

红外三级鉴定法快速鉴别龙虾的 4 个品种

陈新璐, 狄志彪, 李高燕, 孙稚颖, 周凤琴

(山东中医药大学 药学院, 山东 济南 250355)

摘要: 为鉴别不同龙虾(*Panulirus*), 作者选用一维红外光谱(FTIR)、二阶导数谱(SDIR)和二维相关红外光谱(2DIR)来逐步提高谱图的分辨率, 使得 4 个品种的差异性逐渐明显。结果表明: 在一维谱图上, 波士顿龙虾(*Homarus americanus*)没有酰胺 II 带的特征峰; 日本龙虾(*Panulirus japonicus*)在 $1\ 333\ \text{cm}^{-1}$ 处有尖峰。在二阶导数谱上, 日本龙虾在 $1\ 333\ \text{cm}^{-1}$ 处尖峰更明显, 且在 $1\ 535\ \text{cm}^{-1}$ 处有吸收峰, 与其他品种的差异表现得更明显。波纹龙虾(*Panulirus homarus*)在 $1\ 567\ \text{cm}^{-1}$ 处有尖峰, 锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)在 $1\ 567\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰弱而不明显, 故可以区分出波纹龙虾和锦绣龙虾。在二维相关红外谱图上, 进一步佐证了 4 种龙虾所含的氨基酸、蛋白质在种类和含量上有所差异。所以红外三级鉴定法可以对龙虾进行快速、有效的鉴别。

关键词: 锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*); 日本龙虾(*Panulirus japonicus*); 波纹龙虾(*Panulirus homarus*); 波士顿龙虾(*Homarus americanus*); 一维红外光谱; 二阶导数谱; 二维相关红外光谱

中图分类号: R931.77 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)07-0031-06
DOI: 10.11759//hykx20161019004

龙虾(*Panulirus*)药材来自甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、龙虾科(Palinuridae)动物的干燥或新鲜的肉, 性温, 味甘咸, 归肝、肾经, 具有补肾壮阳, 养血固精的功效, 临床上用于治疗肾虚、手足抽搐等症状。龙虾类为大型名贵经济虾类^[1], 全世界龙虾 400 多种, 中国沿海共有 8 种龙虾分布^[2], 龙虾为传统名贵食材, 药食同源, 其肉味鲜美, 营养价值高^[3], 龙虾的蛋白质含量高于其他水产品, 而且其氨基酸组成比起其他肉类, 更易被人体消化和吸收。龙虾的脂肪含量比沼虾(*Macrobrachium*)、对虾(*Penaeus*)低很多, 更利于人体健康。此外, 龙虾也富含人体所需的矿物成分和维生素, 故龙虾备受人们喜爱, 是中国沿海经济价值比较高的渔业品种。通过调查, 目前在中国市场上流通的主要有锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)、日本龙虾(*Panulirus japonicus*)、波纹龙虾(*Panulirus homarus*)和波士顿龙虾(*Homarus americanus*)4 个品种。

一直以来, 龙虾的鉴别主要采用传统的性状鉴别和显微鉴别, 鉴别的依据为生殖肢的构造^[4], 但这一性状易受环境、生长发育阶段等因素的影响, 从而表现不够稳定, 导致鉴定困难。而龙虾不同物种头胸甲、表面纹理及尾扇等变异复杂多样, 同样不利于龙虾的准确鉴定。因此, 为了更好地开发研究这一市场前景广阔、经济价值大、药食同源的名贵药材, 有必

要采用一种高效的现代鉴定技术对龙虾进行精准分类。傅里叶红外光谱法(FTIR)是一种快速、简便、非破坏性的分析方法, 已广泛应用于中药、保健品、食品等方面的真伪优劣鉴别中^[5-7]。近年来, 随着二维相关红外光谱技术的发展, 很大程度上提高了红外光谱图的分辨率, 可获得更多的光谱信息, 为分析鉴定提供了快速有效的方法^[8]。作者采用一维红外光谱(FTIR)、二阶导数谱(SDIR)和二维相关红外光谱(2DIR)的红外三级鉴定法^[9]对中国市场常见的、流通量高的锦绣龙虾、日本龙虾、波纹龙虾和波士顿龙虾进行了鉴别, 旨在龙虾的资源开发和深入研究提供新资料。

1 材料与方法

1.1 材料来源与制备

2015 年 10 月~12 月, 根据海产品市场情况, 对沿海两省 4 市的海鲜市场进行了样品采集, 包括山

收稿日期: 2016-10-19; 修回日期: 2017-01-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2013AA093001)

[Foundation: High Technology Research and Development Program of China, NO.2013AA093001]

作者简介: 陈新璐(1991-), 女, 山西太原人, 硕士研究生, 主要从事药理学药用植物资源与分类鉴定研究, E-mail: 1527724541@qq.com; 孙稚颖, 通信作者, E-mail: szywww@126.com

东省烟台、青岛、威海和广西省北海。从 4 省市共采集龙虾样品 4 种, 每个物种各购买 5 个样品, 同一

份样品平行测定 3 次。经中国海洋大学马琳老师鉴定, 见表 1。

表 1 材料来源
Tab. 1 Material source

种名	购买地	采集时间(年-月-日)
锦绣龙虾(<i>Panulirus ornatus</i>)	广西北海	2015-10-13
日本龙虾(<i>Panulirus japonicus</i>)	山东济南	2015-12-21
波纹龙虾(<i>Panulirus homarus</i>)	山东烟台	2015-12-21
波士顿龙虾(<i>Homarus americanus</i>)	山东青岛	2015-10-13

样品的制备: 将新鲜龙虾处死、剥壳、取肉、切片后置于恒温干燥箱于 50℃ 下烘 72 h, 粉碎过 200 目筛, 即得样品。

试剂: 溴化钾碎状晶体, 分析纯。

1.2 仪器与测试条件

傅里叶变换红外光谱仪(Spectrum One 型, PerkinElmer 公司), DTGS 检测器, 分辨率设置为 4 cm^{-1} , 测量范围设置为 4 000~400 cm^{-1} , 扫描信号累加 16 次, OPD 速度为 0.2 cm^{-1}/s , 扫描时实时扣除 CO_2 和水的干扰。

1.3 实验方法

一维谱图: 采取 KBr 压片法进行制样。分别称取 4 种龙虾药材粉末约 3 mg, 与 200 mg 的溴化钾混合充分, 均匀地研磨, 压片后进行测定, 获得各样品的一维红外光谱图^[10-11]。

二阶导数谱: 采用美国 Nicolet 公司研发的 OMNIC 软件中的二阶求导功能, 进行 13 点平滑, 获得各样品的红外二阶导数光谱图。

二维谱图: 将压制好的样品片置入变温附件中, 温度从 50 °C 逐步升高到 120 °C, 程序控制, 等间隔采样, 每隔 10 °C 采集一次红外光谱图。分别对所采集的一系列动态光谱图进行基线校正处理。采用清华大学自编的二维相关分析软件对所得的系列谱图进行处理, 可获得各样品的不同波段的二维相关光谱。

2 结果与讨论

2.1 一维红外光谱(FTIR)

图 1 为锦绣龙虾、日本龙虾、波纹龙虾、波士顿龙虾的红外光谱图。锦绣龙虾在 1 650、1 542 cm^{-1} 处, 日本龙虾在 1 648、1 545 cm^{-1} 处, 波纹龙虾 1 649、1 541 cm^{-1} 处, 波士顿龙虾 1 661 cm^{-1} 处酰胺带和酰胺带的特征峰非常明显^[12], 可表明这 4

种龙虾均含有丰富的氨基酸、多肽、蛋白质类成分。而且可明显看出, 波士顿龙虾比其他 3 个品种的峰弱, 且没有酰胺带的特征峰, 表明氨基酸、多肽、蛋白质的含量少于其他 3 个品种。另外, 锦绣龙虾在 1 082 cm^{-1} 、日本龙虾在 1 081 cm^{-1} 、波纹龙虾在 1 081 cm^{-1} 和波士顿龙虾在 1 070 cm^{-1} 处有弱吸收峰, 即糖苷类 $\gamma\text{C-O}$ ^[13-14], 波士顿龙虾在 3 440 cm^{-1} 处峰形较宽, 是由糖类分子中的羟基形成多种方式的氢键所致^[15], 表明 4 个品种的龙虾含有糖苷类成分。锦绣龙虾、日本龙虾和波纹龙虾 3 个品种在 2 961、1 542、1 452、1 237、896、530 cm^{-1} 附近均有强弱不等的吸收峰, 而波士顿龙虾没有, 也就是说, 波士顿龙虾比其他 3 个品种少 6 处吸收峰, 所含的化学成分的种类也比其他 3 个品种少。锦绣龙虾、日本龙虾、波纹龙虾图谱较为相似, 在 3 290 cm^{-1} 附近出现特征峰, 说明含有不饱和的烃类, 且分别在 1 237、1 236、1 238 cm^{-1} 处有宽峰, 表明含有因 $p-\pi$ 共轭, 使醚键的双键性增加的一 $\text{C}=\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 基团, 即烯醚类成分。锦绣龙虾在 3 290、1 650 cm^{-1} 处、日本龙虾在 3 290、1 648 cm^{-1} 处和波纹龙虾在 3 295、1 649 cm^{-1} 处均表示含有甾体、不饱和脂肪酸类化合物。日本龙虾在 1 333 cm^{-1} 处有一弱尖峰, 波纹龙虾和锦绣龙虾没有, 可将日本龙虾区分出来。在一维谱图中, 锦绣龙虾和波纹龙虾的差异并不明显。

2.2 二阶导数谱(SDIR)

二阶导数谱能够提高谱图峰分辨率, 可获得比一维红外谱图更多的信息, 进一步分析比较 4 种龙虾的二阶导数谱(图 2)。锦绣龙虾、日本龙虾、波纹龙虾在二阶导数谱上仍然有很大的相似性, 这 3 个品种在 1 237 cm^{-1} 处有相似的 $\gamma\text{C-O}$, 可表明这 3 个品种含有醇类成分。此外, 锦绣龙虾在 1 626 cm^{-1} 、日本龙虾在 1 626 cm^{-1} 、波纹龙虾在 1 626 cm^{-1} 、波士顿龙虾在 1 627 cm^{-1} 处表示有 $\gamma\text{C}=\text{N}$, 即 4 个品种均

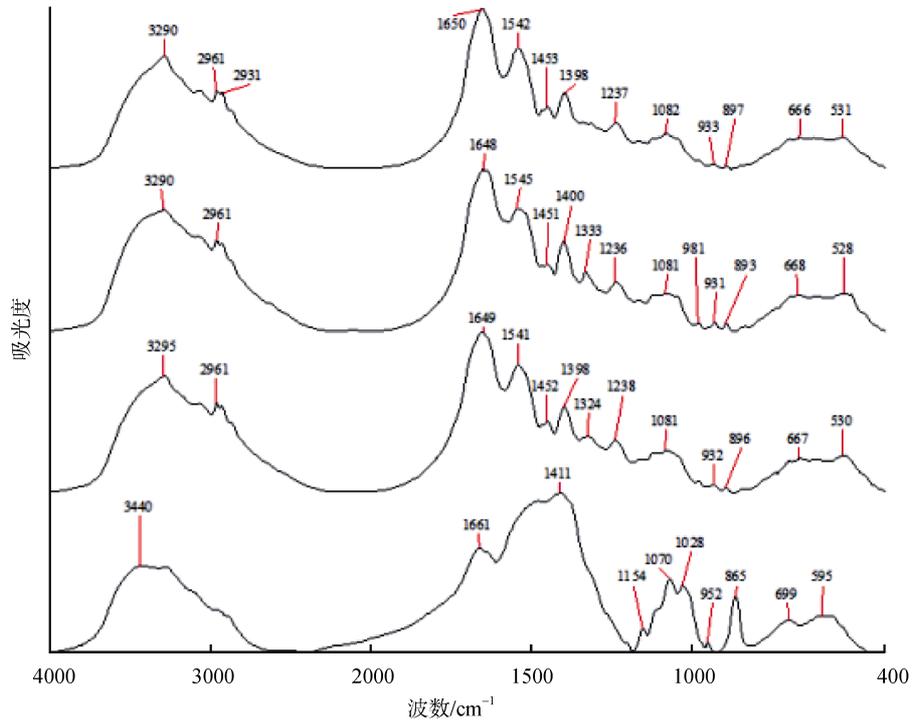


图 1 4种龙虾一维红外光谱图

Fig. 1 One-dimensional infrared spectra obtained from lobster species

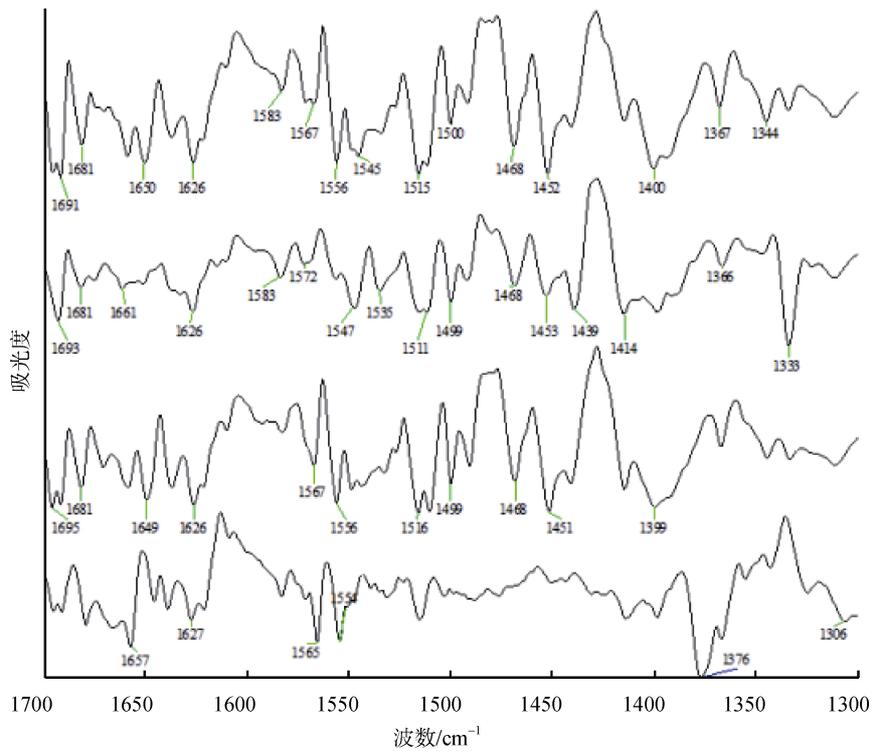


图 2 4种龙虾二阶导数谱图

Fig. 2 Second derivative spectra of lobster species

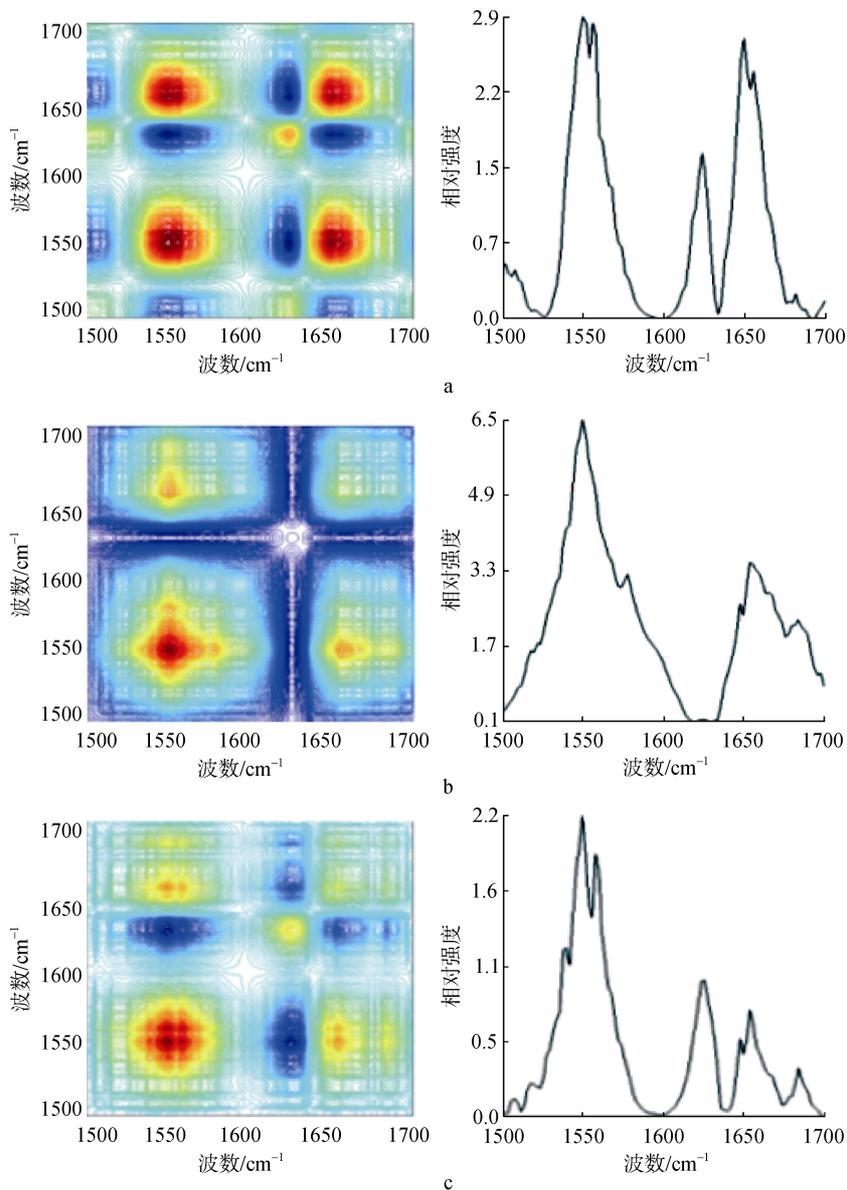
含有生物碱类成分, 波士顿龙虾的峰弱与其他 3 个品种, 即生物碱的含量低于其他 3 个品种。日本龙虾在 1333 cm^{-1} 处有一强尖峰, 在 1535 cm^{-1} 处有吸收峰, 而锦绣龙虾和波纹龙虾没有, 较一维谱图而言, 日本龙虾的差异更明显。波纹龙虾在 1567 cm^{-1} 处有尖峰, 锦绣龙虾在 1567 cm^{-1} 处的峰弱而不明显, 故可以区分出波纹龙虾和锦绣龙虾。

2.3 二维相关红外图谱(2DIR)

锦绣龙虾、日本龙虾、波纹龙虾、波士顿龙虾的一维红外光谱和高分辨的二维导数谱都从不同角度上体现了 4 个品种所含化合物的差异, 为了鉴定地更准确、更可靠, 进一步观察了 4 个品种在热微扰情况下动态图谱的结构特征。

图 3 为 4 个品种的二维相关图谱及自动峰强度

曲线图, 可以看出, 在 $1700\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 范围内, 锦绣龙虾在 1552 、 1560 、 1624 、 1652 、 1660 cm^{-1} 处有 5 个强的自动峰; 日本龙虾在 1552 、 1655 cm^{-1} 处有 2 个强的自动峰, 在 1580 、 1686 cm^{-1} 处有 2 个较弱的自动峰; 波纹龙虾在 1550 、 1562 、 1625 、 1655 、 1686 cm^{-1} 处有 5 个强的自动峰; 波士顿龙虾在 1505 、 1520 、 1535 、 1540 、 1565 cm^{-1} 处有 5 个强的自动峰。4 个品种自动峰的位置和相对强度的不同, 说明在 $1700\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内, 4 个品种的氨基酸基团对温度敏感程度不同, 即 4 个品种所含氨基酸、蛋白质的种类有所不同。显然, 从样本的二维红外光谱分析也能够进一步佐证龙虾的 4 个品种所含氨基酸、多肽和蛋白质的种类和含量有差异。



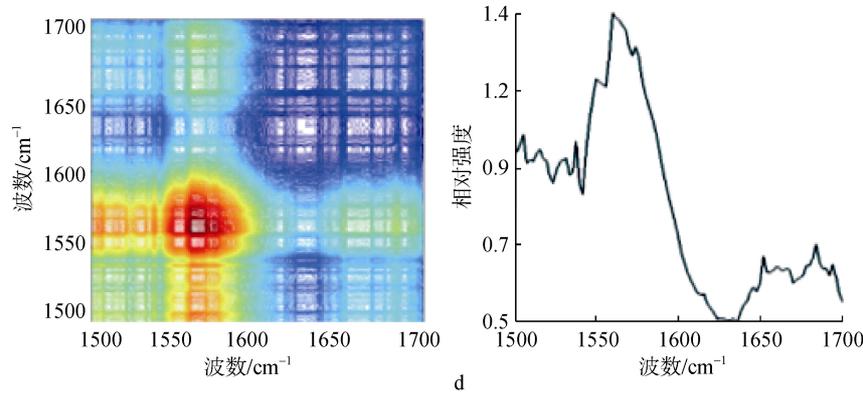


图 3 4 种龙虾二维相关图谱

Fig. 3 Two-dimensional correlation infrared spectroscopy of lobster species

a. 锦绣龙虾; b. 日本龙虾; c. 波纹龙虾; d. 波士顿龙虾

a. *Panulirus ornatus*; b. *Panulirus japonicus*; c. *Panulirus homarus*; d. *Homarus americanus*

3 结论

通过选用一维红外光谱、二阶导数谱和二维相关红外光谱构成的红外三级鉴定法不仅鉴别出锦绣龙虾、日本龙虾、波纹龙虾、波士顿龙虾，还可以分析出 4 个样本中所含的氨基酸、蛋白质、甾体、不饱和脂肪酸、糖苷类、烯醚、生物碱类化合物也具有很大差异。红外三级鉴定法的三者相互补充、相互佐证，三者分辨率依次增大，谱图差异性逐渐明显、直观^[16-17]，通过实验可以看出该方法可快速区分出这 4 个龙虾品种，为龙虾的鉴别提供有效、快速的方法，也为中药、保健品、食品等方面的真伪优劣鉴别提供更广阔的应用前景。

参考文献:

[1] 张昭. 中国海龙虾下目 Infraorder Palinuridea 分类和动物地理学特点[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2005.
Zhang Zhao. Taxonomic study and zoogeographic characteristics of Palinuridea (Crustacea: Decapoda) of the China seas[D]. Qingdao: Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences, 2005.

[2] 梁华芳, 徐晓鹏, 黄志坚, 等. 中国沿海龙虾属 8 种龙虾 COI 基因序列的分子系统学研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2011, 50(6): 94-98.
Liang Huafang, Xu Xiaopeng, Huang Zhijian. The molecular phylogeny on eight species of *Panulirus* genus from the Chinese coast based on COI gene sequence[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2011, 50(6): 94-98.

[3] 刘丽, 杨新龙, 刘楚吾, 等. 南海海域常见龙虾的遗传多样性分析[J]. 水产科学, 2012, 31(3): 160-164.
Liu Li, Yang Xinlong, Liu Chuwu. Genetic diversity of

common spiny lobsters in South China Sea[J]. Fisheries Science, 2012, 31(3): 160-164.

[4] 沈炎斌. 辽宁热河生物群小龙虾化石形态特征及分类之甄别[J]. 科学通报, 2000, 45(18): 1928-1935.
Shen Yanbin. Liaoning jehol biological group of lobster fossil morphological characteristics and classification of identifying[J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(18): 1928-1935.

[5] 黄冬兰, 陈小康, 徐永群. 红外三级鉴定法快速鉴别山豆根和北豆根[J]. 分析科学学报, 2015, 31(5): 663-666.
Huang Donglan, Chen Xiaokang, Xu Yongqun. Identification of radix *Sophorae tonkinensis* and *Rhizoma menispermi* by three-step infrared maro-fingerprint method[J]. Journal of Analytical Science, 2015, 31(5): 663-666.

[6] 马艳, 王长斌, 周凤琴. 蒙药鹅绒藤红外指纹图谱研究[J]. 食品与药品, 2014, 16(4): 254-255.
Ma Yan, Wang Changbin, Zhou Fengqin. Study on FT-IR fingerprints of mongolian medicine *Cynanchum chinense* R. Br.[J]. Food and Drug, 2014, 16(4): 254-255.

[7] 马艳, 周凤琴, 郭庆梅. 药材瓜蒌不同部位的红外光谱分析[J]. 光散射学报, 2011, 23(2): 168-171.
Ma Yan, Zhou Fengqin, Guo Qingmei. Infrared spectroscopic analysis of different parts of crude drug *Fructus trichosanthis*[J]. The Journal of Light Scattering, 2011, 23(2): 168-171.

[8] 黄冬兰, 徐永群, 陈小康, 等. 红外三级鉴定法快速鉴别栽培与半野生黄芪[J]. 光谱实验室, 2010, 27(3): 833-838.
Huang Donglan, Xu Yongqun, Chen Xiaokang. Rapid identification of cultivated ang semi-wilding *Radix astragalus* by three-steps infrared maro-fingerprint method[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2010, 27(3): 833-838.

[9] 程士超, 李丹, 张求慧, 等. 5 种花梨木的红外光谱比较分析[J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(1): 118-124.
Chen Shichao, Li Dan, Zhang Qiuhui. Comparative analysis of five kinds of rosewood by infrared spec-

- tra[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2016, 38(1): 118-124.
- [10] Sun S, Zhou Q, Chen J. Infrared spectroscopy for complex mixtures-applications in food and traditional Chinese medicine[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011.
- [11] 渠磊. 七种茎木类药材红外表征鉴定方法研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
Qu Lei. The seven stem wood gets infrared characterization appraisal method research[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2016.
- [12] 张声俊, 许长华, 陈建波, 等. 全蝎不同部位的红外光谱分析与评价[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(10): 2711-2713.
Zhang Shengjun, Xu Changhua, Chen Jianbo. Analysis of different parts of *Scorpio* by fourier transform infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(10): 2711-2713.
- [13] 彭惜媛. 12 种种子类药材多级红外光谱分析与鉴定[D]. 黑龙江: 佳木斯大学, 2015.
Peng Xiyuan. Analysis and identification of twelve seeds traditional Chinese medicine by multilevel infrared spectra[D]. Heilongjiang: Jiamusi University, 2015.
- [14] 马芳. 红外光谱分析在茯苓资源研究中的应用[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2013.
Ma Fang. The study on application of infrared spectroscopy analysis in the resources investigation of *Poria cocos*[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2013.
- [15] 方智文, 唐延林, 魏晓楠, 等. 野生与栽培天麻的红外三级鉴定[J]. 山地农业生物学报, 2014, 33(6): 79-82.
Fang Zhiwen, Tang Yanlin, Wei Xiaonan. Study on cultivated and wild *Gastrodia elata* by there-step infrared macro-fingerprint method[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2014, 33(6): 79-82.
- [16] 韩明霞, 周群, 李全宏, 等. 不同产地葛根红外光谱的三级鉴定[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(7): 1852.
Han Mingxia, Zhou Qun, Li Quanhong. Identification of three-step IR spectra of *Radix puerariae* from different habitats[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(7): 1852.
- [17] 杨伟俊, 罗玉琴, 再娜布, 等. 毛菊苣与菊苣的红外光谱三级宏观指纹鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 131-135.
Yang Weijun, Luo Yuqin, Zaynap. Study on identification of *Cichorium glandulosum* and *Cichorium intybus* by multi-steps infrared macro-fingerprint method[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(11): 131-135.

The rapid identification of lobster species by three-level IR analysis

CHEN Xin-lu, DI Zhi-biao, LI Gao-yan, SUN Zhi-ying, ZHOU Feng-qin

(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Received: Oct. 19, 2016

Key words: *Panulirus ornatus*; *Panulirus japonicus*; *Panulirus homarus*; *Homarus americanus*; One-dimensional infrared spectra obtained (FTIR); second derivative spectra (SDIR); two-dimensional correlation infrared spectroscopy (2DIR)

Abstract: This study was performed to accurately identify the different species of lobsters using the IR analysis. We used the one-dimensional infrared spectra obtained (FTIR), the second derivative spectra (SDIR), and the two-dimensional correlation infrared spectroscopy (2DIR) to increase the spectral resolution gradually, which cleared the differences between four species of lobsters. The results demonstrated that *Homarus americanus* showed no amide peaks II band on the one-dimensional spectrum, whereas *Panulirus japonicus* showed a peak at $1\ 333\ \text{cm}^{-1}$. On the second derivative spectra, *P. japonicus* showed a more apparent peak at $1\ 333\ \text{cm}^{-1}$ and an obvious peak at $1\ 567\ \text{cm}^{-1}$, which was obviously different from the other three samples; *P. homarus* showed a sharp peak at $1\ 567\ \text{cm}^{-1}$, whereas *P. ornatus* showed no obvious peak at $1\ 567\ \text{cm}^{-1}$, which could distinguish the two species. Further, on the two-dimensional correlation infrared spectra, the four samples showed different types of amino acids and proteins, and the content of amino acids and proteins was also different. We found that the IR analysis method could identify the four species of lobsters rapidly and effectively.

(本文编辑: 谭雪静)