

老鹳草及其不同溶剂萃取物的红外光谱分析与鉴定

孙仁爽¹, 赵敏婧², 顾地周¹

1. 通化师范学院医药学院 长白山天然药物重点实验室, 吉林 通化 134001

2. 梅河口市食品药品检验检测中心, 吉林 梅河口 135000

摘要: 目的 对老鹳草 *Geranium wilfordii* 及 70%丙酮提取不同溶剂萃取物的主体成分、特定成分进行快速的分析与鉴定。方法 采用红外光谱、二阶导数光谱结合二维相关红外光谱对老鹳草及其 70%丙酮提取不同溶剂萃取物进行分析鉴定。结果 红外宏观指纹分析结果发现老鹳草原药材含有 1730、1618~1445、1337 cm^{-1} 等特征谱线, 主要归属于老鹳草素及其衍生物的鞣质类化合物的特征吸收。通过分析不同极性萃取物, 可以快速获知老鹳草素及其衍生物的富集情况和发现亚硝酸钾的前体硝酸钾的存在和分布情况。光谱分析结果表明, 醋酸乙酯层、正丁醇层萃取物与老鹳草素相关系数分别为 0.944 3、0.930 2, 验证大量老鹳草素及其衍生物的存在, 及其主要集中在该两层; 在氯仿层、醋酸乙酯层和水层提取物中有硝酸钾特征吸收峰, 以水层最明显。结论 红外光谱不仅可以对主要有机成分(鞣质、黄酮和多糖类等)进行检测分析, 同时可对硝酸钾为代表的无机盐进行快速检测, 在中药质量与安全的分析评估中其有广阔的应用前景。

关键词: 老鹳草; 红外光谱; 二维相关红外光谱; 老鹳草素; 硝酸钾

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)13-4329-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.026

Analysis and identification of *Geranium wilfordii* and its extracts with different solvents by infrared spectroscopy

SUN Ren-Shuang¹, ZHAO Min-jing², GU Di-Zhou¹

1. Medical College, Tonghua Normal University, Changbai Mountain Key Laboratory for natural medicine, Tonghua Normal University, Tonghua 134001, China

2. Mei he kou Food and Drug Control, Meihekou 135000, China

Abstract: Objective transform infrared spectroscopy (FT-IR) combined with second derivative spectroscopy and two-dimensional correlation infrared spectroscopy (2D-COS) were employed to identify and analyze the main components of *Geranium wilfordii* Maxim. and its multi-level extracts. The emergence of characteristic absorption peaks (1 730, 1 618~1 445 and 1337 cm^{-1}) of geraniin suggested that *Geranium wilfordii* Maxim. contained geraniin and its derivatives. By stepwisely analyzing multi-level extracts, the enrichment flow of Geraniin and its derivatives were fast acquired. The presence and distribution profile of potassium nitrite, a precursor of potassium nitrate, were obtained as well. The correlation coefficients with geraniin of ethyl acetate portion and n-butanol portion were 0.9443 and 0.9302. The infrared spectra of the four layers of *Geranium wilfordii* Maxim. acetone extract showed that geraniin and its derivatives were mainly concentrated in ethyl acetate portion and n-butanol portion. The characteristic absorption peaks of potassium nitrate were found in chloroform, ethyl acetate and aqueous portions. The characteristic absorption peaks of potassium nitrate were the most obvious in aqueous portion.

Key words: *Geranium wilfordii* Maxim.; infrared spectroscopy; two-dimensional infrared spectroscopy; geraniin and its derivatives; potassium nitrate

老鹳草是牻牛儿苗科老鹳草属植物老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 的干燥地上部分, 具有祛

风湿、通经络等作用^[1]。老鹳草中主要化学成分为鞣质类、黄酮类等^[2-3], 其中鞣质类成分主要为老鹳

收稿日期: 2023-02-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81973431)

作者简介: 孙仁爽, 男, 硕士生导师, 博士, 研究方向为中药质量控制与评价。E-mail: 804590217@qq.com

草素 (geraniin)。目前, 评价老鹳草质量的方法主要有性状鉴别、TLC 和 HPLC。性状鉴别主观性强, TLC 快速但较为粗略^[4]。HPLC 法虽然可对老鹳草中鞣质类成分如老鹳草素等进行含量测定, 但不能进行宏观整体的成分分析与鉴定, 且预处理繁琐、运行成本高^[5], 目前急需快速、廉价、无损和可靠的检测方法。红外光谱法是化合物结构分析与鉴定的经典方法之一, 主要用来确定化合物分子所含的官能团^[6]。孙素琴等^[7]利用红外光谱法对以中药为代表的混合物体系进行了大量的研究, 证明红外光谱可以宏观整体地对混合物体系进行快速、有效、无损的定性鉴别, 也可以分析多糖类、鞣质类、黄酮类等药物有效成分。本实验采用红外光谱结合二阶导数红外光谱^[8-9]和二维相关红外光谱分析方法, 对老鹳草及其 70%丙酮不同溶剂萃取物进行了快速无损的分析与鉴定, 为老鹳草研究提供了方法和实验数据。

1 材料与仪器

1.1 仪器

Spectrum GX FTIR 光谱仪 (PerkinElmer, Inc.), DTGS 检测器, 光谱分辨率 4 cm^{-1} , 测量范围 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$, 扫描累加 32 次。二维相关光谱所用的变温附件为 Love Control 公司的 Portable Controller 可编程控制单元 (50-886 型), 控温范围 $50\sim 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 样品

老鹳草样品采自吉林通化, 依照《中国药典》2020 年版由通化师范学院医药学院张立秋副教授鉴定为野生的牻牛儿苗科老鹳草属植物老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 的干燥地上部分。

2 方法

2.1 样品制备

将老鹳草干燥后粉碎, 过筛。精密称取 2 g 样品, 加 70%丙酮 24 mL , 超声提取 30 min , 滤过, 减压回收丙酮, 水溶液依次用氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得到氯仿层、醋酸乙酯层、正丁醇层、水层, 减压干燥得到各部分的粉末。

2.2 测定方法

用 KBr 压片法制样, 获得原药材在室温下的红外光谱图^[10]。用 PerkinElmer 公司的 Spectrum v6.02 软件进行二阶导数图谱解析, 平滑点数为 13。另将所压样品装入变温附件, 温度程控 $50\sim 120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 温度从 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 逐步升高, 每升温 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 采集 1 次红外光谱。

2.3 数据处理

实验数据经清华大学分析中心红外光谱组设计的二维相关分析软件处理采集的系列光谱—变温动态谱, 即获得二维红外相关光谱。

3 结果与分析

3.1 原药材主体成分分析

如图 1-a 中老鹳草素红外光谱图所示, 3379 cm^{-1} 处的吸收峰为苯环 O-H 的伸缩振动, 1728 cm^{-1} 处的吸收峰为 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动, 1618 、 1509 、 1446 cm^{-1} 处的吸收峰可能为苯环 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动, 1339 cm^{-1} 处的吸收峰可能为 O-H 弯曲振动, 1204 cm^{-1} 处的吸收峰为 C-O 伸缩振动吸收。如图 1-a 中老鹳草 *Herba Geranii* 红外光谱图所示, 老鹳草中主体成分含有鞣质类、黄酮类成分以及糖类成分。 1730 、 $1618\sim 1445\text{ cm}^{-1}$ 主要归属于老鹳草素及其衍生物的鞣质类物质的吸收峰。在 1337 cm^{-1} 处的吸收峰为酚类分子的 O-H 弯曲振动, 1232 cm^{-1} 为糖类分子 C-O 伸缩振动吸收, 在 1048 cm^{-1} 处的 C-O 强吸收峰则来自于糖苷类成分; 图 1-b 老鹳草二阶导数谱提高了图谱表观分辨率, 原一维图谱中吸收峰被分解成多个峰, 1746 cm^{-1} 处出现酯类分子 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动, 说明原药材中也有少量酯类成分。 $1618\sim 1445\text{ cm}^{-1}$ 苯环骨架振动吸收峰被突显出来, 证实鞣质类以及少量黄酮类成分 (另有 1659 cm^{-1}) 的存在。老鹳草红外谱图主要吸收峰的指认见表 1。

3.2 老鹳草丙酮提取物红外光谱分析

老鹳草中含有以老鹳草素为代表的鞣质类成分, 主要有 O-H、 $\text{C}=\text{O}$ 、苯环等特征官能团, 通过丙酮超声提取可以将老鹳草中鞣质类成分有效地提取出来。

如图 2 所示, 老鹳草丙酮提取物氯仿层、醋酸乙酯层、正丁醇层均有明显的鞣质类成分的特征吸收峰, $3600\sim 2500\text{ cm}^{-1}$ 的 O-H 伸缩振动吸收区域有宽而强的吸收峰, $1728\sim 1714\text{ cm}^{-1}$ 酯类和酸类分子的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动, 和 $1600\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ 有明显的苯环骨架伸缩振动峰, 通过相似度比较可以看出, 醋酸乙酯层、氯仿层、正丁醇层、水层与老鹳草素对照品的相似系数分别为 $0.944\ 3$ 、 $0.930\ 2$ 、 $0.809\ 7$ 、 $0.497\ 0$, 说明醋酸乙酯层中多酚类成分含有较多的老鹳草素, 其次为正丁醇层、氯仿层。二阶导数谱更可清晰表明在氯仿层中有酯羰基吸收峰 (1746 cm^{-1}), 723 cm^{-1} 处吸收峰证明在氯仿层中有油脂类成分, 在醋酸乙酯与正丁醇层中出现更多特

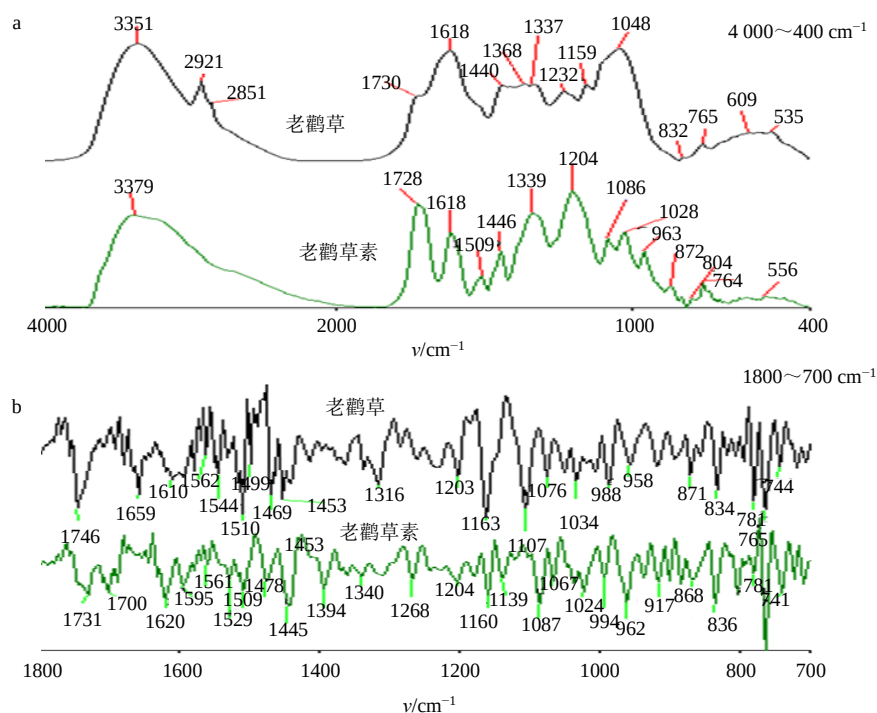


图 1 老鹳草与老鹳草素的红外光谱 (a) 及二阶导数谱 (b)

Fig. 1 FTIR spectra (a) and second derivative infrared spectra (b) of geraniin and *Herba Geranii*

表 1 老鹳草红外谱图主要吸收峰的指认

Table 1 Primary peak assignment of FTIR spectrum of *G. wilfordii*

ν/cm^{-1}	主要基团	振动类型	主要归属
3351	O-H	$\nu_{\text{O-H}}$	鞣质类、糖类
1730	C=O	$\nu_{\text{C=O}}$	鞣质类
1618~1445	苯环 C=C	$\nu_{\text{C=C}}$	黄酮类、鞣质类
1337	O-H	β_{OH}	鞣质类
1232、1048	C-O	$\nu_{\text{C-O}}$	糖(苷)类
1000~800	糖环	γ_{CH}	糖(苷)类

征峰与老鹳草素相对应的鞣质类特征吸收峰;水层中很强吸收峰出现在 1384 、 825 cm^{-1} 的,检索表明其为硝酸钾特征吸收峰^[11]。但是在原药材中未发现硝酸钾的吸收峰,可能是因为在提取过程中对硝酸盐进行了富集,在氯仿层、醋酸乙酯层也相应地发现了硝酸钾吸收峰。硝酸盐为非人体必需的营养物质,在人体内会转化为亚硝酸盐,过多会对人体健康产生危害。因此,中药中硝酸盐的检测很有意义,目前尚未见红外光谱法检测中药硝酸盐的文献报道。

3.3 丙酮提取物的二维相关红外光谱

如图 3 与表 2 所示,老鹳草提取物氯仿层、醋酸乙酯层、正丁醇层与水层 $1800\sim1000\text{ cm}^{-1}$

二维相关红外光谱有数量不等的明显自动峰。在醋酸乙酯层自动峰最多为 10 个,而水层中只出现 2 个,因此可以很直观地区分四者。氯仿层 1701 cm^{-1} 处酯类羰基的吸收峰随温度升高峰强度逐渐降低;醋酸乙酯层与正丁醇层中在 1629 和 1619 cm^{-1} 附近是鞣质类成分相关的吸收峰随着温度升高强度也逐渐减弱。 1779 和 1690 cm^{-1} 处自动峰属于羰基伸缩振动,此处出现的自动峰是因为鞣质类成分由于温度升高而变化过快引起的。氯仿层、醋酸乙酯层、正丁醇层、水层提取物的二维相关谱中均有 NO_3^- (1383 cm^{-1}) 的一个强且尖的自动峰,且与其他自动峰的交叉峰均为负,说明此处在温度微扰下总体变化趋势与其他自动峰变化趋势相反。另外结果表明,正丁醇层中也含有少量的硝酸钾,虽然在其一维图谱和二阶导数图谱并没有与硝酸钾有关的吸收峰出现,验证了二维相关光谱确实可以提高红外光谱的检测限和谱图分辨率。通过 1383 cm^{-1} 自动峰强度及其与其他峰的关系可快速判断硝酸钾的存在和相对含量。

4 讨论

本实验采用分辨率逐级提高的红外光谱、二阶导数谱及二维相关光谱技术^[12]对老鹳草中活性成

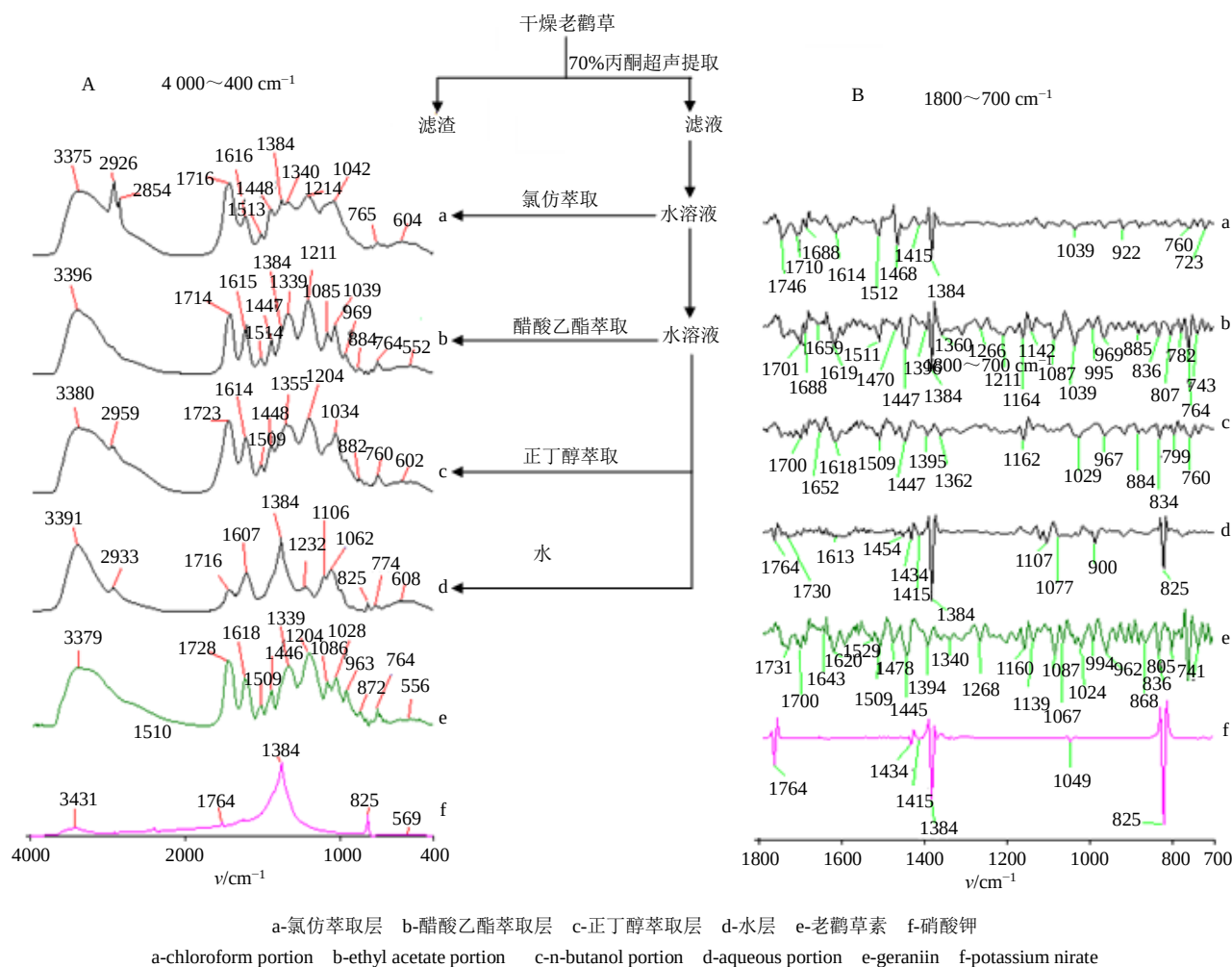


图 2 老鹳草丙酮提取物 4 个萃取层、老鹳草素和硝酸钾的红外光谱 (A) 及二阶导数谱 (B) 及其提取流程示意图

Fig. 2 FTIR spectra (A) and second derivative infrared spectra (B) of four portions of *G. wilfordii* acetone extract, geraniin and potassium nitrate

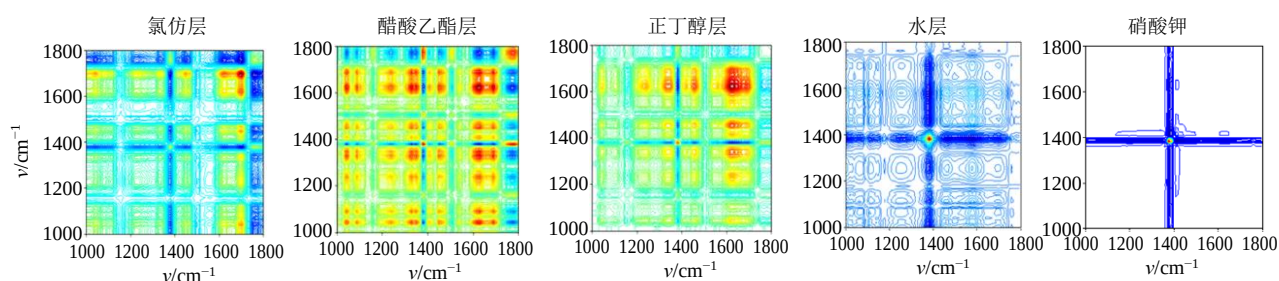


图 3 老鹳草丙酮提取物的 4 个提取层与硝酸钾的二维同步相关红外光谱 (1800~1000 cm^{-1})

Fig. 3 2D-IR synchronous correlation spectra (1 800—1 000 cm^{-1}) of the four portions of *G. wilfordii* acetone extract and potassium nitrate

分的提取分离过程进行了分析。通过以红外光谱法为指导,建立了边分离边分析方法。使用群峰比对和光谱相关系数对老鹳草素和硝酸钾的走向和含量分布进行快速分析和预测,获得了老鹳草药材萃取分离过程中不同水平下(从整体到部分)的整体化学指纹信

息和物质组成的变化规律,结果发现老鹳草及其衍生物等活性成分主要集中在醋酸乙酯层和正丁醇层;硝酸钾主要集中于水层,其他层也有少量分布。老鹳草中检测到的硝酸钾有可能是土壤中的硝酸钾复合被老鹳草吸收导致。

表 2 老鹳草丙酮提取物的 4 个萃取层与硝酸钾的二维相关红外光谱 (1800~1000 cm⁻¹) 自动峰

Table 2 Autopeaks in 2D-IR synchronous correlation spectra of the four *Gwilfordii* acetone extracts and potassium nitrate (1800—1000 cm⁻¹)

样品萃取层	自动峰位置/cm ⁻¹ (相对强度大于最强峰 25%)	峰个数
氯仿层	<u>1761</u> 、 1701 、1619、1470、1450、1380、1040	7
醋酸乙酯	<u>1779</u> 、1690、 1629 、1450、1380、1350、1330、1238、1089、1040	10
正丁醇	1689、1650、 1619 、1460、1449、1380、1348、1330	8
水	<u>1383</u> 、1582	2
硝酸钾	<u>1383</u>	1

粗体为最强自动峰；下划线的自动峰表示该类峰与无下划线的自动峰负相关

Figures in bold denote the maximum autopeaks; Figures with underline denote the corresponding peaks negatively related with other autopeaks without underline

多酚类化合物具有多个酚羟基和游离羟基，极性较强。以水和乙醇为提取溶剂，提取效率低，溶剂用量大，一些极性较小的成分难于被提取完全。由于鞣质遇酸、碱，及在高温条件下不稳定，超声技术可具有穿透力强、选择性高等特点。可加快反应速度，缩短反应时间，超声技术应用于植物细胞破壁，有效地提高了收率。丙酮-水对鞣质的提取率高，且减压蒸发很容易将丙酮从提取液中去掉，剩下鞣质的水溶液，因此，本实验采用 70%丙酮进行超声提取。

红外光谱^[12]不仅可以对主要有机成分（鞣质、黄酮和多糖类等）进行检测分析，同时可对硝酸钾为代表的无机盐进行快速检测，在中药质量与安全的分析评估将有广阔的应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 126.
 [2] 杨祎辰, 王二欢, 常晖, 等. 老鹳草的本草考证 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(5): 882-889.
 [3] 李宇, 刘海华, 刘翠君, 等. 老鹳草乙醇提取物中黄酮类化合物和挥发性组分及其抗菌活性 [J]. 福建农业学报, 2020, 35(12): 1397-1404.
 [4] Kahrıman N, Tosun G, Genç H S, et al. Comparative essential oil analysis of *Geranium sylvaticum* extracted by

hydrodistillation and microwave distillation [J]. *Turkish J Chem*, 2010,34(6): 969-976.

[5] 党艳妮, 杨祎辰, 单娜, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的老鹳草药材市场流通品的质量评价 [J]. 中医药导报, 2022, 28(12): 36-42.
 [6] 李彦希, 李晓朋, 顾健, 等. 红外光谱结合化学计量学鉴别美洲大蠊及其他虫类药材研究 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 3045-3050.
 [7] 孙素琴, 周群, 陶家洵. 红外光谱宏观指纹鉴定法与中药的质量控制 [J]. 现代仪器, 2009, 15(5): 10-15.
 [8] Xu X L, Zheng Y Z, Chen X C, et al. Identification of cattail pollen, pine pollen and bee pollen by Fourier transform infrared spectroscopy and two-dimensional correlation infrared spectroscopy [J]. *J Mol Struct*, 2018, 1167: 78-81.
 [9] 孙仁爽, 金哲雄, 张哲鹏, 等. 牻牛儿苗科 11 种中药材红外光谱鉴定及聚类分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(2): 371-375.
 [10] 黄云先, 赵健胜, 曹云芸. 滇老鹳草药材鉴别方法改进 [J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(9): 44-47.
 [11] Sun S Q, Zhou Q, Chen J B. *Infrared Spectroscopy for Complex Mixtures* [M]. Bei Jing: Chemical Industry Press, 2011: 235.
 [12] 谢梦迪, 田亮玉, 桂新景, 等. 近红外光谱技术结合化学计量学应用于川贝母真伪与规格的快速辨识研究 [J]. 中草药, 2022, 53(8): 2490-2498.

[责任编辑 时圣明]