

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00062

## 拉曼光谱法测定连翘苷含量的探讨

王 玮\*, 席欣欣, 杨 浩, 周绍华, 景恒翠, 李建波

河南大学药学院药剂学教研室, 开封 475004

**[摘要]** **目的** 建立含量测定方法,对拉曼光谱内标法中2种参量的定量分析结果进行比较,确定拉曼内标定量法最适合的参量。**方法** 分别以拉曼峰的相对峰强和峰面积比值作为参量,以不同采收时期和不同产地的连翘叶为对象,采用内标法进行连翘苷的含量测定。以相对峰强为参量时,选取样品溶液拉曼光谱中连翘苷苯环振动( $1\,319.1\text{ cm}^{-1}$ 处的强峰)和溶剂甲醇中 $\text{CH}_3\text{-O}$ 反对称伸缩振动( $2\,974.7\text{ cm}^{-1}$ )作为定量峰和内标参比峰;以峰面积比值作为参量时,选取连翘苷苯环振动( $1\,319.1\text{ cm}^{-1}$ 处的强峰)和溶剂甲醇中 $\text{CH}_3\text{-O}$ 对称伸缩振动( $3\,020.9\text{ cm}^{-1}$ )作为定量峰和内标参比峰。分别以定量峰与内标峰强和峰面积的比值为纵坐标,以连翘苷浓度为横坐标绘制标准曲线,并对线性和加样回收率进行比较。**结果** 以2种参量作为响应值用于拉曼光谱定量分析,均有良好的线性,相关系数 $r$ 分别为0.998 0和0.997 6;回收率均在100.04%~101.30%之间,回收完全;对2种参量的测定结果进行线性拟合,得出回归方程 $C_2=1.030\,4C_1-0.033\,1$ , $r=0.999\,6$ 。结果表明两者测得结果一致,利用2种参量进行定量分析都能取得准确结果。**结论** 无论以相对峰强,还是以峰面积比值作为参量都可以用于拉曼光谱定量分析,2种参量的测定结果基本一致。拉曼光谱用于连翘苷的定量分析具有操作简便、迅速等优点,可以用于中草药的含量测定。

**[关键词]** 药物分析; 含量测定; 拉曼光谱分析; 连翘苷**[中图分类号]** R 927.11**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2011)01-0062-04

### Raman spectroscopy in determination of forsythin content

WANG Wei\*, XI Xin-xin, YANG Hao, ZHOU Shao-hua, JING Heng-cui, LI Jian-bo

Department of Pharmacy, Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, Henan, China

**[Abstract]** **Objective** To compare the two parameters in Raman spectroscopy quantitative analysis, so as to confirm the optimal one. **Methods** The ratios of peak intensity and peak area were taken as parameters in quantitative analysis. The contents of forsythin in forsythia suspense leaves gathered at different time points from different regions were analyzed with laser Raman spectroscopy. When the ratio of the peak intensity was taken as parameter, the Raman peak of forsythin ( $\rho_{\text{Ar-H}} [1\,319.1\text{ cm}^{-1}]$ ) and the peak of methanol ( $\nu_{\text{CH}_3\text{-O}}^{\text{as}} [2\,974.7\text{ cm}^{-1}]$ ) were selected as quantitative peak and internal standard reference peak in the confocal micro-Raman spectra of forsythin methanol solution. When the ratio of the peak area was taken as parameter, the Raman peak of forsythin ( $\rho_{\text{Ar-H}} [1\,319.1\text{ cm}^{-1}]$ ) and the peak of methanol ( $\nu_{\text{CH}_3\text{-O}}^{\text{s}} [3\,020.9\text{ cm}^{-1}]$ ) were selected. The ratios of intensity and area were taken as ordinate, and the content of forsythin was taken as abscissa. The two standard curves were plotted and the linear and recoveries were compared. **Results** Both parameters had good linear relationship with forsythin concentration, with the correlation coefficients being 0.998 0 and 0.997 6; the recoveries were 100.04%~101.30% and the recycling was complete. The linear fitting of the results with two parameters were measured, and the regression equation was  $C_2=1.030\,4C_1-0.033\,1$ ,  $r=0.999\,6$ . The results obtained with the two parameters were accurate and were largely identical. **Conclusion** Both the relative peak intensity and the ratio of the peak area can be used as parameters for forsythin quantitative analysis with Raman spectroscopy. And the two parameters can obtain largely identical results. Raman spectroscopy with internal standard is a simple and rapid method for quantitative analysis of forsythin, and it can be used for quantitative analysis for Chinese herbs.

**[Key words]** pharmaceutical analysis; quantitative analysis; Raman spectrum analysis; forsythin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(1): 62-65]

拉曼光谱不仅可以用于药物的定性鉴别<sup>[1-2]</sup>,还可以进行药物的定量分析<sup>[3-4]</sup>,为药物纯度测定和质**[收稿日期]** 2010-10-15 **[接受日期]** 2010-12-03**[作者简介]** 王 玮, 博士, 副教授, 硕士生导师.

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0378-3880602, E-mail: wayne770@126.com

量控制提供可靠依据。拉曼光谱利用光子直接测定样品,具有选择性高、样品制备简单和可用于在线跟踪测定等优点<sup>[5]</sup>。拉曼光谱与共焦显微技术结合后,仪器的灵敏性和分辨率得到了较大提高,且已逐步应用于生物学、矿物学、材料科学、化工业学、宝石鉴定学、公安法学等领域<sup>[6-7]</sup>。连翘苷是木犀科药用植物连翘的重要指标成分。连翘是中医临床常用中药,具有清热解毒、消肿散结、抑菌降血脂的功效。连翘也能预防动脉粥样硬化与冠心病等类慢性疾病,有实验证明连翘叶还具有一定的抗氧化作用<sup>[8]</sup>。

相对峰强或峰面积的比值都可以作为拉曼定量分析的参量<sup>[9]</sup>,选择合适的参量对拉曼定量分析的准确性具有重要的意义。本研究首次将激光拉曼技术应用于中药材的定量研究,并通过2种参量来确定激光拉曼用于定量分析的准确性和可靠性,对于中药定性鉴别和质量控制有一定的实用意义。

## 1 仪器与试剂

共焦显微激光拉曼光谱仪由以下主要部件组成:RM-1000 激光拉曼光谱仪;Reni Shaw He-Ne 激光器;Lecia DMLM 显微镜;Melles Griot 58-BLD-301 固体激光器;150  $\mu\text{m}$  共焦孔径;50 倍长焦距物镜镜头。457 nm 激发线用作样品测量的激发光源。

连翘苷原料(批号:20080306,含量98.5%,陕西森弗生物技术有限公司);甲醇(分析纯,天津四有科技发展有限公司);连翘叶(2009年6至12月间采自河南伏牛山,经河南大学药学院康文艺教授鉴定为 *Forsythia suspensa*.)

## 2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取70℃干燥至恒质量的连翘苷原料药7.500 g置于25 ml容量瓶中,用少量甲醇溶解后,定容至刻度,摇匀即得300 mg/ml连翘苷储备液。精密量取标准储备液10.0 ml置于25 ml容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀后即为118.2 mg/ml的连翘苷对照品溶液,备用。

2.2 供试品溶液的制备 将不同采收时间、不同产地的连翘叶于烘箱内70℃干燥2 h,研细后过60目筛。分别精密称取其粉末约3.000 g置于15 ml离心管中,精密量取10 ml甲醇浸泡,精密称定。浸泡3 h后超声(100 W, 40 kHz)提取55 min。取出后冷却至室温,再次精密称定,并同时用甲醇补足失去的质量,摇匀。离心取上清液,置中性氧化铝柱(100~

200目,6 g,内径1 cm)上,40 ml无水乙醇洗脱,收集洗脱液,水浴浓缩。干燥后残渣加甲醇适量,温热使溶解,转移至10 ml容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 样品测定方法 毛细管吸取溶液后蜡油封住管两端,倒置毛细管,观察管内液体是否流动。若流动,则再次蜡油密封或用另1个干净毛细管重新吸取并蜡封。将密封好的毛细管置于载玻片上,调整载物台使其处于显微拉曼光谱仪物镜视野内,通过调整焦距使激光聚集在溶液表面,开始测定其拉曼光谱。本次实验中激光功率50 mW,光信号探测时间10 s。数据收集、贮存、处理和谱图打印等均通过Origin 6.10软件处理。所有溶液的共焦显微拉曼光谱均是一次性扫描探测的结果。

2.4 拉曼谱线的处理 谱线平滑:由于信噪比较低,获得的拉曼谱线条较毛糙,需对拉曼光谱图进行平滑处理。平滑处理的方法有3种,分别是Savitzky-Golay、Adjacent Averaging和FFT Filtering。本研究采用的方法是FFT Filtering。荧光消除:通过基线校正的方法来减弱荧光背景的干扰。

2.5 连翘苷甲醇溶液的共焦显微拉曼光谱 浓度为24 mg/ml ( $4.5 \times 10^{-5}$  mol/L)的连翘苷溶液的共焦显微拉曼光谱如图1所示。图1中882.1、1455.4、2950.3  $\text{cm}^{-1}$ 为咪喃环的特征峰。641.8、759.1、1319.1、3080.7  $\text{cm}^{-1}$ 为芳环的振动信号,722.9、1268.0  $\text{cm}^{-1}$ 为1,2,4-三取代苯上C-C变形振动和芳环骨架伸缩振动。吡喃葡萄糖基中C-O-C的对称伸缩出现在967.3  $\text{cm}^{-1}$ 处,仲醇出现在1128.0  $\text{cm}^{-1}$ 处。吡喃葡萄糖苷键的拉曼特征峰出现在1227.7  $\text{cm}^{-1}$ 和1029.7  $\text{cm}^{-1}$ 处。以上均为连翘苷的特征拉曼信号。

溶剂甲醇中2844.1  $\text{cm}^{-1}$ 处宽峰为C-H对称和反对称伸缩振动,1420.3、2974.7和3020.9  $\text{cm}^{-1}$ 处CH<sub>3</sub>-O的变形振动、对称和反对称伸缩振动,1377.8  $\text{cm}^{-1}$ 和782.9  $\text{cm}^{-1}$ 处O-H的变形振动和面外弯曲。

2.5.1 浓度与峰强、峰面积的关系 精密量取300 mg/ml连翘苷储备液0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 ml于25 ml容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀后即为不同浓度的连翘苷甲醇溶液。图2为不同浓度连翘苷甲醇溶液的共焦显微拉曼光谱。从图2中可以看出,不同浓度的连翘苷甲醇溶液中连翘苷的拉曼峰强、峰下的面积随浓度的增加而增加。

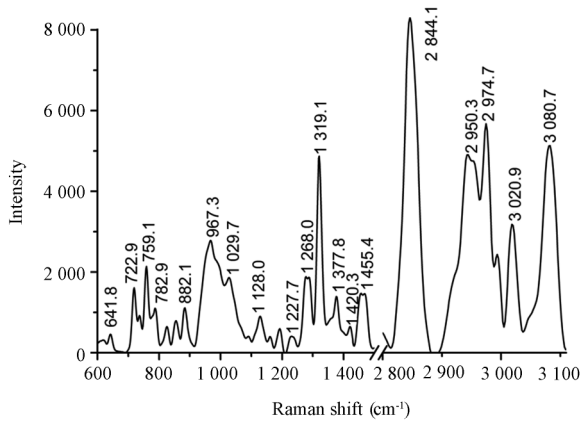


图1 连翘苷共焦显微激光拉曼光谱

Fig 1 Raman spectrum obtained by confocal laser Raman spectrometer

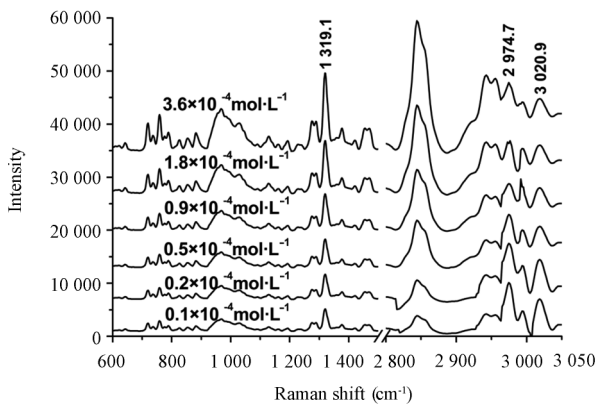


图2 不同浓度连翘苷甲醇溶液的共焦显微拉曼光谱

Fig 2 Spectra obtained by confocal Raman spectrometer with different concentrations of forsyth in methanol

2.5.2 标准曲线的制作 由 Origin 6.10 软件直接读取特征峰强度数据后以  $R_1(I_{1319.1}/I_{2974.7})$  为纵坐标、以连翘苷甲醇溶液的浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线 1, 结果得线性方程为  $R_1=7.6112C+0.9267$ ,  $r=0.9980$ 。由 Origin 6.10 软件分析计算出特征峰下面积,峰下面积是以峰强  $A=0$  为底的区域面积。依次获得不同浓度样品溶液的拉曼光谱中两峰峰面积后,将  $R_A(A_{1319.1}/A_{3020.9})$  作为纵坐标、以连翘苷甲醇溶液的浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线 2, 线性方程为  $R_A=20.1817C+3.3453$ ,  $r=0.9976$ 。结果表明 2 种参量用于拉曼光谱定量分析都具有很好的线性,可以作为拉曼光谱用于含量测定中的响应值。

2.5.3 加样回收率的比较 精密称取 2009 年 9 月 3 日伏牛山采取的连翘叶 3.000 g, 共称 3 份,已知该连翘叶中连翘苷的含量为 2.46%。分别加入连翘苷对照品 60、70、80 mg。按供试品溶液制备方法制备成低、中、高 3 种浓度的待测溶液,并按实验方法分别测定。实验结果可以看出,低、中、高 3 种浓度的回收率均在 100.04%~101.30%之间,回收完全,表明 2 种参量进行定量分析的测定结果准确性较高。

2.5.4 样品测定结果的比较 精密称取不同采收期、不同产地的连翘叶各 3.000 g, 按照供试品溶液制备项下方法分别制备成样品溶液,依法测定并以 2 种参量为响应值计算样品中连翘苷的含量。 $C_1$ 、 $C_2$  分别为以  $R_1(I_{1319.1}/I_{2974.7})$ 、 $R_A(A_{1319.1}/A_{3020.9})$  为参量的连翘苷含量,结果见表 1。

表 1 不同采收期、不同产地连翘叶中连翘苷含量测定结果比较

Tab 1 Comparison of forsyth in contents in leaves gathered at different time points from different locations

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ , %)

Sample	Average content		RSD	
	$C_1$	$C_2$	$C_1$	$C_2$
Harvesting time				
2009.07.03	2.08±0.12	2.12±0.08	0.86±0.13	1.21±0.10
2009.09.03	2.46±0.09	2.50±0.09	1.13±0.12	1.25±0.12
2009.12.03	2.11±0.10	2.14±0.12	1.19±0.11	1.32±0.11
Regions				
Xixia in Henan	2.16±0.11	2.19±0.11	1.12±0.09	1.24±0.12
Lushi in Henan	1.91±0.07	1.93±0.08	1.11±0.08	1.28±0.12

以  $C_2$  为纵坐标,以  $C_1$  为横坐标进行线性拟合,得出回归方程为  $C_2=1.0304C_1-0.0331$ ,  $r=0.9996$ 。这说明两者测得结果基本一致,利用 2 种参量作为连翘苷拉曼定量分析都能取得准确结果。

### 3 讨论

3.1 内标物和定量峰的选择 不论参量是峰强比值还是峰面积比值,本研究中选择的定量峰均为连

翘苷  $1\ 319.1\ \text{cm}^{-1}$  处的苯环振动峰。因为从图 1 中可以看出  $1\ 319.1\ \text{cm}^{-1}$  处的拉曼峰具有高的绝对峰强,且该峰没有重叠峰的干扰与影响,选用此峰作为定量分析中的参比峰会获得更好的定量结果。

以峰强比值为参量进行定量测定时,与参比峰距离最近且强度较大的  $2\ 974.7\ \text{cm}^{-1}$  处甲醇的拉曼信号可以作为内标峰。选取此峰做内标物,是因为它靠近参比峰,和参比峰具有相近的环境,可以降低信噪比。以峰面积的比值作为参量时,不能选取甲醇  $2\ 974.7\ \text{cm}^{-1}$  处的拉曼信号作为内标峰。因为此峰存在重叠峰干扰,且峰形差,以此峰作为内标峰可能会使定量分析产生较大误差;甲醇  $3\ 020.9\ \text{cm}^{-1}$  处拉曼信号位于参比峰附近,且具有良好的峰形和稳定性,所以选其作为内标峰。选取溶剂甲醇的拉曼峰做内标既可以避免定量分析中的误差,又可以减少加入物质的干扰。

3.2 共焦显微拉曼光谱用于定量分析的依据 共焦显微拉曼技术由于具有简单、快速、无损检测等优点,已逐步被应用于中药质量控制中指标成分的含量测定。本研究以连翘苷为研究对象,应用共焦显微拉曼光谱仪探讨了拉曼光谱用于中药指标成分含量测定的方法。通过实验结果表明,本方法简便可靠、结果准确、回收率均理想,可以作为中药质量控制的方法。拉曼光谱用于定量分析的基础是其特征峰强与浓度的关系遵循比尔定律<sup>[9]</sup>:

$$I_V = KLCI_0$$

式中  $I_V$  为特征峰的峰强; $K$  为仪器参数; $L$  为光路长度,即样品被采集的有效体积; $C$  为样品中特定组分的摩尔浓度; $I_0$  为入射到样品上的激光强度。通过以上公式可以看出,当仪器参数、样品有效采集体积、入射激光强度相同时,拉曼谱峰的峰强与浓度成正比关系,即样品浓度越大,拉曼特征峰信号越强。以相对峰强作为定量分析的参量,是拉曼光谱常用的方法。利用峰面积的比值,也可以得到相同的测定结果。本研究对相对峰强和峰面积为参量测

定中药连翘的指标成分连翘苷含量的结果进行比较分析,结果说明利用相对峰强和峰面积进行拉曼光谱的定性研究具有快速、简单、方便、准确等特点,可以为拉曼光谱的定量分析提供良好的方法。

3.3 拉曼光谱内标法的应用 拉曼光谱用于样品溶液定量分析时,样品溶液浓度的差异、溶剂噪音的影响等因素会对拉曼的绝对峰强产生影响。拉曼信号的绝对峰强会随着测定环境而波动,因此若直接采用拉曼的绝对峰强做样品溶液的定量分析,会存在较大的误差。选用内标法用于拉曼光谱的定量分析可以消除这种误差。这是因为内标物和样品处在完全相同的实验条件下,选用内标法可以有效地减少某些环境影响因素的干扰。

### [参考文献]

- [1] 周殿凤. 拉曼光谱在中药注射剂鉴定中的应用初探[J]. 光学仪器, 2008, 30: 42-44.
- [2] Zhang D M, Jiang D P, Yanney M, Zou S G, Sygula A. Ratiometric Raman spectroscopy for quantification of protein oxidative damage[J]. Anal Biochem, 2009, 391: 121-126.
- [3] Clare J S, Thomas R, Keith C G, Rantanen J. Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids[J]. J Pharm Pharmacol, 2007, 59: 179-192.
- [4] Caillet A, Puel F, Fevotte G. Quantitative *in situ* monitoring of citric acid phase transition in water using Raman spectroscopy[J]. Chem Engin Proc, 2008, 47: 377-382.
- [5] 张启明, 张 新, 刘朝霞. 便携式拉曼光谱仪用于解热镇痛类药物主成分识别的研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43: 1903-1906.
- [6] 翁欣欣, 张中湖, 尹利辉, 陆 峰. KPCA-聚类分析法和用便携式拉曼仪快速鉴别降糖药[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30: 984-987.
- [7] 林文硕, 陈 荣, 李永增, 冯尚源, 黄祖芳, 谢秉贤. 山药近红外拉曼光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28: 1095-1097.
- [8] 李兴泰, 陈 瑞, 高明波. 连翘叶水提物保护线粒体及抗衰老研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28: 18-20.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 210-211.

[本文编辑] 尹 茶