

## · 基础研究 ·

基于 ATR-FTIR 成像技术的川贝母粉末显微光谱鉴定<sup>△</sup>王月<sup>1</sup>, 刘傲雪<sup>1</sup>, 张久旭<sup>1</sup>, 李小阳<sup>1</sup>, 陈建波<sup>2\*</sup>, 王晶娟<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:** 建立一种简便快速的贝母粉末鉴定方法, 以准确区分川贝母与其他贝母粉末, 保证川贝母粉末的真实性。**方法:** 使用 ATR-FTIR 成像技术直接测量贝母粉末的显微红外光谱, 通过主成分分析和归一化相对峰强度法对测量结果进行定性和定量解析, 寻找川贝母与其他贝母粉末的显微红外光谱差异特征。**结果:** 不同品种贝母粉末的显微红外光谱图像中均存在三类主要像素, 分别具有淀粉粒、蛋白质和细胞壁的特征吸收信号, 而川贝母粉末中主要对应于淀粉粒的第一类像素数量最多。以  $1200 \sim 900 \text{ cm}^{-1}$  区域吸收峰面积为目标峰, 以  $1700 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$  区域吸收峰面积为参比峰, 计算像素平均归一化相对峰强度  $R_m$  值。川贝母粉末的  $R_m$  值稳定在 0.70 左右, 显著高于其他贝母粉末, 可以作为区分川贝母和其他贝母粉末的量化指标。**结论:** 使用 ATR-FTIR 成像技术, 可以建立简便快速、客观量化的贝母粉末显微光谱鉴定方法。

**[关键词]** 贝母; 川贝母; 显微鉴定; 显微红外光谱; 衰减全反射成像

## Microspectroscopic Identification of Fritillariae Cirrhosae Bulbus Powder by ATR-FTIR Microspectroscopic Imaging

WANG Yue<sup>1</sup>, LIU Ao-xue<sup>1</sup>, ZHANG Jiu-xu<sup>1</sup>, LI Xiao-yang<sup>1</sup>, CHEN Jian-bo<sup>2\*</sup>, WANG Jing-juan<sup>1\*</sup>

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a simple and rapid identification method for identification different kinds of Fritillariae Bulbus powder and ensure the authenticity of Fritillariae Cirrhosae Bulbus (FCB). **Methods:** The powder of different kinds of Fritillariae Bulbus was measured directly by ATR-FTIR microspectroscopic imaging. Principal component analysis and the normalized relative peak intensity method were used for the qualitative and quantitative interpretation of the microscopic ATR-FTIR spectra to find out the discriminative spectral features between FCB and other kinds of Fritillariae Bulbus. **Results:** Three kinds of microspectroscopic pixels, corresponding to starch grains, protein and cell wall, can be found in the ATR-FTIR image of each sample. Meanwhile, the number of the pixels corresponding to starch grains was the largest in FCB. The normalized relative peak intensity  $R_m$  was calculated using the band area in the region of  $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$  as the target peak and the band area in the region of  $1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$  as the reference peak.  $R_m$  for FCB was always about 0.70, which was significantly larger than  $R_m$  for other kinds of Fritillariae Bulbus. The  $R_m$  value can be used as the quantitative criterion to discriminate the FCB powder from the powder of other kinds of Fritillariae Bulbus. **Conclusion:** The microspectroscopic identification method based on the ATR-FTIR imaging technique can be used for the simple, rapid, objective and quantitative identification of FCB.

**[Keywords]** *Fritillaria*; Fritillariae Cirrhosae Bulbus; microscopic identification; FTIR microspectroscopy; ATR imaging  
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20170724001

贝母是百合科贝母属多种植物的药用鳞茎的统称。其中, 川贝母具有清热润肺、化痰止咳功效, 用于治疗肺热燥咳、干咳少痰、阴虚劳嗽等症<sup>[1]</sup>。

《中华人民共和国药典》2015 年版收录的贝母类药材包括川贝母、伊贝母、平贝母、浙贝母和湖北贝母等品种<sup>[2]</sup>。其中, 川贝母(按性状不同分别习称松

<sup>△</sup> [基金项目] 国家自然科学基金(81303217)

\* [通信作者] 王晶娟, 副教授, 研究方向: 中药鉴定与质量评价方法, E-mail: wangjj@bucm.edu.cn;  
陈建波, 助理研究员, 研究方向: 中药分析与质量控制方法, E-mail: chenjianbo@bucm.edu.cn

贝、青贝、炉贝等)的药效最好,但是资源稀少,因此其价格远高于另外几种贝母。市场上的川贝母经常以粉末形式进行销售,而粉碎后的川贝母与其他贝母很难区分。为了保证市售川贝母粉末的真实性和有效性,必需建立准确快速的真伪鉴别方法,从而能够及时发现用其他贝母粉末冒充川贝母粉末的造假行为。

《中华人民共和国药典》2015 年版规定的可以用于川贝母粉末鉴别的方法主要有显微鉴定法、薄层色谱鉴定法与 DNA 鉴定法<sup>[2-3]</sup>。薄层色谱鉴定法使用的对照品贝母素乙在其他一些贝母中也存在,不能作为真伪鉴别的必要条件;DNA 鉴定法需要相对复杂的样品处理和较长的测试时间,不适合作为快速鉴别方法;因此,显微鉴定法是川贝母粉末快速鉴别的主要方法。然而,不同品种的贝母粉末中一般都具有淀粉粒、表皮细胞和导管等结构,而且形态相似、难以区分。因此,显微鉴定法对操作者的能力和经验要求较高,所得结果容易受到主观因素的影响。

显微光谱鉴定法是传统显微鉴定法与光谱鉴定法相结合的产物<sup>[4-6]</sup>。如果样品中的细胞、内含物等微观结构的物理形态难以描述或者区分,可以通过显微测量技术获得这些微观结构的显微光谱。细胞、内含物等微观结构的显微光谱可以反映其化学成分的组成种类和相对含量,而受到物理形态的影响较小。当微观结构的物理形态复杂多变时,使用显微光谱可以获得稳定的化学特征信号;当微观结构的物理形态不易区分时,使用显微光谱可以发现化学组成的差异特征。显微光谱鉴定法不仅保留了传统显微鉴定法简便、快速的优势,而且能够建立更加客观、量化的判别准则。因此,本研究尝试使用衰减全反射傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)成像技术,建立一种简便快速、客观量化的川贝母粉末显微光谱鉴定法。

## 1 材料

本研究所用 18 个贝母样品收集于多个产地和市場,包括 3 个松贝、3 个青贝、3 个炉贝、3 个伊贝母、3 个平贝母和 3 个浙贝母。各种贝母样品信息见表 1。所有样品均由北京中医药大学中药学院王晶娟副教授进行性状鉴定。贝母样品粉碎后过 60 目筛,取细粉直接进行光谱测试。可溶性淀粉(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

表 1 各种贝母饮片样品来源信息

| 中药名称   | 样品批数 | 产地             |
|--------|------|----------------|
| 川贝母 松贝 | 3    | 四川松潘           |
| 青贝     | 3    | 四川青山           |
| 炉贝     | 3    | 西藏昌都、青海玉树、四川甘孜 |
| 伊贝母    | 3    | 新疆伊宁           |
| 浙贝母    | 3    | 浙江宁波           |
| 平贝母    | 3    | 黑龙江伊春          |

## 2 方法

### 2.1 常规红外光谱

常规红外光谱测量所用仪器为 PerkinElmer Frontier FT-IR/NIR 光谱仪。使用溴化钾压片法获得样品粉末的红外光谱,光谱范围为  $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ ,光谱分辨率为  $4 \text{ cm}^{-1}$ ,每张光谱累加扫描 16 次,使用空气作为光谱背景,扫描过程中自动扣除水蒸气和二氧化碳干扰。所得光谱经过 PerkinElmer Spectrum v10 软件的自动基线校正和归一化处理后用于谱图分析。

### 2.2 显微红外光谱

显微红外光谱测量使用上述 Frontier FT-IR/NIR 光谱仪与 PerkinElmer Spotlight 400 FT-IR Microscope 所组成的红外光谱成像系统以及配套的 ATR 光谱成像附件进行。将适量样品粉末放在在不锈钢底板上进行 ATR 成像测试,测量区域为  $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ ,像素尺寸为  $6.25 \mu\text{m} \times 6.25 \mu\text{m}$ ,光谱范围为  $4000 \sim 750 \text{ cm}^{-1}$ ,光谱分辨率为  $8 \text{ cm}^{-1}$ ,每张光谱累加扫描 8 次,使用空白不锈钢底板作为光谱背景。使用 PerkinElmer SpectrumIMAGE v1.7 软件对所得显微光谱进行自动 ATR 校正和空气背景校正,然后以  $2100 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$  区域为参考波段进行基线平移校正。显微光谱的主成分分析使用 SpectrumIMAGE 软件进行,相对峰强度计算使用 MATLAB v7.0 软件和自编程序进行。

## 3 结果与讨论

### 3.1 贝母粉末的常规红外光谱特征

图 1 所示为不同品种贝母粉末的常规红外光谱。贝母鳞茎中含有大量淀粉,所以各种贝母粉末的红外光谱整体特征都与淀粉非常相似<sup>[7]</sup>。贝母粉末红外光谱中  $1200 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$  区域的一系列吸收峰主要来自于淀粉的 C-C 伸缩振动、C-O 伸缩振动和糖环骨架振动吸收峰。不同品种贝母粉末红外光谱的主要差异在于  $1700 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$  区域。在松贝、青贝和

炉贝这 3 种川贝母中,  $1650\text{ cm}^{-1}$  附近吸收峰低于  $1460\text{ cm}^{-1}$  附近吸收峰; 在伊贝母、平贝母和浙贝母中,  $1650\text{ cm}^{-1}$  附近吸收峰高于  $1460\text{ cm}^{-1}$  附近吸收峰。另外, 伊贝母、平贝母和浙贝母中  $1515\text{ cm}^{-1}$  附

近的吸收峰也相对明显。 $1800\sim1200\text{ cm}^{-1}$  区域的吸收峰是多种成分吸收信号的叠加结果, 因此仅根据常规红外光谱难以深入解释川贝母和其他贝母的上述光谱特征差异的产生原因与可靠性。

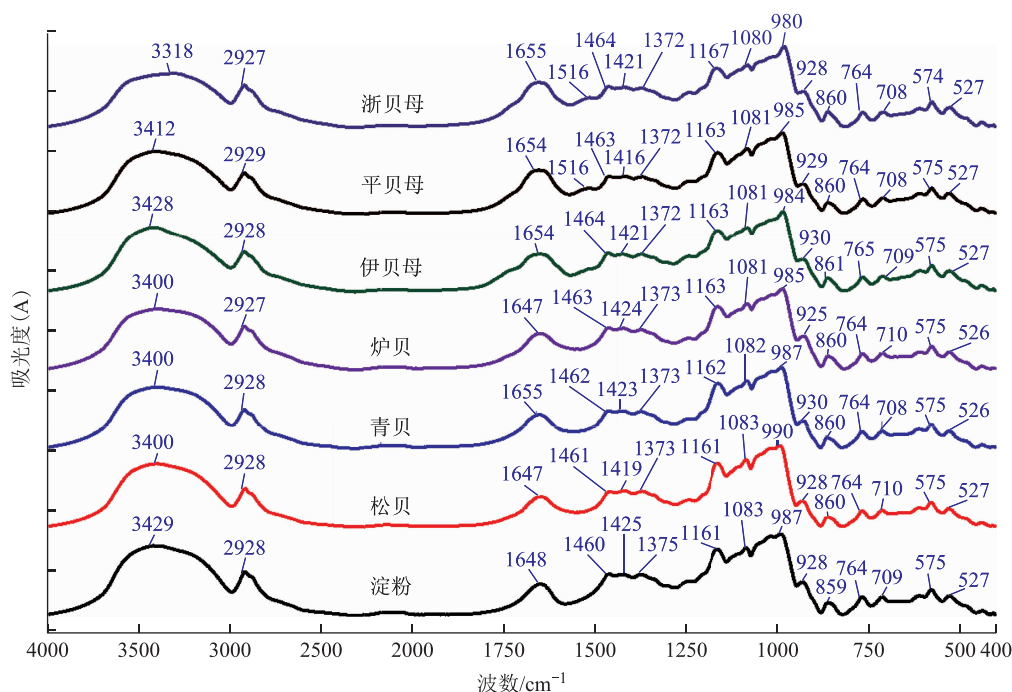


图 1 不同品种贝母粉末的常规红外光谱

### 3.2 贝母粉末的显微红外光谱特征定性分析

图 2 所示为根据不同品种贝母粉末的显微红外光谱前 3 个主成分得分而生成的赝彩色图像。具有相似光谱特征的像素在不同主成分上的得分接近, 因而在赝彩色图像上具有相似的颜色。从图 2 可以看出, 各类贝母粉末中至少存在三类具有独特光谱特征的像素, 而图 3 则显示了各类像素中的代表性光谱(其空间位置标注在图 2 中)。

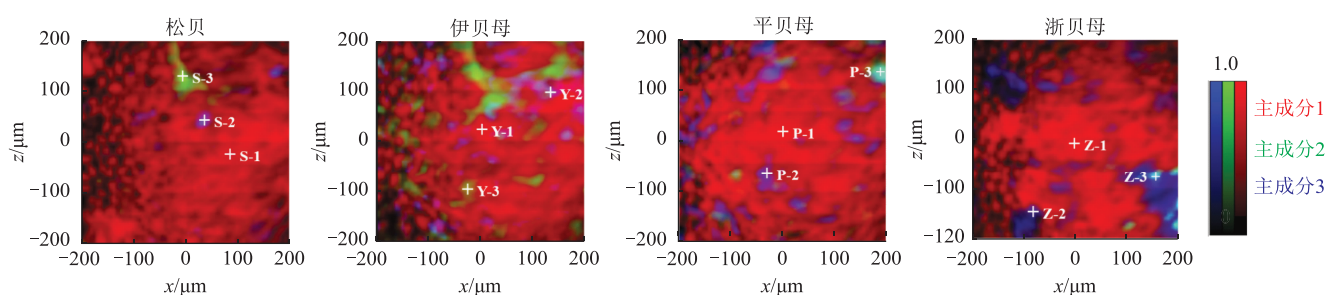
第一类像素在第一主成分上得分较高, 因而在各类贝母的显微红外光谱主成分得分图像中显示为红色, 其数量占据绝对优势。从图 3 看出, 该类像素的光谱特征与淀粉一致, 说明该类像素主要对应于贝母粉末中的淀粉粒。第二类像素在第二主成分上得分较高, 因而显示为蓝色。该类像素的光谱特征主要是  $1640\text{ cm}^{-1}$  和  $1530\text{ cm}^{-1}$  附近的蛋白质酰胺 I 带和酰胺 II 带吸收峰, 说明其可能对应于贝母粉末中的糊粉粒等富含蛋白质的微观结构。第三类像素在第三主成分上得分较高, 因而显示为绿色。该类像素的光谱中包含  $1735\text{ cm}^{-1}$  附近的  $\text{C}=\text{O}$  伸缩振动吸收峰、 $1200\sim900\text{ cm}^{-1}$  区域的  $\text{C}-\text{C}$  伸缩振动、 $\text{C}-\text{O}$

伸缩振动和糖环骨架振动吸收峰, 这些特征峰可能来自构成细胞壁的纤维素、半纤维素和木质素类成分。因此, 第三类像素可能对应于贝母粉末中的导管和表皮细胞等。

从图 2 看出, 伊贝母、平贝母和浙贝母中的第二类 and 第三类像素明显多于松贝、青贝和炉贝。第二类 and 第三类像素在  $1700\sim1500\text{ cm}^{-1}$  区域的吸收峰较强, 这与常规红外光谱上伊贝母、平贝母和浙贝母在  $1700\sim1500\text{ cm}^{-1}$  区域的吸收峰较强是一致的。显微红外光谱分析结果说明, 伊贝母、平贝母和浙贝母中蛋白质和细胞壁的含量相对高于川贝母。

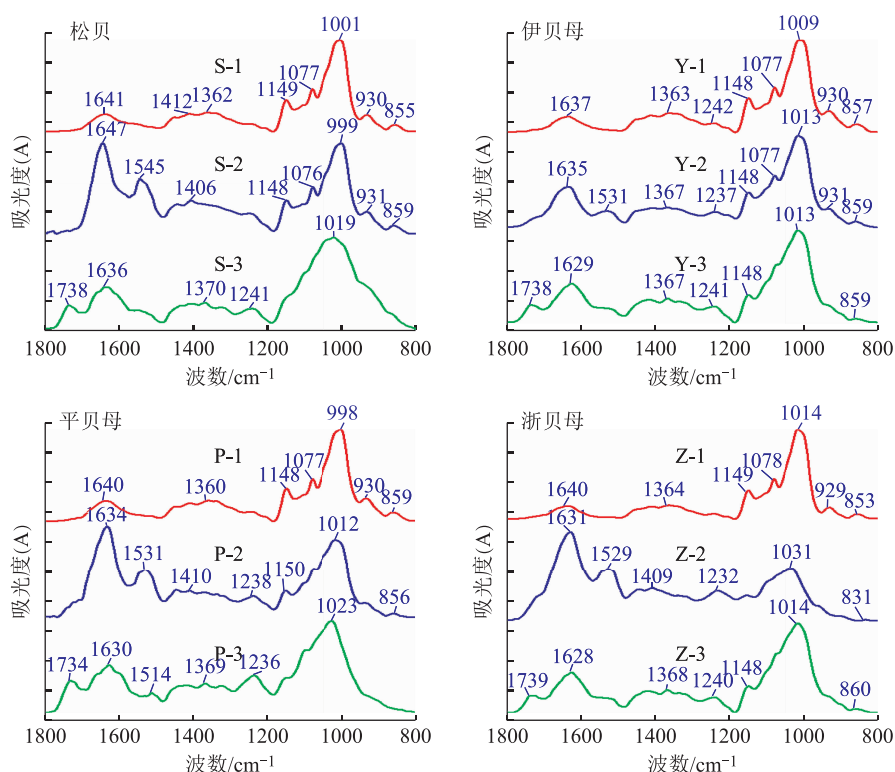
### 3.3 贝母粉末的显微红外光谱特征定量分析

如上所述, 主成分得分图像与典型像素光谱初步显示了第二类和第三类像素的数量是区分川贝母与其他贝母粉末的重要指标。根据图 3 可知, 第一类像素的主要吸收峰在  $1200\sim900\text{ cm}^{-1}$  区域, 而第二类和第三类像素在  $1700\sim1500\text{ cm}^{-1}$  区域的吸收峰明显强于第一类像素。因此, 根据这两个区域的吸收峰相对强度, 可以对第二类和第三类像素的数量进行评价, 从而可以建立区分川贝母与其他贝母粉



注: S-1 ~ S-3. 松贝母 3 个主成分; Y-1 ~ Y-3. 伊贝母 3 个主成分; P-1 ~ P-3. 平贝母 3 个主成分; Z-1 ~ Z-3. 浙贝母 3 个主成分。

图 2 不同品种貝母粉末的显微红外光谱主成分得分图像



注: 谱图编号对应于图 2 中像素编号 (+)。

图 3 不同品种貝母粉末的典型像素显微红外光谱

末的量化判断指标。本研究定义目标吸收峰 A 与参比吸收峰 B 的归一化相对峰强度  $R(A/B)$  按公式(1)计算。

$$R(A/B) = \frac{A - B}{A + B} \quad (1)$$

式中 A 和 B 可以是峰高度,也可以是峰面积。

一般文献中计算光谱相对峰强度的方式为目标峰与参比峰的高度或者面积直接相除。该方法的问题在于,如果某个样品光谱中作为参比的吸收峰非常弱,可能会产生异常大的相对峰强度值,对统计分析结果造成干扰。使用公式(1)的定义方法,如果 A 远远大于 B,相对峰强度接近于 1;如果 B 远

远大于 A,相对峰强度接近于 -1。因此,使用这种方法计算的相对峰强度值限制在  $[-1, 1]$  区间内,不会因为产生异常大的相对峰强度值而对统计分析结果造成干扰。

本研究中使用  $1700 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$  区域的吸收峰面积作为参比峰强度,  $1200 \sim 900 \text{ cm}^{-1}$  区域的吸收峰面积作为目标峰强度,根据公式(1)计算每个样品 ATR 光谱成像中所有像素光谱(4096 像素/样品)的平均归一化相对峰强度( $R_m$ ),结果如图 4 所示。在所有川贝母粉末样品中, $R_m$  值稳定在 0.70 左右;在伊贝母、平贝母和浙贝母中, $R_m$  值显著小于 0.70;纯淀粉中  $R_m$  值约为 0.98。也就是说,川贝

母粉末中对应于淀粉粒的第一类像素数量显著高于其他贝母粉末,但是明显低于纯淀粉。 $R_m$  值可以作

为显微红外光谱鉴定法区分川贝母和其他贝母粉末的定量判断指标。

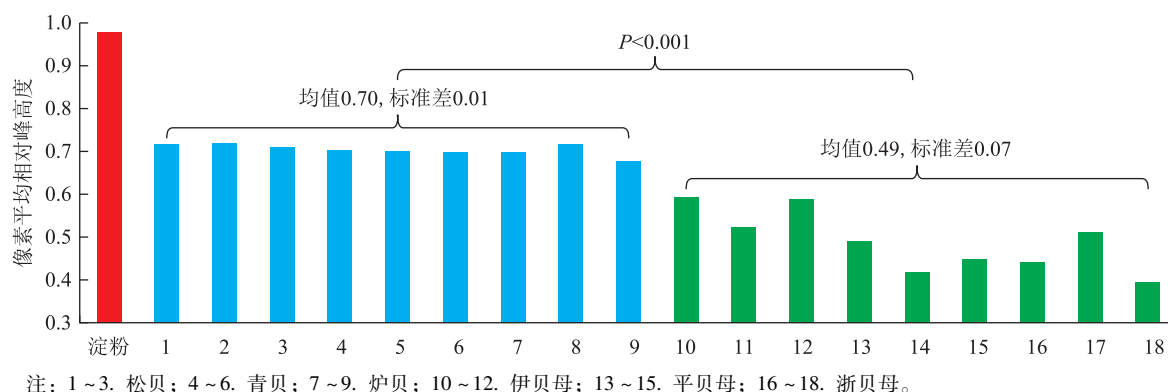


图 4 不同品种贝母粉末的显微红外光谱特征峰相对强度

#### 4 结论

综上所述,本研究利用 ATR-FTIR 成像技术初步建立了可以有效区分川贝母和其他贝母粉末的显微红外光谱鉴定法,并且提出了基于归一化相对峰强度的量化判断指标建立方法。但是,本研究中只是使用了最为常见的伊贝母、平贝母和浙贝母作为其他贝母样品。为了进一步考察本研究提出的显微红外光谱鉴定法与量化判断指标的耐用性,以后还需要继续收集更多种类的贝母样品进行方法验证和完善。

本研究提出的贝母粉末显微红外光谱鉴定法也可以为建立其他中药显微光谱鉴定法提供参考。显微光谱鉴定法既有传统显微鉴定法简便快速的优势,又能够建立客观量化的判别规则,对于快速准确的中药鉴定和质量控制具有重要意义。

#### 参考文献

[1] 张贵君. 精编中草药[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2016:88.

- [2] 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,2015:36,97,141,292,348.
- [3] 张文娟,尚柯,魏锋,等. 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性方法对太白贝母鉴别检验的适用性探讨[J]. 中国现代中药,2015,17(9):905-910.
- [4] Chen J B, Sun S Q, Tang X D, et al. Direct and simultaneous detection of organic and inorganic ingredients in herbal powder preparations by Fourier transform infrared microspectroscopic imaging[J]. Spectrochim Acta, Part A, 2016,165:176-182.
- [5] Chen J B, Sun S Q, Ma F, et al. Vibrational microspectroscopic identification of powdered traditional medicines: chemical micromorphology of Poria observed by infrared and Raman microspectroscopy[J]. Spectrochim Acta, Part A, 2014,128(7):629-637.
- [6] Chen J B, Sun S Q, Zhou Q. Infrared microspectroscopic identification of marker ingredients in the finished herbal products based on the inherent heterogeneity of natural medicines[J]. Anal Bioanal Chem, 2014,406(18):4513-4525.
- [7] Li D, Jin Z, Zhou Q, et al. Discrimination of five species of Fritillaria, and its extracts by FT-IR and 2D-IR[J]. J Mol Struct, 2010,974(1):68-72.

(收稿日期 2017-07-24)