

基于光谱法测定霉变甘草、海藻、黄连饮片微生物的数量

刘艺丹, 颜月玲, 宁 滢*, 王海霞*
(天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 301617)

摘要: **目的** 探究光谱技术在不同性味中药饮片霉变过程中微生物数量测试与分析方面的应用。**方法** 采集霉变过程中甘(甘草)、咸(海藻)、苦(黄连)3种药味饮片的中红外及拉曼光谱信息,同时采用表面增强拉曼光谱结合膜过滤法进行污染菌定量分析。**结果** 基于中红外光谱得到的主成分和正交偏最小二乘判别分析模型显示,3种饮片的霉变进程具有显著差异。在拉曼光谱分析中,4-巯基苯硼酸在 $1\ 075\ \text{cm}^{-1}$ 处的信号变化可以直观反映霉变过程污染菌数量。**结论** 红外光谱和拉曼光谱技术可以用于黄连、甘草、海藻三味饮片霉变过程中的微生物数量测试与分析,为不同性味中药饮片的霉变研究提供新方法。

关键词: 性味;霉变;红外光谱;表面增强拉曼光谱;膜过滤

中图分类号: R927.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)08-2791-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.049

中药饮片因吸湿性强且富含微生物生长所需养分,存储过程中极易霉变,因此需要格外关注饮片的贮存条件,如温度、湿度、空气洁净度、包材质量等^[1]。中药饮片发生霉变不仅与外界存储及流通条件有关,与饮片本身性味及所含有效成分也密切相关^[2],如甘味饮片多含糖类物质,极易霉变;苦味饮片多含生物碱类成分,多具有抑菌活性;咸味饮片多含无机盐类成分,也具有一定的霉变特征性^[3]。探明不同类别饮片的霉变规律,对于分类、精准制定药材的保存策略具有重要意义。目前,霉变相关研究多采用液相色谱、基因测序等^[4],这些方法耗时长,费用高,不利于普适化应用。近年来,红外、拉曼等光谱方法在微生物检测方面的应用被广泛关注^[5],但对不同性味饮片霉变过程中的监测研究则鲜有报道。本研究选取甘草、黄连、海藻3种模型中药饮片,通过收集霉变过程中饮片振荡液的红外及拉曼光谱信息,结合水分活度值(water activity, a_w)、需氧菌总数(total aerobic microbial count, TAMC)和霉菌、酵母菌总数(total combined yeasts mould count, TYMC)数据,揭示其霉变规律,并利用膜过滤和表面增强拉曼光谱(surface-enhanced raman scattering, SERS)方法对霉变情况进行监测,以期为不同性味中药饮片的霉变过程研究提供新方法。

1 材料

1.1 仪器 DXR2显微拉曼光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);IR Tracer-100傅里叶变换红外光谱仪(日本岛津公司);LabSwif便携式水分活度仪(瑞士Novasina公司)。

1.2 药物与试剂 甘草、黄连、海藻(批号173230602、20200011、20190101)饮片均购自河北仁心药业股份有限公司,经天津中医药大学宋新波研究员鉴定为正品,均符合2020年版《中国药典》一部标准。溴化钾(光谱纯,货号P116273-100 g,纯度 $\geq 98\%$) [阿拉丁试剂(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 霉变饮片制备 取干净的玻璃干燥器,打开盖子,在紫外灯下照射1 h进行表面消毒,采用75%乙醇对干燥器内部消毒3次,在干燥器底部用无菌培养皿放置150 mL饱和硫酸钾溶液,密封保存20 d,使整个干燥器内湿度达到平衡,相对湿度为 $97\% \pm 1\%$,作为霉变起始条件。实验前,打开紫外灯照射15 min进行表面消毒。在无菌超净台平行称取海藻、黄连、甘草3种饮片各4份,每份5 g,置于25 mL灭菌小烧杯内,无菌单层纱布封口,置于恒湿干燥器内吸湿并霉变,霉变时长共计15 d。

2.2 a_w 测试 均在室温下进行。分别选取霉变第0、3、6、9、12、15、18 d的黄连、甘草、海藻饮片,使用LabSwif便携式水分活度仪进行 a_w 值测定,平行测定3次^[6],保留3位有效数字。结果差异在 ± 0.003 以内确认稳定,记录 a_w 值。

2.3 供试品溶液制备 分别取霉变第0、3、6、9、12、15、18 d的饮片5 g,置于50 mL氯化钠蛋白胨缓冲液中,240 r/min振荡30 min,500目无菌纱布过滤,得到1:10供试品溶液,储存于50 mL玻璃管中。

收稿日期: 2024-09-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(82003944);天津市自然科学基金(24JCYBJC00230);党建创新研究项目(2024DJ03)

作者简介: 刘艺丹(2002—),女,硕士生,从事中药质控分析研究。Tel: 17302232098, E-mail: 812582389@qq.com

* **通信作者:** 宁 滢(1999—),女,硕士,从事中药质控分析研究。Tel: 15535437925, E-mail: 1975028573@qq.com

王海霞(1986—),女,博士,副研究员,从事中药质控分析研究。Tel: (022) 59791811, E-mail: whxtcm@tjutcm.edu.cn

2.4 菌落计数 根据 2020 年版《中国药典》四部通则 1108 项下中药饮片微生物限度检查法,进行菌落计数方法适用性试验,各试验菌回收率均符合要求。因此,采用菌落计数法对供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数进行计数^[7]。取供试品溶液 6 mL,分别加入 6 个无菌平皿中,每皿 1 mL。在 3 个平皿中加入 15~20 mL 胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA),混匀,凝固后倒置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 3 d;另 3 个平皿注入等量的沙氏葡萄糖琼脂培养基 (SDA),混匀,凝固后倒置于 25 ℃ 恒温培养箱培养 5 d,计算各组平均菌落数。

2.5 银包金纳米粒子 (Au@ AgNPs) 合成与表征 采用 Lee-Meisel^[8]方制备金纳米粒子 (AuNPs),以柠檬酸钠作稳定剂,在 AuNPs 表面通过抗坏血酸还原 AgNO₃ 制得 Au@ AgNPs^[9]。Au@ AgNPs 不仅可以极大程度地保留 AgNPs 的拉曼增强效果,而且以 AuNPs 为种子液合成的 Au@ AgNPs 尺寸和形状相对一致,有效保证了拉曼信号的重现性。此外,相比于其他复杂形状的纳米材料,Au@ AgNPs 合成方法相对简单,产物形状稳定、保存时间较长^[10]。因此,本研究选择 Au@ AgNPs 作为拉曼增强材料。

2.6 数据采集

2.6.1 中红外光谱 参考文献 [11] 方法。取“2.3”项下供试品溶液直接进行扫描,扫描次数 20 次;分辨率 4 cm⁻¹;波长范围 4 000~400 cm⁻¹。在收集样品光谱之前,采集未添加样品的空白晶体获得背景光谱,每份供试品溶液平行收集 10 条光谱,共得到 210 条中红外光谱。光谱数据整理后导入 SIMCA14.0 软件,并建立无监督的主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析模型 (OPLS-DA) 进行后续分析。

2.6.2 拉曼光谱采集 参考文献 [12] 方法。取“2.3”项下霉变饮片供试品溶液,过 0.45 μm 滤膜,使得污染菌被截留在滤膜表面。用 1 mL 纯水冲洗滤膜后,滴加 0.5 mL (100 μmol/L) 拉曼信号分子 4-巯基苯硼酸 (4-MPBA),再用 3 mL NH₄HCO₃ (100 mmol/L) 有效去除滤膜表面未结合的 4-MPBA 分子。然后,滴加 1 mL 拉曼增强基底 Au@ AgNPs,通过金硫键和 4-MPBA 结合,产生“污染菌-4-MPBA-Au@ AgNPs”复合物,用 1 mL 水冲洗后在 785 nm 激发光下进行拉曼成像检测^[13-14]。拉曼测试选用的激发光波长为 785 nm,设定激光功率 5 mW,采集曝光时间 1 s,预览采集时间 1 s,样品曝光次数 2 次,背景曝光次数 16 次。对滤膜进行面扫描采集,每张拉曼成像图由 10×10 阵列组成,步长设置为 20 μm,共 400 个采集点,采集时间为 10 min,拉曼位移 300~1 860 cm⁻¹。每种中药饮片采集 1 张空白灭菌光谱图与 7 张对应霉变天数的拉曼光谱图,最终得到 3 种中药饮片的 24 张拉曼光谱图。

3 结果

3.1 a_w 值分析 3 种饮片在高湿模拟环境中 a_w 值变化情况如图 1 所示,可知 3 种饮片的初始 a_w 值差异较大,苦味黄连饮片 a_w 值最高,为 0.705,为微生物滋生提供了有利

条件;0~3 d,吸湿速度最快,呈现出明显的吸湿特征,a_w 值增长至 0.795;3~6 d,a_w 值缓慢增长到 0.873;6~18 d,饮片吸湿呈缓慢增长趋势且达到饱和,a_w 值为 0.934。咸味海藻饮片的初始 a_w 值较低,仅为 0.572;0~3 d,吸湿速率最高,原因是海藻中富含无机元素,饮片与环境存在较高的渗透压差,使饮片易于吸收水分;3~6 d,饮片 a_w 值呈缓慢增长趋势;6~18 d,饮片吸湿速率略微降低,整体 a_w 值增长较慢,为 0.904。甜味甘草饮片初始 a_w 值为 0.547;0~6 d,饮片的 a_w 值增速较快,增长至 0.853;6~18 d 时 a_w 值变化幅度不大,持续缓慢增长;18 d,a_w 值增至 0.917。综上所述,3 种不同性味中药饮片在储存 18 d 后,其活度值都达到了 0.9 以上,为微生物的生长提供了充足的水分,有利于微生物的快速繁殖。

3.2 3 种饮片平板培养 如图 2 所示,甘草饮片霉变 0 d 时,TAMC 菌落种类单一,随着霉变时间延长,TAMC 值显著升高,菌落种类也逐渐丰富,呈不规则片状分布;3~15 d 时,甘草饮片 TAMC 值逐渐升高,污染菌落种类也从单一点状菌变化为不规则片状菌,而 TYMC 污染菌落以点状菌落和片状菌落交叉分布为主;18 d 时,TAMC 和 TYMC 总数趋于饱和,饮片霉变严重。海藻饮片随着霉变天数增加,TAMC 值和 TYMC 值都呈递增趋势,0~3 d 时,TAMC 值以片状菌为主;6~15 d 时,菌落类型发生转变,由不规则片状菌落变化为单一点状菌落;TYMC 起初表现为白色霉菌,12 d 时出现了 1 个片状菌落;15 d 时污染菌种类发生较大变化,转为片状霉菌,可能是由于海藻吸湿速度较快,为霉菌的生长提供了适宜条件;18 d 时,TAMC 值和 TYMC 值均达到饱和,饮片霉变严重。苦味黄连饮片抑菌性强,0~18 d 时,TAMC 菌类类型单一,呈点状分布,持续缓慢增长;18 d 时,TAMC 值已达到饱和,而 TYMC 在 3~12 d 时平板上只出现了 1 个青霉;15 d 时,菌落类型再次发生改变,由青霉转变为白霉;至 18 d 时,最终计数结果为 14 CFU/g,且此时饮片霉变严重。

3.3 菌落计数 由图 3 可知,甘草在 0~18 d 时,TAMC 总数一直大于 TYMC 总数;9~12 d 时,TAMC 和 TYMC 增长速率下降,可能是由于甘草酸等成分发挥了抗菌作用;一直到 18 d 时,TAMC 值增长至 1.8×10⁸ CFU/g,TYMC 值增长至 2.6×10⁷ CFU/g。海藻在 0~3 d 时,TAMC 和 TYMC 增长速率较快,而 3~9 d 时增长缓慢,可能是由于海藻中海藻酸钠对枯草芽孢杆菌等环境污染菌有一定的抑制作用;9 d 时,二者形成竞争抑制达到数量饱和,此时海藻进一步霉变,有效物质被分解利用,抑制作用消除,TAMC 大幅度增长;直至 18 d 时,TAMC 值和 TYMC 值分别增长至 1.7×10⁷、1.1×10⁴ CFU/g。黄连含有大量生物碱及黄酮类成分,均为抗菌杀菌的有效成分,因此在饮片吸湿过程中,黄连持续性抑菌,TAMC 增长缓慢,饱和值为 7.1×10³ CFU/g;TYMC 在 0~12 d 仅出现个别菌落生长,15 d 时菌落数量略微增多,原因是黄连在霉变过程中内部的抑菌成分被缓慢分解,抑菌作用降低;至 18 d 时,TAMC 值增长至 7.1×10³

CFU/g, TYMC 增长至 14 CFU/g, 饮片霉变严重。

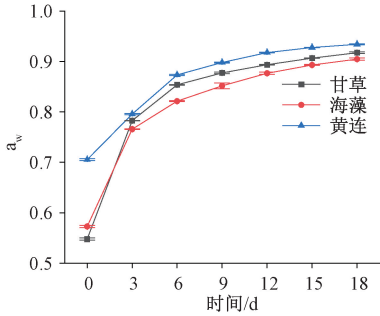


图 1 3 种饮片的 a_w 值变化

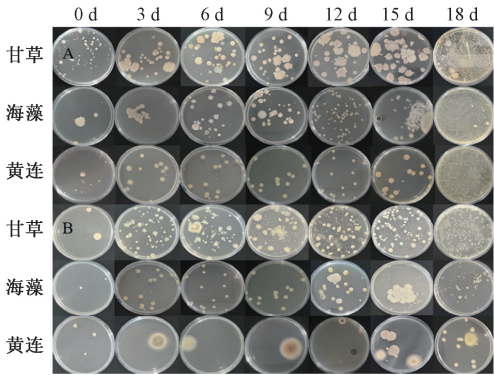
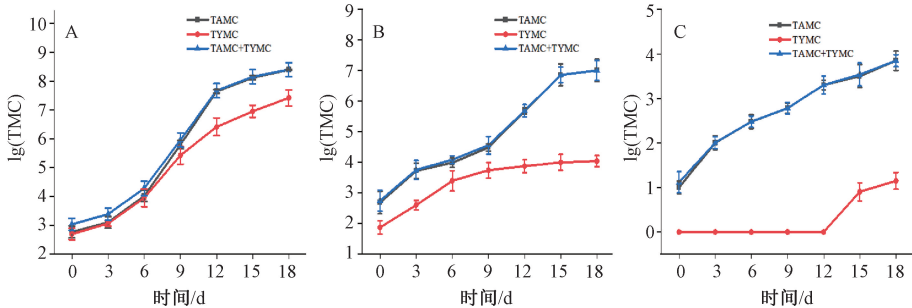


图 2 3 种饮片的 TMC 和 TYMC 平板培养结果

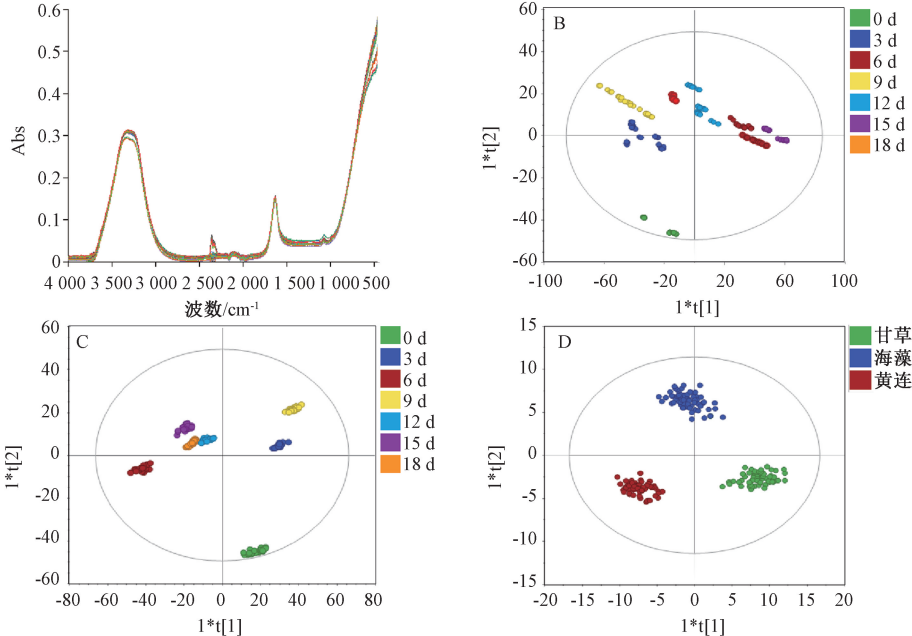


注：A、B、C 分别为甘草、海藻、黄连。

图 3 3 种饮片的 TMC 与 TYMC 的测定结果

3.4 中红外光谱分析 由图 4A 可知，该图谱包含了供试品溶液中总成分的指纹信息^[15]，即样本中微生物本身或代谢活动产生的一些蛋白质、脂质、多糖和核酸的化学键振动信息。但由于供试品溶液水分或检测环境干扰，原始光谱图并不能直观反映样本信息。因此，本实验基于 210 条中红外光谱数据建立了 PCA 判别模型（图 4B），结果霉变

相同天数的饮片有相似的分布趋势，且自变量拟合指数 (R^2X) 为 0.997，模型预测指数 (Q^2) 为 0.906，说明中红外光谱对中药饮片的霉变周期具有很高的判别能力。为进一步探究中红外光谱对不同药味饮片霉变的辨识效果，本实验还构建了不同霉变天数和不同药味饮片的 OPLS-DA 模型^[16]（图 4C、4D），可知 OPLS-DA 模型比 PCA 模型的



注：A 为中红外光谱，B 为不同霉变天数 PCA 得分图，C 为不同霉变天数 OPLS-DA 得分图，D 为不同药味饮片的 OPLS-DA 得分图。

图 4 3 种饮片的原始中红外光谱分析

判别分析效果好,且本次 R^2X 为 0.999,因变量拟合指数 (R^2Y) 为 0.971, Q^2 为 0.963, R^2 与 Q^2 超过 0.5 表示模型拟合结果可接受^[17-18]。经过 200 次置换检验, Q^2 回归线与纵轴的相交点小于零,说明模型不存在过拟合,模型验证有效,认为该模型可用于甘草、海藻和黄连 3 种不同药味饮片 ($Q^2=0.914$) 及不同霉变时期的判别分析。说明结合统计分析方法,中红外光谱可对中药饮片霉变进程具有良好的预测潜力。

3.5 拉曼光谱分析 首先对 Au@AgNPs 拉曼增强粒子的性能进行分析。如图 5A 所示,对 AuNPs 与 Au@AgNPs 的光学性质进行对比。AuNPs 在 529 nm 波长处出现了明显的共振吸收峰,而包覆银纳米粒子后,溶液颜色由酒红色变为橙黄色,且 Au@AgNPs 溶胶液在 396 nm 波长处出现了 Ag 的共振吸收峰,表明 Au@AgNPs 溶胶制备成功。Au@AgNPs 的流体动力学直径图见图 5B,可知有效水合粒径为 40.48 nm。

3 种霉变中药饮片的拉曼光谱图见图 6,可知包含 390、470、635、1 007、1 075、1 170、1 488、1 585 cm^{-1} 等特征峰^[19],其中 2 个最明显的特征峰 1 075、1 586 cm^{-1} 分别对应 4-MPBA 的 C—H 的面内弯曲振动和 C—C 的伸缩振动。鉴于 1 075 cm^{-1} 处拉曼峰强度稳定、峰形良好,且峰位未发生偏移,因此本研究以 1 075 cm^{-1} 处拉曼特征峰作为定量依据。对于甘草饮片,1 075 cm^{-1} 处拉曼强度变化范围为 150~

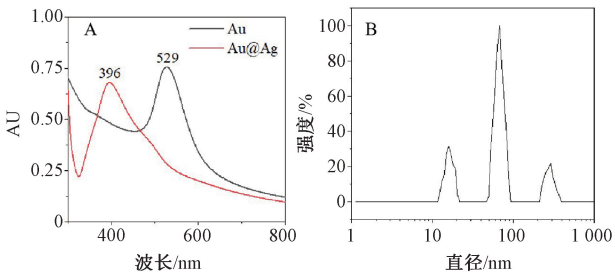
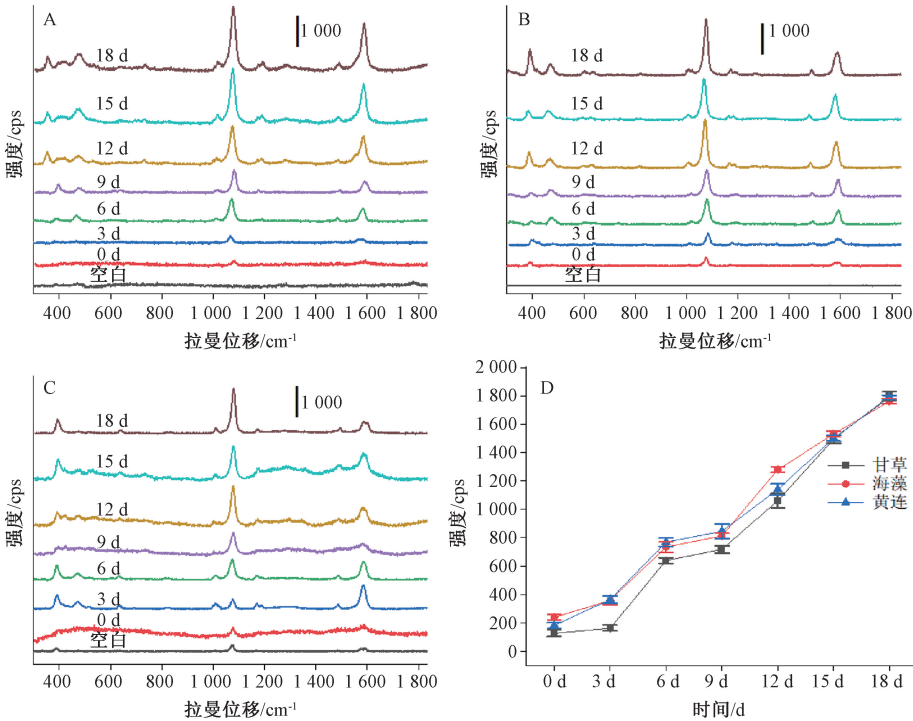


图 5 Au@AgNPs 的有效水合粒径分布图 (A) 及 AuNPs、Au@AgNPs 的紫外吸收图 (B)

1 850 cps,其整体波动趋势与污染菌总数变化结果(图 3A)相似。在 0~18 d 内,海藻饮片的拉曼强度变化范围在 220~1 780 cps,波动趋势同样与“TAMC+TYMC”总数变化结果(图 3B)相似。黄连饮片的 SERS 光谱图除 3 d 和 6 d 外,均受到不同程度的荧光信号的干扰导致基线漂移。但 1 075 cm^{-1} 处特征峰的峰位未偏移,可作为饮片污染菌的定量依据^[20-21]。黄连的 SERS 光谱强度范围为 200~1 800 cps,其中 0~18 d 时检测到滤膜上 1 075 cm^{-1} 处拉曼信号值在不断增强,到第 18 d 时达到最大值,对比图 3C 可以看出,黄连饮片在霉变过程中,1 075 cm^{-1} 处拉曼峰强与“TAMC+TYMC”总数变化也趋于一致,说明 1 075 cm^{-1} 处 4-MPBA 的特征峰可以充分反映饮片中污染微生物总数信息。



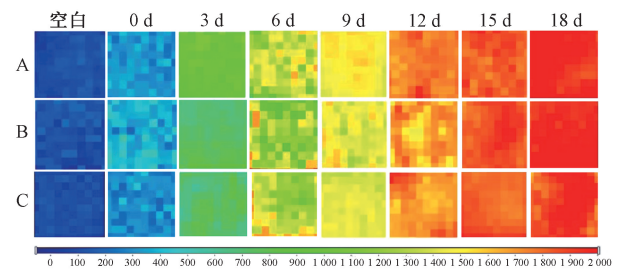
注: A~C 分别为甘草、海藻、黄连, D 为 1 075 cm^{-1} 处拉曼特征峰的平均强度变化。

图 6 3 种饮片的 SERS 光谱图

不同霉变天数的 3 种饮片在 1 075 cm^{-1} 处的拉曼成像图见图 7。在甘草饮片中,空白样本的拉曼成像图全部为蓝色像素点,说明没有截留到污染菌;霉变 0 d 时,出现大量蓝

色信号,TAMC 总数为 5.4×10^2 CFU/g;霉变 3 d 时,主要为绿色信号,此时“TAMC+TYMC”数目开始增多;6 d 时,以黄绿色信号为主;9 d 时,拉曼成像图逐渐变成黄

色；12~18 d 时，拉曼成像图由橙色转变为红色，且红色程度加深（图 7A）。海藻饮片的拉曼成像图变化趋势与甘草近似，一开始菌落数量很少，拉曼成像图显示大面积蓝色信号，随着霉变程度的加深，进而转为绿色、黄色、橙色，到 18 d 时，可观察到大面积菌落，对应的拉曼信号转变为红色（图 7B）。黄连饮片在霉变过程中，拉曼成像图也呈现从深蓝色-淡蓝色-绿色-黄色-橙色-红色的质变过程，说明拉曼成像检测效果与光谱峰值测试结果类似，也可以充分反映饮片中污染微生物总数信息（图 7C）。因此，本研究提出的膜过滤结合 SERS 成像检测技术可以直观反映中药饮片的霉变过程，实现中药饮片霉变污染菌的快速监测。



注：A、B、C 分别为甘草、海藻、黄连饮片。
图 7 不同霉变天数的 3 种饮片污染菌在 1 075 cm⁻¹ 处的拉曼成像图

4 结论

本实验创新性地研究了 3 种中药饮片霉变特性，通过监测 a_w、TAMC 及 TYMC 变化，并融合中红外与拉曼光谱技术，多维度揭示了霉变过程与药味间的复杂关联。此外，本研究利用中红外光谱数据构建的 OPLS-DA 模型，精准区分了不同霉变阶段及不同药味饮片，实现了高效判别；进一步创新性整合 SERS 技术与膜过滤法，构建了中药霉变监测体系，将污染菌数量直观映射为拉曼特征峰强度，不仅加速了检测流程，还实现了检测结果的可视化与数字化，可为中药饮片霉变预测提供一种高灵敏检测策略，为中药霉变研究开辟了新方法。

参考文献：

[1] 崔 颖. 中药饮片药房贮存保管方式分析[J]. 中国处方药, 2018, 16(11): 39-40.
[2] 杨瑞琦. 基于电子鼻的易霉变中药质量快速评价[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
[3] 孙 莺, 王玉梅, 何晓英, 等. 甘肃省地道药材黄芪、甘草、板蓝根中药饮片的微生物污染状况研究[J]. 卫生职业教育, 2020, 38(22): 119-122.
[4] 阴耕云, 肖 冬, 王 凯, 等. 基于 16S rRNA 基因测序分析烟叶发酵过程中表面微生物的多样性[J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(3): 102-112.
[5] 刘风翔, 何 帅, 张礼豪, 等. 拉曼光谱技术在病原微生物检测中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2022, 42(12): 3653-3658.

[6] 李 辉. 基于水分活度的中药微生物控制应用研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2023.
[7] 王 燕, 章 红, 段和祥, 等. 14 种易霉变饮片微生物污染状况及其表面真菌多样性研究[J]. 中国药理学杂志, 2024, 59(7): 571-578.
[8] Lee P, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols[J]. *J Phys Chem*, 1982, 86(17): 3391-3395.
[9] Uzayisenga V, Lin X D, Li L M, et al. Synthesis, characterization, and 3D-FDTD simulation of Ag@ SiO₂ nanoparticles for shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Langmuir*, 2012, 28(24): 9140-9146.
[10] Awiaz G, Lin J, Wu A. Recent advances of Au@ Ag core-shell SERS-based biosensors[J]. *Exploration*, 2023, 3(1): 33.
[11] 王小鹏, 张 璐, 陈鹏举, 等. 近红外光谱技术应用于中药四类味觉分类辨识的可行性分析[J]. 中草药, 2023, 54(4): 1076-1086.
[12] 梁 浩, 纪徐维晟, 王献瑞, 等. 基于中药拉曼谱图的寒热药性判别研究[J]. 世界中医药, 2023, 18(1): 65-69.
[13] 杨 青. 面向纳米颗粒污染物富集分析的膜过滤与 SERS 一体化方法研究[D]. 济南: 山东大学, 2023.
[14] Yang H Z, Li J Y, Rao Y, et al. Ultrasensitive multiplex SERS immunoassay based on porous Au-Ag alloy nanoparticle-amplified Raman signal probe and encoded photonic crystal beads[J]. *Microchim Acta*, 2022, 190(1): 13.
[15] Xia J J, Xu W X, Li Y J, et al. Quality control of pesticide using infrared spectroscopic coupled with fingerprint analysis[J]. *Infrared Phys Techn*, 2022, 122: 104052.
[16] 孙 瑞, 李任时, 余伯阳. 基于特征图谱和 OPLS-DA 的茯苓产地溯源分析[J]. 海峡药学, 2021, 33(9): 18-22.
[17] Wan Y T, Chen Y, Zhang W J, et al. Application of FT-IR spectroscopy and chemometric technique for the identification of three different parts of *Camellia nitidissima* and discrimination of its authenticated product[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 931203.
[18] 王 嵘. 中草药(蒲公英和灵芝)多种活性物质红外光谱分析及鉴定方法研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2023.
[19] 王 钰. 基于多点扫描拉曼光谱技术的微生物单细胞鉴定与分类研究[D]. 长春: 中国科学院大学(中国科学院长春光学精密机械与物理研究所), 2023.
[20] Zhu X Y, Ning Y, Zhang Z S, et al. A universal approach for sensitive and rapid detection of different pathogenic bacteria based on aptasensor-assisted SERS technique[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2023, 415(8): 1529-1543.
[21] Wen P, Yang F, Zhao H X, et al. Novel digital SERS-Microfluidic chip for rapid and accurate quantification of microorganisms[J]. *Anal Chem*, 2024, 96(4): 1454-1461.