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

李彦希，李晓朋，顾 健*，史志龙，李佳川，任 艳
西南民族大学药学院，四川 成都 610041

摘 要：目的 基于红外光谱法结合化学计量学建立美洲大蠊及其他虫类药材（全蝎、水蛭）粉末的鉴别方法，为美洲大蠊的鉴别提供一定的依据。**方法** 运用傅里叶变换红外光谱仪采集 3 种虫药药粉的红外光谱数据，对已得光谱数据二阶求导后运用纵坐标归一化法、标准化法等预处理方法对光谱进行优化，采用化学计量学，包括系统聚类分析（hierar chicalcluster analysis，HCA）、主成分分析（principal component analysis，PCA）以及偏最小二乘判别分析（partial least squares discriminant analysis，PLS-DA）进一步对光谱数据进行分析。**结果** 美洲大蠊与全蝎、水蛭的红外指纹图谱有差异。美洲大蠊在 1 711、1 410、712 cm^{-1} 处吸收峰明显，全蝎在 1 753、1 400、1 168、717 cm^{-1} 处吸收峰明显，水蛭在 1 558、1 457、1 400、669 cm^{-1} 处吸收峰明显，且水蛭在 1 753～1 711cm^{-1} 处明显无吸收峰。3 种虫类药材在 1 800～1 700 cm^{-1} 处峰形差异明显较大。二阶导数图谱中，主要峰的位置相同，但共有峰的强度不同。运用 HCA 分析方法发现 3 种虫类药材能够被快速区分，运用 PCA 与 PLS-DA 分析方法发现 3 种虫类药材分布在不同区域。**结论** 本研究能够简便、快速的鉴别美洲大蠊与全蝎、水蛭等虫类药材，为美洲大蠊的质量控制及评价提供参考。

关键词：美洲大蠊；全蝎；水蛭；傅里叶红外光谱；化学计量学；统聚类分析；主成分分析；偏最小二乘判别分析
中图分类号：R286.2 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2020)11 - 3045 - 06
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.024

Discrimination of *Periplaneta americana* and other insectivorous herbs by FTIR spectroscopy combined with chemometrics

LI Yan-xi, LI Xiao-peng, GU Jian, SHI Zhi-long, LI Jia-chuan, REN Yan
College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To establish a method for the identification of the *Periplaneta americana* and other insectivorous herbs (*Scorpio* and *Hirudo*) based on infrared spectroscopy combined with chemometrics, and to provide a basis for the identification of the *P. americana*. **Methods** Fourier transform infrared spectroscopy was used to collect the infrared spectrum data of three kinds of insect medicine powders. After the second order derivation of the obtained spectral data, the ordinate verticalization method and standardization method were used to optimize the spectrum. The spectral data was further analyzed by chemometrics, such as hierar chicalcluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). **Results** There were differences in the infrared fingerprints of the *P. americanas*, Scorpios, Leeches. The absorption peaks of the *P. americanas* at 1 711, 1 410, and 712 cm^{-1} were obvious. The absorption peaks of the Scorpios at 1 753, 1 400, 1 168, and 717 cm^{-1} were obvious. The absorption peaks of the Leeches at 1 558, 1 457, 1 400, and 669 cm^{-1} were obvious, And the leeches have no absorption peak at 1 753—1 711 cm^{-1}. The peak shape of the three insectivorous herbs was significantly different at 1 800—1 700 cm^{-1}. In the second derivative spectrum, the positions of the main peaks are the same, but the intensity of the common peaks is different. Using the HCA analysis method, it was found that the three insectivorous herbs could be quickly distinguished. The PCA and PLS-DA analysis methods were used to find that the three insectivorous herbs were distributed in different regions. **Conclusion** Infrared spectroscopy combined with chemometrics can easily and quickly identify the *P. americanas* and other insectivorous herbs (Scorpios and Leeches), and provide reference for the quality control and evaluation of *P. americanas*.

Key words: *Periplaneta Americana* Linnaeus; *Scorpio*; *Hirudo*; Fourier transform infrared spectroscopy; chemometrics; hierar chicalcluster analysis (HCA); principal component analysis (PCA); partial least squares discriminant analysis (PLS-DA)

收稿日期：2019-09-13
基金项目：西南民族大学研究生创新型科研项目（CX2018SZ73）
作者简介：李彦希（1994—），硕士，从事民族药创新药物研究与活性评价。Tel: 18280325939 E-mail: lyxcd123@163.com
***通信作者** 顾 健，教授，博士生导师，从事中药及民族药物创新研究与开发。E-mail: gujiancd@163.com

美洲大蠊 *Periplaneta americana* Linnaeus 属昆虫纲、蜚蠊目、蜚蠊科、大蠊属昆虫，俗称“蟑螂”。作为传统的药用昆虫，具有活血散瘀、解毒消疳、利水消肿等功效[1]。美洲大蠊药用价值早在《神农本草经》中就有记载：“味咸、寒，归肝、脾、肾经，治血瘀，症坚，寒热，破积聚，喉咽痹，内寒无子”[2]。全蝎 *Scorpio* 作为我国传统中药材，始载于《开宝本草》，别名全虫、蝎子，为节肢动物门蛛形钢钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥全体，性味辛、平，有毒，归肝经，具有熄风止痉、攻毒散结、通络止痛的功效[3]。水蛭 *Hirudo* 俗名蚂蟥，为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 或柳叶蚂蟥 *W. acranulata* Whitman 的干燥全体。水蛭的药用始载于《神农本草经》，性咸、苦，平；有小毒，归肝经，具有破血通经、逐瘀消瘕的作用[4]。虫类药在我国的应用历史悠久，为我国临床常用的名贵中药[5]。其疗效确切，经济效益可观，部分商家为了谋取暴利使得以假乱真、以次充好的现象频频发生，导致市场伪品泛滥。由于美洲大蠊与全蝎、水蛭的全虫药材经肉眼易于辨认，但 3 种药材的市售药粉难以区分，气味、颜色、质地差异较小，且市售价格差异较大，容易出现掺假行为。运用红外光谱技术建立美洲大蠊与全蝎、水蛭鉴别的方法具有一定价值意义。

常见虫类药的传统鉴定方法主要有性状鉴别、显微鉴别以及理化鉴别[6]。性状鉴别需要找出虫类药具有专属性的性状特征，大多是利用感官去鉴别，缺乏规范化及科学化[7]。显微鉴别主要应用于植物类药材，由于动物药材组成复杂，显微鉴定的应用受到一定的影响和限制[8]。而理化鉴别中的傅里叶红外光谱法具有快速、无损、灵敏等特性[9]，能体现样品中化学成分种类或含量的差异，为了精准对以上 3 种虫类药材进行快速鉴别，本实验采用傅里叶红外光谱法进行分析，对得到的光谱数据进行自动基线校正、自动平滑、纵坐标归一化法、二阶导数等预处理方法对光谱进行优化[10]，采用系统聚类分析（hierar chicalcluster analysis，HCA）、主成分分析（principal component analysis，PCA）以及偏最小二乘判别分析（partial least squares discriminant analysis，PLS-DA）进一步对光谱数据进行分析。为以上 3 种虫类药材的鉴别提供一定的科学依据。

1　材料

1.1　仪器

傅里叶变换红外光谱仪（天津港东科技股份有限公司）；YP-2 压片机（天津市拓普仪器有限公司）；烘箱（上海一恒科学仪器有限公司）；HC-100T 多功能粉碎机（河城工贸有限公司）；标准分析筛 200 目（成都企航仪器有限公司）。

1.2　药材与试剂

溴化钾（KBr，光谱纯）购于四川省自贡市化工研究设计院；8 个批次美洲大蠊（P1～P8）由四川好医生药业公司美洲大蠊 GAP 培育基地提供，8 个批次虫药全蝎（S1～S8）以及 8 个批次水蛭（L1～L8）均以 4 个不同产地为基准购自成都中药材市场，经西南民族大学药学院顾健教授鉴定为美洲大蠊 *Periplaneta americana* Linnaeus、东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 和水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman，具体信息见表 1。

表 1　样品信息

Table 1　Information of samples

编号	药材	产地	采集时间
P1	美洲大蠊	四川	2019-03
P2	美洲大蠊	四川	2019-03
P3	美洲大蠊	四川	2019-03
P4	美洲大蠊	四川	2019-03
P5	美洲大蠊	四川	2019-03
P6	美洲大蠊	四川	2019-03
P7	美洲大蠊	四川	2019-03
P8	美洲大蠊	四川	2019-03
S1、S2	全蝎	广西	2019-04
S3、S4	全蝎	山东	2019-04
S5、S6	全蝎	山西	2019-04
S7、S8	全蝎	新疆	2019-04
L1、L2	水蛭	安徽	2019-04
L3、L4	水蛭	广西	2019-04
L5、L6	水蛭	江苏	2019-04
L7、L8	水蛭	四川	2019-04

2　方法

2.1　样品的处理与制备

将美洲大蠊、全蝎、水蛭的全虫拍照存档后置于 60 ℃烘干箱中进行 3 h 干燥，粉碎后过 200 目筛，储存于干燥器中，备用。

2.2　样品测定

取干燥后的美洲大蠊、全蝎、水蛭粉末适量和

KBr 粉末（二者质量比约为 1∶150）于玛瑙研钵中，充分研细，取适量于均匀地平铺入模具内，以 10 MPa 压片，压制 1 min，取出后对光验视，以样片均匀、半透明为佳，作为供试品。将制备好的供试品置于样品架上，在 4 000～400 cm^{-1} 内进行光谱扫描，分辨率为 4 cm^{-1}，扫描累加次数 20 次，每次扫描时均扣除背景、H_2O 和 CO_2 的干扰。室内温度保持在 20～27 ℃。

2.3 数据处理

采用 OMNIC 9.2 软件对 3 种药材共 24 批样品的红外图谱进行自动基线校正、平滑、生成直线及二阶求导后再标峰位得到图谱数据，采用 Origin 2018 软件绘制红外指纹图谱，运用 SPSS 软件进行归一化处理和标准化处理后，使用 MetaboAnalyst 分析系统进行分析处理。

2.4 精密度试验

取美洲大蠊药材（P1）按“2.2”项下的方法制备成供试品，连续重复扫描 5 次，所得红外图谱的相似度在 0.999 0、0.998 9、0.998 6、0.999 2、0.998 7，RSD 为 0.02%，说明该方法精密度良好。

2.5 重复性试验

取美洲大蠊药材（P1），按“2.2”项下的方法，分别压片 5 次制备成 5 份供试品，所得红外图谱的相似度在 0.987 9、0.979 2、0.988 6、0.986 9、0.991 2，RSD 为 0.46%，说明该方法稳定性良好。

2.6 稳定性试验

取美洲大蠊药材（P1）按“2.2”项下的方法制备成供试品，每隔 10 min 扫描 1 次，共扫描 5 次，所得红外图谱的相似度在 0.993 4、0.995 7、0.988 4、0.994 2、0.995 4，RSD 为 0.30%，说明样品稳定性良好。

3 结果与分析

3.1 红外指纹图谱分析

8 批美洲大蠊药材的红外指纹图谱相似（图 1），主要吸收峰位于 3 770、2 939、2 870、2 388～2 381、1 716～1 711、1 663、1 560～1 541、1 471～1 463、1 413～1 399、1 118～1 073、718～712 cm^{-1} 等处。8 批全蝎药材的红外指纹图谱相似（图 1），主要吸收峰位于 3 771～3 770、3 444～3 304、2 939、2 876～2 870、2 384、1 754～1 752、1 664～1 662、1 541、1 463～1 456、1 411～1 398、1 238～1 166、718～617 cm^{-1} 等处。8 批水蛭药材的红外指纹图谱相似（图 1），主要吸收峰位于 3 769～3 770、3 433～3 312、2 940～2 941、2 876～2 874、2 385～2 374、1 662、1 558～1 552、1 457～1 456、1 401～1 400、1 088～1 083、672～664 cm^{-1} 等处。

3 种虫类药材的红外指纹图谱总体相似，共有峰位于 3 771～3 769、3 453～3 298、2 941～2 938、2 876～2 870、2 388～2 374、1 664～1 652 cm^{-1}。但 3 种药材红外指纹图谱的特征峰有差别，美洲大蠊在 1 711、1 410、712 cm^{-1} 处吸收峰明显，全蝎在 1 753、1 400、1 168、717 cm^{-1} 处吸收峰明显，水蛭在 1 558、1 457、1 400、669 cm^{-1} 处吸收峰明显，且水蛭在 1 753～1 711 cm^{-1} 处明显无吸收峰。从图中也可观察到，3 种虫类药材在 1 800～1 700 cm^{-1} 处峰形差异明显较大，全蝎在此处的峰最为明显，美洲大蠊峰形较短，水蛭在此处无峰。

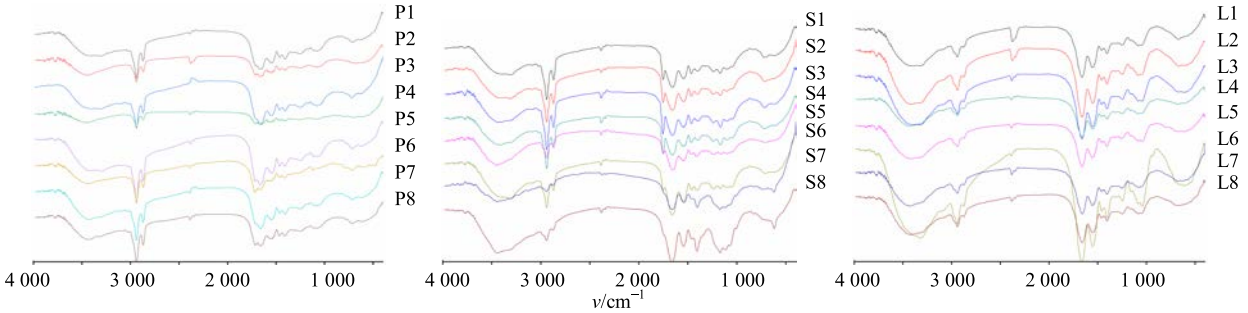

图 1 美洲大蠊与全蝎、水蛭的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of *P. americana Scorpio* and *Hirudo*

3.2 二阶导数红外光谱图分析

在美洲大蠊、全蝎和水蛭的二阶导数谱中，主要峰的位置相同（图 2），分别位于 1 754、1 466～1 461、1 410～1 401、1 243～1 236、1 169～1 164 cm^{-1}。但共有峰的强度不同，美洲大蠊在 787、717、624 cm^{-1} 处的峰明显。全蝎在 1 533、1 060、735 cm^{-1} 的峰强度明显高于其他 2 种药材的峰强度，且在 894、837、785、617、528 cm^{-1} 处的峰明显。而水蛭在 1 653 cm^{-1} 处的峰强度明显高于其他 2 种药材的峰强度，在 1 316、1 088 cm^{-1} 的峰强度明显低于

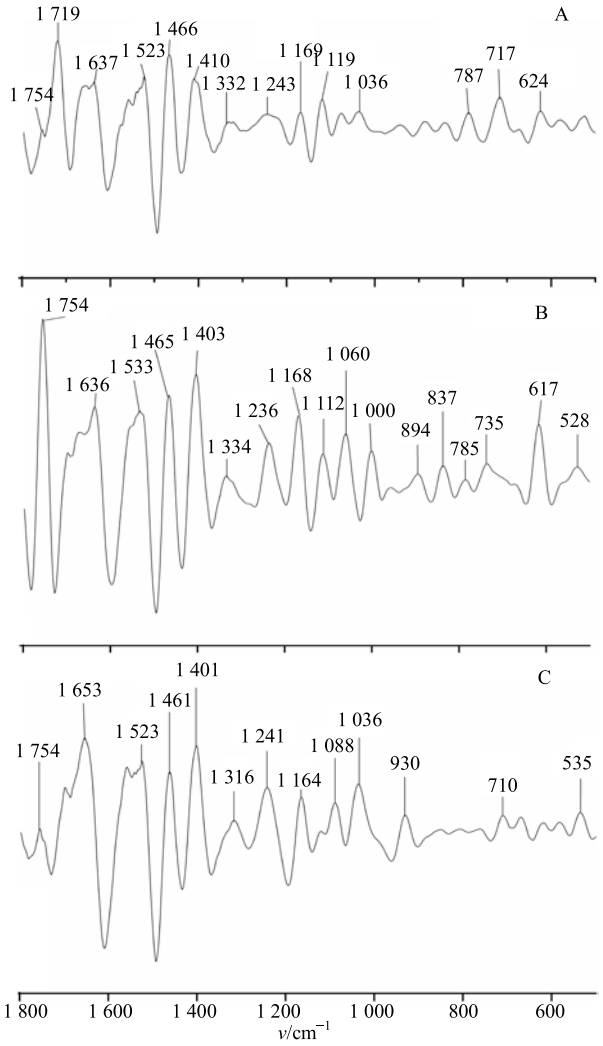

图 2　美洲大蠊 (A)、全蝎 (B) 与水蛭 (C) 二阶导数红外光谱图

Fig. 2　Infrared spectrum of second derivative of *P. americana* (A), Scorpio (B) and Leech (C)

其他 2 种药材的峰强度，且在 930、535 cm^{-1} 处的峰明显。

3.3　HCA

HCA 是聚类分析中应用最为广泛的一种方法，其聚类过程可以用称为谱系图的聚类树来形象地表达出来，这是直观表达聚类过程的最有效的方法[11]。根据实验所得红外图谱数据，选取 9 组共有特征峰，预处理运用 SPSS 25 矢量归一化一项，方法为标准法得到已标准化数据后，采用 MetaboAnalyst 分析系统中的 Ward 聚类算法进行分析。结果表明，距离为 25 时，水蛭单独聚为一类。距离为 7 左右时，美洲大蠊与全蝎各聚为一类，结果见图 3。但在距离为 3 左右时，全蝎-S5 出现在了美洲大蠊范围内，

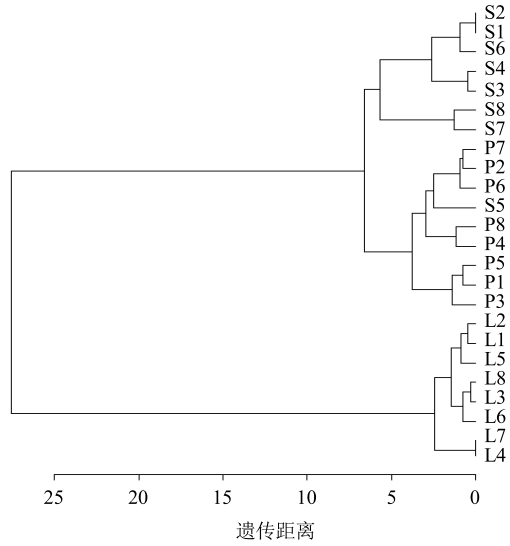

图 3　3 种虫类药材 HCA 图

Fig. 3　HCA dendrogram of three insectivorous herbs

这可能与实验过程中出现误差有关。

3.4　PCA

PCA 具有可信度高、灵活性强，侧重于综合评价信息的贡献影响力的特点，近年来，该方法在中药质量控制方面具有广泛的应用[12]。选取 9 组共有特征峰，预处理选择 HCA 同样的方式。采用 MetaboAnalyst 分析系统进行 PCA。如图 4-A 所示，美洲大蠊、全蝎和水蛭样品分布在不同区域，如图 4-B 所示，各点的聚集状态充分证明 3 种虫类药材内在成分不同。由此可见，通过特征峰和 PCA 可将这 3 种虫类药材区分开。

3.5　PLS-DA

PLS-DA 由 20 世纪 60 年代被提出，在 80 年代被用于化学分析[13]。PLS 法可用于对中药中复杂化学成分的谱图解析，不需要纯组分的信息，分析过程更加简便，结果更具有综合性[14]。选取 9 组共有特征峰，预处理采用 HCA 同样的方式，采用 MetaboAnalyst 分析系统进行 PLS-DA。如图 5-A 所示，美洲大蠊、全蝎和水蛭样品分布在不同区域。如图 5-B 所示，各点的聚集状态对比明显优于 PCA。由此可见，通过特征峰和 PLS-DA 可将这 3 种虫类药材区分开，且分析效果更好。在图中也可观察到不同产地之间的样品聚类结果具有一定的差异，这与当地的气候条件，土壤条件有一定的关系。

4　讨论

傅里叶红外光谱分析方法简便、快速，虫药经

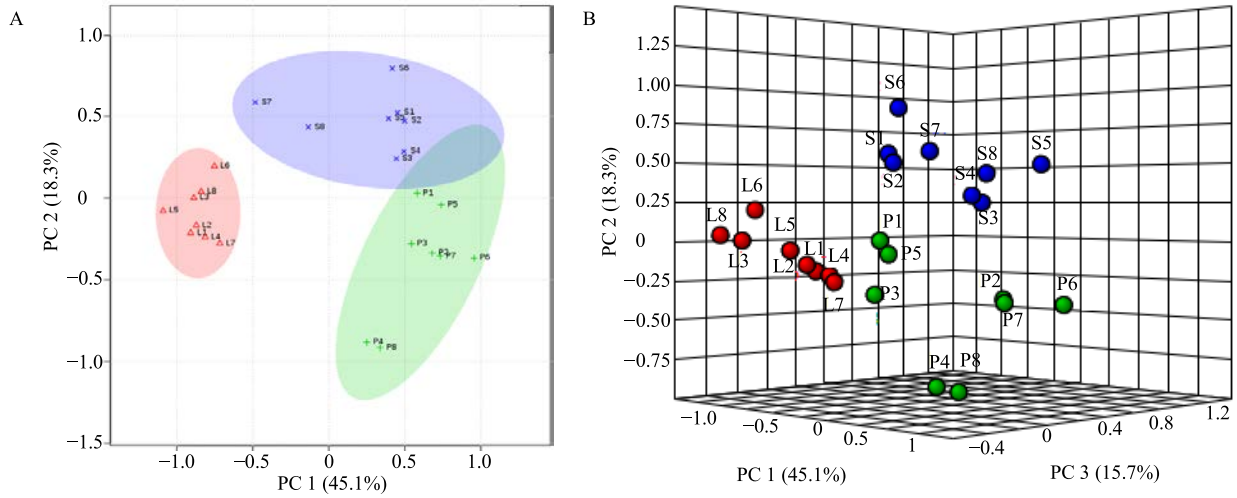

图 4 3 种虫类药材 PCA 二维得分 (A) 和 PCA 三维得分 (B)

Fig. 4 2D scattered scores plot (A) of PCA and 3D scattered scores plot (B) of PCA of three insectivorous herbs

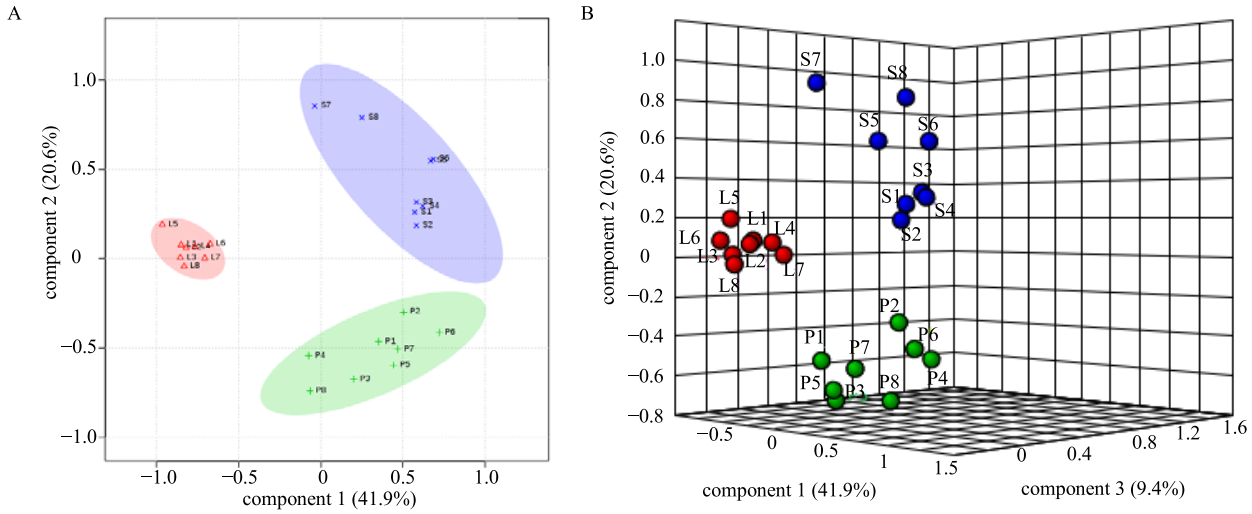

图 5 3 种虫类药材 PLS-DA 二维得分 (A) 和 PLS-DA 三维得分 (B)

Fig. 5 PLS-DA 2D scattered scores plot (A) and 3D scattered scores plot(B) of PLS-DA of three insectivorous herbs

粉碎烘干后无需进行任何多余的前处理即可进行压片分析，本研究运用此方法，结合一系列化学计量学分析软件，探讨美洲大蠊与全蝎、水蛭药材的快速鉴别方法。通过红外指纹图谱研究发现，3 种药材在 1 800～1 700 m^{-1} 处存在明显差异，全蝎峰形明显，美洲大蠊峰形较短，全蝎在此处无峰，这些峰形特征也均可作为鉴别的依据。从二阶导数光谱图中发现，3 种药材在 1 800～500 cm^{-1} 处峰形、峰位、强度均存在差异，表明 3 种虫药药材之间化学成分存在差异。在运用 HCA、PDA 和 PLS-DA 方法后能够明显鉴别 3 种虫类药材，其中 PLS-DA 分类结果最为突出。该研究为美洲大蠊与全蝎、水蛭药材的鉴别提供了快速、简便的新方法，也为美洲大蠊的质量控制及评价提供了参考依据。综上，以期为美洲大蠊及其他虫类药材的鉴别方法提供新的见解。

参考文献

[1] 高 洁, 沈咏梅, 岳碧松. 美洲大蠊药理作用及其临床疗效的研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4): 203-208.

[2] 孙星衍. 神农本草经 [M]. 北京: 商务印书馆, 1955.

[3] 吴福林, 董庆海, 王 涵, 等. 中药全蝎研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(12): 108-111.

[4] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[5] 卫莹芳. 中药鉴定学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010.

[6] 许 燕, 肖洪贺, 段双蕊, 等. 动物类中药鉴定技术研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2018(17): 156-160.

[7] 张朝晖, 徐珞珊. 我国动物类药材鉴定研究进展 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(11): 643-645.

[8] 李国华. 动物药鉴别研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 241-243.

[9] 陈前锋, 侯 鹏, 刘 巧, 等. 红外光谱法快速鉴别不同产地中药党参的研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2016, 38(6): 188-194.

[10] 吴方斌, 高姗姗, 韦学敏, 等. 羌活与宽叶羌活药材的红外光谱鉴别 [J]. 中药材, 2017, 40(3): 543-549.

[11] 刘木清, 周德成, 徐新元, 等. 聚类算法用于中药材的近红外光谱分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(10): 1985-1988.

[12] 孙立丽, 王 萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.

[13] Gromski P S, Muhamadali H, Ellis D I, *et al*. A tutorial review: Metabolomics and partial least squaresdi scriminant analysis-a marriage of convenience or a shotgun wedding [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 53(879): 10-23.

[14] 王露露, 孙倩怡, 杨慧海, 等. 模式识别及其在中药质量评价中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4282-4288.