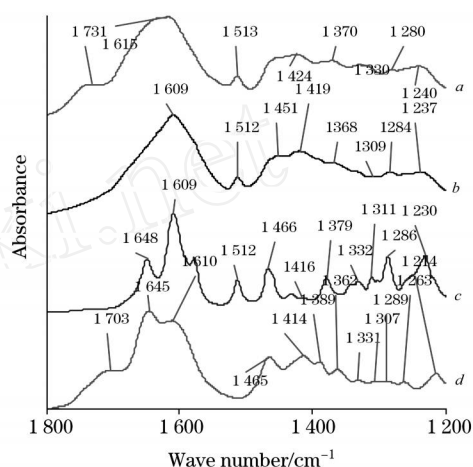


Fig 5 IR spectra of herbal sample a, extract sample b, liquiritin c and monoammonium glycyrrhizinate d

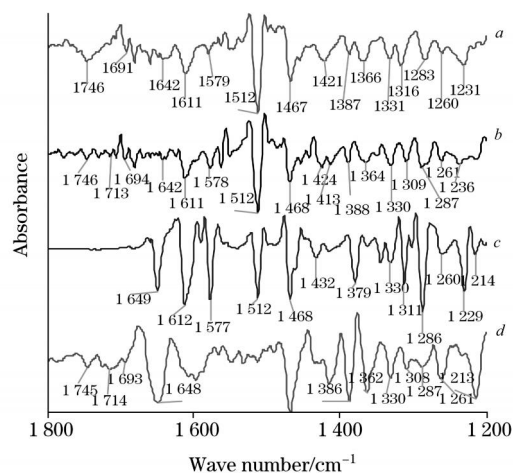


Fig 6 Second derivative spectra of herbal sample a, extract sample b, liquiritin c and monoammonium glycyrrhizinate d

3.2 不同来源甘草的质量比较

不同来源的甘草样品的全光谱图整体峰貌一致, 说明主要成分一致, 但主要区域的峰位和峰强有所变化, 提示主要成分的构成比例和含量有所变化。从图 7 中可以看见, 内蒙古杭锦旗的野生和栽培甘草存在很大差别。野生甘草在 1615 和 1048 cm^{-1} 处出峰, 1731 cm^{-1} 处的峰较强, 而栽培

甘草在 $1\ 638$ 和 $1\ 020\ \text{cm}^{-1}$ 附近出峰, $1\ 735$ 和 $1\ 318\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰较弱。二阶导数图谱(图8)显示特征峰峰强差异更明显。图8显示野生甘草比栽培甘草更能体现甘草苷和甘草酸的存在,特征峰峰强度更大;野生甘草 $1\ 316\ \text{cm}^{-1}$ 峰更强说明草酸钙含量更高。因此判断内蒙古杭锦旗野生样品的甘草酸和甘草苷成分较高,含有草酸钙;该产地的栽培样品甘草苷和甘草酸较低,多糖类成分主要为淀粉,草酸钙少或无。

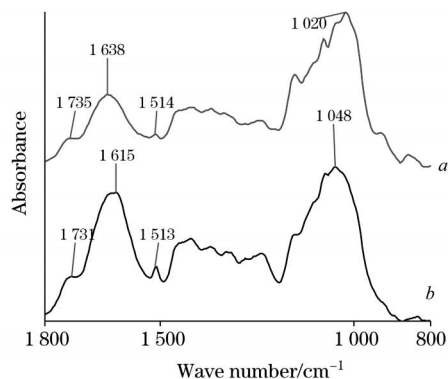


Fig 7 IR spectra of herbal samples of cultivated a and wild b radix glycyrrhizae from Hang Jin Qi, inner Mongolia Autonomous Region

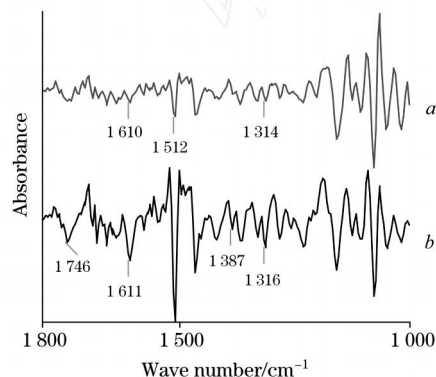


Fig 8 Second derivative spectra of herbal samples of cultivated a and wild b radix glycyrrhizae from Hang Jin Qi, Inner Mongolia Autonomous Region

同一产地的野生或栽培样品通过 Spectrum V5.0 软件分别得到对应的平均谱图。然后,用上述方法对所有样品进行分析。不同产地的野生和栽培甘草样品的二阶导数平均谱图见图9。

对所有样品进行野生-栽培的横向比较,见图9,结果为:杭锦旗栽培样品淀粉含量多,甘草苷和甘草酸含量少,野生样品双指标成分含量都比栽培样品高,草酸钙也多;鄂托克前旗野生样品甘草酸和甘草苷含量稍高于栽培,草酸钙差异不明显;乌审旗栽培样品指标成分和草酸钙稍高于野生样品;高沙窝的野生样品甘草酸和甘草苷含量高于栽培,明显含有草酸钙,栽培样品淀粉含量高;红寺堡野生样品指标成分可能高于栽培;马家滩野生和栽培甘草指标成分含量相差明显,野生样品草酸钙较多。

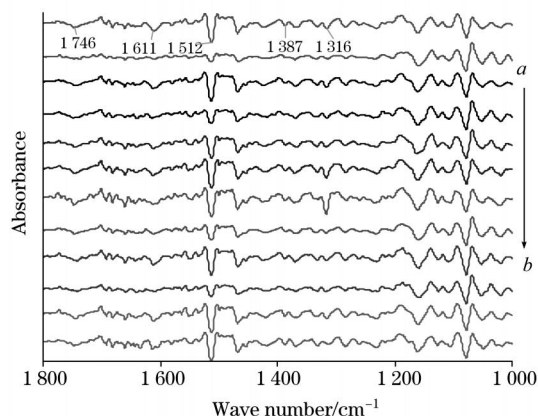


Fig 9 Second derivative average spectra of the wild a and cultivated b samples in Hang Jin Qi of inner Mongolia autonomous region; wild c and cultivated d samples in E Tuo Ke Qian Qi of inner Mongolia autonomous region; wild e and cultivated f samples in Wu Shen Qi of inner Mongolia autonomous region; wild g and cultivated h samples in Gao Sha Wo of Ningxia province; wild gig and cultivated j samples in Hong Si Bao of Ningxia province; wild k and cultivated l samples in Ma Jia Tan of Ningxia province

对所有样品进行不同产地野生-野生的纵向比较,见图9,结果为:6个产地的野生样品的有效成分含量很相近,宁夏高沙窝的甘草苷含量低于其他产地,但甘草酸含量不低,草酸钙明显最多;内蒙古鄂托克前旗的甘草酸含量可能稍低于其他地方。以杭锦旗野生样品为参照,考察其他野生样品的与之的相似度。相似度值多在0.9以上,暗示野生样品质量较稳定。

对所有样品进行不同产地栽培-栽培的纵向比较,见图9,结果为:甘草苷含量高低顺序为:内蒙古乌审旗和宁夏马家滩>宁夏高沙窝>内蒙古鄂托克前旗、宁夏红寺堡>内蒙古杭锦旗;甘草酸含量高低顺序为:内蒙古乌审旗和宁夏马家滩>宁夏高沙窝和内蒙古鄂托克前旗>宁夏红寺堡>内蒙古杭锦旗;乌审旗的草酸钙含量明显高于其他产地。除内蒙古乌审旗和宁夏马家滩样品外,其余样品与参照野生甘草谱图的相似度<0.9。综合6个产地栽培样品认为内蒙古乌审旗和宁夏马家滩的栽培样品质量最好;不同产地的栽培样品差异较大。因为内蒙古乌审旗和宁夏马家滩的栽培样品的生长年限为7~8年,其质量明显优于2~3年生栽培甘草,所以再一次证明生长年限的把握对于栽培优质甘草的重要作用。

4 结 论

一维谱图中的 $1\ 100 \sim 1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 处的特征峰可以用来判断甘草多糖类成分是否多为淀粉。 $1\ 318\ \text{cm}^{-1}$ 处的特征峰强可用于判断草酸钙的含量。黄酮类成分甘草苷特征性的苯环振动峰 $1\ 512\ \text{cm}^{-1}$ 可以作为其含量的评判依据。一维谱图

中甘草酸铵除 $1\,745\text{ cm}^{-1}$ 附近的肩峰外的大部分特征峰被叠加掩盖, 已不具有特征性。因此尝试通过导数变换增加分辨率, 然后将甘草样品与甘草酸铵对照品进行比较。结果发现在二阶导数谱中 $1\,386\text{ cm}^{-1}$ 处的峰也具有特征性, 可用于确定甘草原药材中甘草酸的含量高低的判断依据。

用此种方法评估 59 份来自中国 6 个产地的野生和栽培甘草样品的质量, 结果显示野生甘草特征峰强, 质量较好且稳定; 栽培甘草特征峰弱, 质量较差; 甘草药材质量与生长年限密切相关。提议选取优质杭锦旗野生样品制作标准甘草药材红外谱图, 然后将被测样品的红外谱图与标准谱图进行相似度比较; 比较时选用一维二阶导数谱图可以增加判断的准确性。当相似度值 > 0.9 时, 被测样品可归为野生甘草或

者质优的栽培甘草, 反之则为质次的栽培甘草。

本文所建立的用红外光谱技术快速确定甘草质量的方法初步被证明是可靠有效的。随着有机溶剂的价格不断攀高, 红外光谱技术在费用消耗上占有绝对优势。同时红外光谱技术在操作事实上也更为简便, 不用对药材进行预处理, 而且由于重复性和稳定性强, 量化指标更容易把握, 所以在准确性上更胜一筹。如能得到推广, 必将使我国甘草的质量监控更趋精细化, 微观化, 甚至对整个中药分析方法的现代化起到一定的推动作用, 并且能够节省大笔的经费开支, 产生良好的社会经济效益。

致谢: 感谢练晶军和张学静帮助收集本文所用样品。

参 考 文 献

- [1] Pharmacopoeia Committee of Healthy Ministry of the People's Republic of China(中华人民共和国卫生部药典委员会编). The Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中国药典 2005 年版·1 部). Beijing: Press of People's Health(北京: 人民卫生出版社), 2005. 59.
- [2] FENG Wei(冯 薇). Thesis for Master Degree of Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学硕士研究生学位论文). 2007.
- [3] QIAO Zhong-he, HU Zi-ru(乔仲和, 胡自如). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 1997, 28(9): 522.
- [4] Meng Xiangyu, Li Huilin, Song Fengrui, et al. Chin. J. Chem., 2009, 27(2): 299.
- [5] Zhongping John Lin, Sheng-Xiang Qiu, Aisya Wufuer, et al. Journal of Chromatography B, 2005, 814: 201. 207.
- [6] Ding Xi-ping, Wang Min, Chen Hong-li, et al. Lanzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, 2008, 44(6): 65.
- [7] Nikolaeva S S, Boiko B N, Bykov V A, et al. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2007, 41(8): 434.
- [8] Zhu Shu, Sugiyama Reiko, Batkhui Javzan, et al. Journal of Natural Medicines, 2009, 63(2): 137.
- [9] Baek Ju-Young, Lee Jung-Min, Lee Seung-Cheol. Separation and Purification Technology, 2008, 63(3): 661.
- [10] Cheng Anwei, Wan Fachun, Jin Zhengyu, et al. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 118(1): 59.
- [11] Hennell J R, Lee S, Khoo C S, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 47(3): 494.
- [12] YAN Yong-hong, WANG Wen-quan, YANG Na(闫永红, 王文全, 杨 娜). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2006, 31(11): 926.
- [13] HE San-min, SHI Sen-lin(何三民, 石森林). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 2003, 34(7): 618.
- [14] Risner Charles H. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2008, 31(9): 1337.
- [15] ZOU Hua-bin, YUAN Ji-rong, DU Ai-qin, et al(邹华彬, 袁久荣, 杜爱琴, 等). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2005, 30(1): 16.
- [16] ZOU Hua-bin, YUAN Ji-rong, DU Ai-qin, et al(邹华彬, 袁久荣, 杜爱琴, 等). Chinese Traditional Patent Medicine(中成药), 2004, 26(10): 779.
- [17] SUN Su-qin, LIANG Xi-yun, YANG Xian-rong(孙素琴, 梁曦云, 杨显荣). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2001, 29(5): 552.
- [18] Pei Likuan, Sun Suqin, Guo Baolin, et al. Spectrochimica Acta Part A, 2008, 70: 258.
- [19] Liu Hongxia, Zhou Qun, Sun Su-qin, et al. Journal of Molecular Structure, 2008, 883-884: 38.
- [20] Committee of Identification of Chinese Medicine(中药鉴定学编委会编). Identification of Chinese Medicine(中药鉴定学). Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine(北京: 中国中医药出版社). 2003. 126.
- [21] GUO Xi-hua, GUAN Ying, YANG La-hu, et al(郭西华, 关 颖, 杨腊虎, 等). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2008, 33(16): 2005.

Application of FTIR Spectroscopy to the Identification of *Glycyrrhiza Uralensis* Fisch

SUO Jing-xia¹, SUN Su-qin², WANG Wen-quan^{1*}

1. College of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract Fourier transform infrared spectroscopy with a spectra range of 4 000-400 cm^{-1} was used to identify fifty nine samples of wild or cultivated *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. from six different places around China. The 1D spectra and their second derivative spectra of herbal samples, the corresponding extract samples and two marker compounds (glycyrrhizic acid and liquiritin) were compared. The wide peak in 1 100-1 000 cm^{-1} was used to identify the components of polysaccharide; the peak at 1 318 cm^{-1} mainly belonged to calcium oxalate; the peaks at 1 745 and 1 386 cm^{-1} were used to assess the content of glycyrrhizic acid; the peaks at 1 612 and 1 512 cm^{-1} were the characteristic peaks of liquiritin. The intensity of characteristic peaks can represent the content of corresponding compound. The horizontal and vertical comparisons of all herbal samples showed that the characteristic peaks of wild samples were strong, and all wild samples had the similar quality; the characteristic peaks of cultivated samples were weaker than those of the wilds; the ages of glycyrrhiza had great effect on the quality of samples

Keywords Glycyrrhiza; FTIR; Liquiritin; Glycyrrhizic acid; Polysaccharide

(Received May 10, 2009; accepted Aug. 20, 2009)

* Corresponding author