

种子类中药材的三维显微结构的原位研究

叶琳琳^{1,2}, 薛艳玲¹, 倪梁红³, 肖体乔^{1,2*}

(1. 中国科学院 上海应用物理研究所, 上海 201204;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的: 将 X 射线相衬显微 CT 成像方法应用于中药材显微特征结构的无损、原位研究。方法: 利用 X 射线相衬显微 CT 的成像优势, 对中药材白豆蔻和草豆蔻的种子进行三维无损原位显微成像。结果: 无需切片等制备过程, 可清晰获得白豆蔻和草豆蔻的种子内部显微结构及其在不同截面方向上的切片信息。结论: 同步辐射 X 射线同轴相衬显微 CT 方法成像清晰, 可以作为原位无损研究中药材内部高分辨率三维显微结构的新方法。

[关键词] 中药材显微结构; 原位无损成像; X 射线显微 CT; 同步辐射

中药材的显微研究对中药材优良品种的选育、研究中药材生理特性、鉴定中药材品种和质量、提高其质量标准以及对中药资源的保护均可提供研究依据^[1-2]。目前显微结构研究主要有显微测量、透射电镜、扫描电镜与 X 射线能谱分析联用等诸多方式和方法^[3]。利用以上方法进行显微构造研究可以获得高分辨率的二维显微信息, 但是对实验前期样品制备的要求很高, 需要对样品采用石蜡切片^[4]、样品表面导电处理等制备方法, 由于其操作程序复杂、耗时耗材, 因此提高了中药材样品制备的难度, 且只能获得样品的表层信息、部分切片信息或粉末的显微结构信息^[5]。因此如何省去复杂的样品制备流程, 避免化学试剂对中药材内部结构的破坏, 以及达到无损原位三维成像研究中药材显微结构的目的, 是目前中药材显微结构研究发展的新需要。

尤其面对难于进行切片制备、同时其内部显微结构又具有三维分布特点的中药材种子而言, 三维无损原位的显微成像方法是其显微结构研究的理想选择, 它对于区别不同来源的植物种子及伪品的研究都有重要的意义。以中药材白豆蔻和草豆蔻的种子研究为例, 由于在植物分类和药效成分上均表明 2 种中药材的来源不同、所含有的化学成分也有所

区别^[6], 因此药用功效相异, 不可通用或互为代用; 但是姜科果实及种子类中药材的外部形态、气味又非常相近, 所以存在难于辨别、容易混淆使用的情况^[7]。而其药用功效迥异的原因, 主要归结于所含有的挥发油成分不同。如姜科果实及种子类中药材内部普遍具有的分泌和存储挥发油的油细胞结构, 在经过传统样品切片制备的过程中, 需要经历化学试剂透化处理, 这使得油细胞结构受到破坏多不完整, 所观察到的油细胞中含有的挥发油成分也已被化学试剂所改变, 不能够观察到其真实的贮藏和分布情况^[8]。因此在中药材显微结构研究中, 针对这一类容易被化学试剂所破坏的显微构造(如油细胞等含有挥发油成分的显微结构), 三维无损原位显微成像方法的使用可以弥补传统显微研究方法的弊端。

近年来, 将 X 射线相衬成像方法应用于中药材显微结构鉴别方面的研究已初有成效^[9-14]。因此对中药材的无损原位显微结构研究, 可以通过同轴 X 射线相衬 CT (In-line X-ray phase-contrast computed tomography, IXPCT) 方法^[15]的无损成像优势来获得解决。该方法对样品只需进行干燥处理, 无需切片、粉末等制备要求, 且可从多视角对其内部显微结构进行数字切片研究, 成像结果清晰、分辨率高、直观立体。本文利用具有高亮度的同步辐射光源对亟需进行原位无损显微结构鉴别的中药材白豆蔻和草豆蔻的种子进行成像研究, 为中药材原位、无损高分辨三维显微鉴定研究探索一条新途径。

[收稿日期] 2013-12-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(11105213); 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2010CB834301)

[通信作者] * 肖体乔, 研究员, 博士生导师, 主要从事成像光学、同步辐射 X 射线光学成像及其应用研究, Tel: (021) 33933197, E-mail: tqxiao@sinap.ac.cn

1 材料

1.1 样品 本文以姜科 Zingiberaceae 砂仁属 *Amomum* Roxb. 植物白豆蔻 *A. kravanh* Pierre ex Gagnep. 和山姜属 *Alpinia* Roxb. 植物草豆蔻 *A. katsumadai* Hayata 为研究目标。分别选取中药白豆蔻 Fructus Amomi Rotundus 和草豆蔻 Semen Alpiniae Katsumadai 内的干燥成熟种子作为实验研究对象。实验样本由上海中医药大学倪梁红老师采集于夏秋间果实成熟时节并通过原植物鉴定,且凭证标本保存于上海中医药大学标本馆。考虑本科植物多含挥发油,所以样品预处理过程经低温干燥处理,目的确保可以固定其内部各组织结构形态的同时也可以尽量减少其内部挥发油成分的挥发。以形态饱满蒴果中的饱满种粒作为实验样本的选取标准,并将其固定于 IXPCT 成像实验的样品平台上,即可进行实验数据采集。

1.2 仪器 实验于第三代同步辐射装置-上海光源(SSRF) X 射线成像及生物医学应用光束线站(BL13W1)上完成。实验光路系统及相关实验装置仪器示意图见图 1。BL13W1 为采用 Wiggler 插入件的光束线站,采用液氮冷却的两种双平晶单色仪[Si(111), Si(311)],可提供 8~72.5 keV 能段的准平行、高相干性、高通量的单色 X 射线源,光源最大束斑尺寸为 48 mm(H) × 5 mm(V)。搭建 IXPCT 实验平台,其光源点到样品台原点的距离为 34 m,探测器使用精密导轨可调节的前后距离为 8 m。实验样品与光路同轴放置于精密六维运动控制平台进行实验数据采集工作。

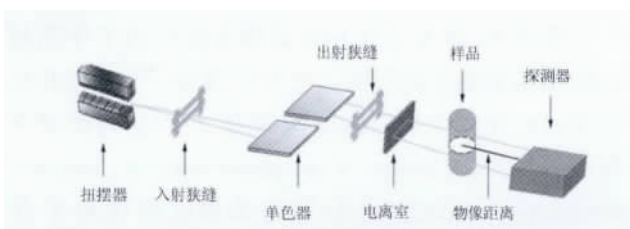


图 1 同步辐射 X 射线相衬显微 CT 实验光路系统示意图
Fig. 1 A schematic diagram for the synchrotron radiation IX-PCT system

2 方法

IXPCT 成像原理主要利用了 X 射线透过弱吸收样品后携带的相位信息重构获得样品内部的结构

信息^[16]。获得的成像数据由吸收信息和相位信息的拉普拉斯变化两部分构成,通过对实验数据采用滤波反投影方法进行切片重构处理后,可获得样品的数字三维结构切片,由于相位信息占主导地位,在成像中可以得到清晰的边缘增强成像^[17]。

本文对白豆蔻和草豆蔻的种子进行 IXPCT 成像研究,实验首先根据样品特点确定最佳的成像能量和物象距离,以及选择适合的曝光时间来优化各项实验参数,以获得最佳成像效果。同时依据实验样品的特征尺寸计算出相应的采集投影图像数,进行数据采集的方式为:使样品在水平方向的 0°~180°上进行旋转,由此可获得一组由不同角度上的投影信息组成的 IXPCT 数据。实验参数如下:物像距离为 14 cm,光子能量为 13 keV,探测器有效像素尺寸为 3.7 μm/像素。

3 结果与分析

实验首先分别获得白豆蔻和草豆蔻种子显微成像的虚拟切片数据,文中数据所示的每一切片厚度均为 3.7 μm。IXPCT 方法可以清晰获得白豆蔻和草豆蔻种子的三维结构成像,见图 2。这表明拥有了中药材的三维数据信息后,可以从任意的视角对其进行显微结构切片研究,或三维立体结构的原位分析。

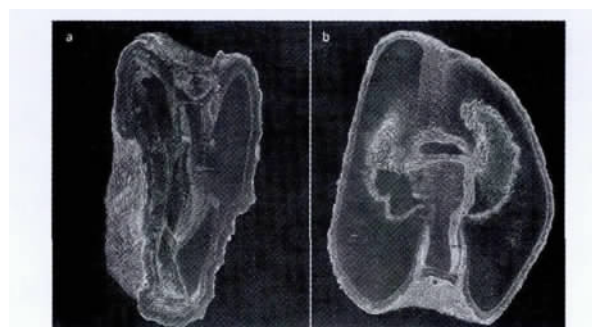
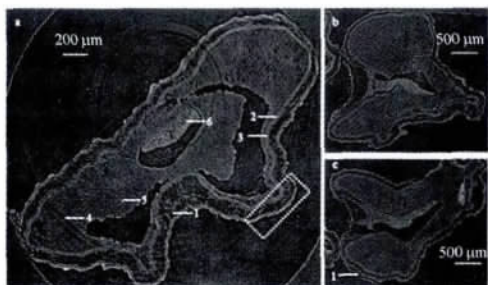


图 2 白豆蔻(a)和草豆蔻(b)种子在 YZ 剖面上的三维成像

Fig. 2 The 3-dimensions sectional view of Fructus Amomi Rotundus seed(a), Semen Alpiniae Katsumadai seed(b) at the YZ direction

3.1 白豆蔻种子显微成像 在 3 个坐标截面方向上获得的白豆蔻种子显微结构切片数据见图 3。白豆蔻的假种皮在取样过程中,大部分已自然剥落,图 3c 中标示 1 位置仍可见部分残留。由于最外层假种皮细胞内含有细小的草酸钙结晶成分,且草酸钙结晶为晶体的特点,含有钙元素,在白豆蔻种子的

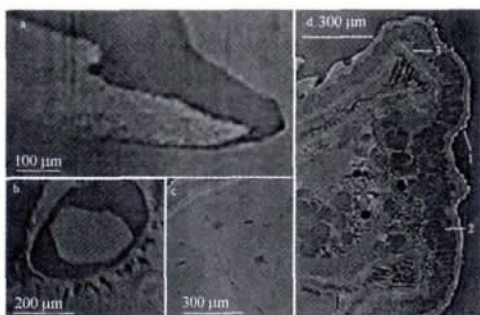
IXPCT 成像中的衬度明显强于白豆蔻种子内其他轻元素组织结构的衬度,所以获得草酸钙结晶明显的高亮点状成像,见图 4(d 标示 1 位置),同时也发现这些高亮的像点所表示的草酸钙结晶并非连续或均匀分布。



a. 白豆蔻种子 XY 截面信息; 1. 油细胞层; 2. 色素层; 3. 内种皮; 4. 外胚乳; 5. 内胚乳; 6. 胚; b. YZ 截面显微切片; c. XZ 截面显微切片(1. 假种皮)。

图 3 白豆蔻种子显微结构切片

Fig. 3 The slices of Fructus Amomi Rotundus's seed



a. 胚及内胚乳细胞 YZ 截面细节; b. 胚细胞 XY 截面形态; c. 外胚乳细胞 XY 截面形态; d. 种脊维管束 XY 截面形态, 1. 细小草酸钙结晶, 2. 油细胞层, 3. 色素细胞。

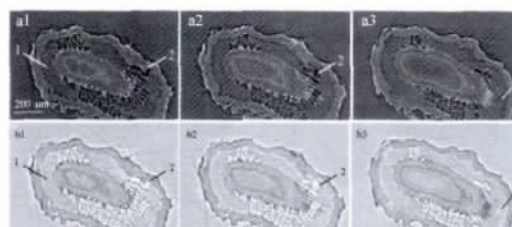
图 4 白豆蔻种子显微结构细节

Fig. 4 The detail slices of Fructus Amomi Rotundus's seed

由图 3 可见内种皮、外胚乳、内胚乳和胚结构及分布情况均可清晰分辨,而且这些不同组织结构中的细胞形态也不相同。胚芽结构和内胚乳细胞的截面成像、胚细胞截面成像以及外胚乳细胞结构的放大细节见图 4。图 4c 中可见外胚乳细胞略长,沿径向方向的形态呈类长方形,细胞宽约为 $50 \mu\text{m}$,长约 $200 \sim 300 \mu\text{m}$,且其外胚乳细胞之间还存在数量相当多的空隙结构;由图 4a 可见胚结构中的细胞之间的排列也并非紧密,也存在较多的空隙结构,其结构形态呈颗粒状且明显与外胚乳细胞的形态不同,虽

然胚芽细胞的尺寸比外胚乳细胞小(约为 $10 \sim 20 \mu\text{m}$)但是密度较低;内胚乳细胞中糊粉粒的形态在本实验 $3.7 \mu\text{m}$ 的成像分辨率下不易分辨,但是可以发现内胚乳细胞之间不存在尺寸和数量如同外胚乳细胞结构之间的空隙结构,因此内胚乳细胞排列更加紧密,由此可知白豆蔻种子内部不同组织的细胞形态及其密度具有可分辨性;而由胚细胞之间、外胚乳细胞之间都明显存在的这些空隙结构可知,在白豆蔻种子内部运输氧气的能力和此空隙结构紧密相关^[18]。如图 3a 标示 1 位置可见厚度较为均匀分布的油细胞层结构;向内紧邻油细胞层的高亮点状结构为白豆蔻种子的色素层(图 3a 标示 2);靠近种脊维管束位置的油细胞层结构和色素细胞放大细节如图 4d 标示 2、3 位置所示。

白豆蔻种子油细胞层及其内部油细胞的结构形态信息,近表皮位置的 3 个 YZ 截面方向上的切片中的油细胞形态结构见图 5,切片位置范围见图 2a 虚线框中。由上下对应的 a、b 2 组相同位置切片组成的数据图像进行对比分析可观察其内部油滴细节信息; b 组图像数据是灰度值经过 a 组图像数据取反优化处理后,可观察到含有少量油滴的油细胞内部细节。如图 5a 所示白豆蔻种子油细胞层内油滴的分布情况非常清晰,单个油细胞的形态多数呈现类方形或长方形、壁薄、径向长度约为 $32 \sim 104 \mu\text{m}$,切向长度约为 $16 \sim 96 \mu\text{m}$,其细胞壁相互紧密排列,如图 5 标示 1 位置可见油细胞内充满油滴,图 5 标示 2 位置可见部分油细胞内部只含有少量的油滴但细胞外壁形态结构完整可以清晰分辨。



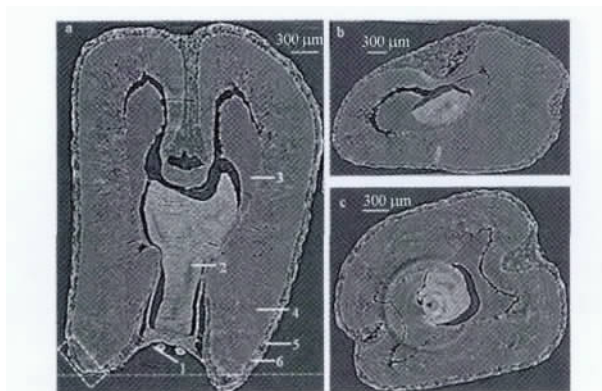
a. 油细胞层切片图像; b. 灰度数值取反的 a 组油细胞层切片; 1. 充满油滴的油细胞; 2. 含有少量油滴的油细胞。

图 5 在 YZ 截面方向的白豆蔻种子油细胞层切片信息

Fig. 5 The slices of oil cell layer of Fructus Amomi Rotundus seed at the YZ direction

3.2 草豆蔻种子显微成像 草豆蔻种子在 3 个截面方向上获得的显微结构切片见图 6。如图 6a 可

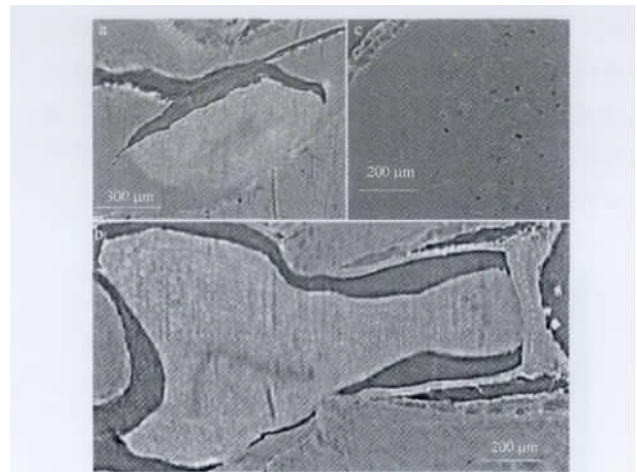
见草豆蔻种子的种脐、外胚乳、内胚乳和胚的结构非常容易分辨。草豆蔻种子外胚乳细胞的颗粒状明显,呈类多边形或近圆形,且其结构明显不同于白豆蔻种子外胚乳细胞的近长方形形态,见图 7。而且草豆蔻外胚乳细胞之间具有的空隙结构是类圆孔形态,明显与白豆蔻外胚乳细胞之间的长条状空隙形态不同。通过对多个实验样本的研究发现,白豆蔻和草豆蔻种子的外胚乳组织中都具有这种空隙结构。而且白豆蔻和草豆蔻种子中所形成的空隙结构的形态不同,分析其形成的根本原因是受到白豆蔻和草豆蔻种子外胚乳细胞具有的不同形态的影响,即白豆蔻种子外胚乳中长条状空隙结构与其外胚乳细胞类长方形的形态和排列有关;而草豆蔻种子外胚乳中的圆孔状空隙结构与其外胚乳细胞近圆形颗粒状的形态和排列有关。所以白豆蔻和草豆蔻种子外胚乳中存在的空隙结构的分布和形态都具有稳定性,因此这种结构也可以作为中药材白豆蔻和草豆蔻种子显微结构鉴别的新的判断依据。在图 7a 中发现草豆蔻种子包裹于胚外部的内胚乳细胞的尺寸依然很小,和白豆蔻种子的内胚乳细胞一样不易分辨;而草豆蔻种子胚细胞组织的灰度值却明显增强,原因在于草豆蔻种子胚细胞组织的密度明显大于其外胚乳和内胚乳结构的密度,而白豆蔻种子胚细胞组织结构的密度却与外胚乳和内胚乳结构的密度相近;如图 7b 可观察到草豆蔻种子胚细胞形态呈卵圆形,胚轴、胚根处细胞尺寸显著减小,数量增多,且排列紧密,而胚芽位置细胞尺寸明显增大,排列疏松且具有微小孔隙。



a. YZ 截面方向显微结构; 1. 种脐; 2. 胚; 3. 内胚乳; 4. 外胚乳; 5. 油细胞层; 6. 色素层; b. XZ 截面方向切片; c. XY 截面方向切片。

图 6 草豆蔻种子内部显微结构信息

Fig. 6 The slices of Semen Alpiniae Katsumadai seed

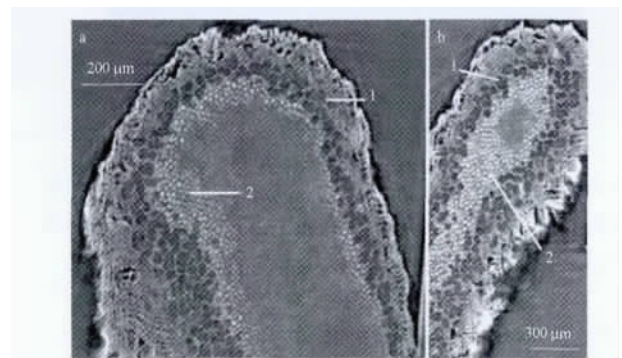


a. 胚细胞于 XZ 截面细节; b. 胚细胞于 YZ 截面信息; c. 外胚乳细胞 XZ 截面信息。

图 7 草豆蔻种子显微结构细节信息

Fig. 7 The detail slices of Semen Alpiniae Katsumadai's seed

草豆蔻种子油细胞和色素细胞结构细节,其油细胞层由两排至多排近圆形的油细胞组成,且明显不同于白豆蔻种子油细胞类方形或长方形的结构形态;草豆蔻种子色素细胞与白豆蔻种子的色素细胞相比,尺寸更大、数量更多,更易观察,见图 8(切片范围见图 6a 虚线框位置)。



1. 油细胞; 2. 色素细胞。

图 8 草豆蔻种子油细胞及色素细胞在 XZ 截面上的形态

Fig. 8 The detail slices of Semen Alpiniae Katsumadai seed at the XZ direction

4 结论

本文利用 X 射线相衬显微 CT 成像方法,对含有挥发油成分的、易被混淆使用的 2 种中药材白豆蔻和草豆蔻的种子,进行原位无损的三维显微特征结构研究。同时对二者内部的显微结构(如胚细胞形态、外胚乳细胞形态,油细胞结构形态,色素细胞

结构及分布等)进行了对比鉴别研究。同时也发现白豆蔻和草豆蔻种子的外胚乳细胞之间的空隙结构形态的差异可以作为 2 种中药材种子进行显微鉴别研究的新判据。本文研究表明,对于含有挥发油成分且显微结构形态具有三维分布特点的中药材而言,使用原位、无损、三维、高分辨特点的成像方法可克服传统成像方法的不足。因此 X 射线相衬显微 CT 成像方法为中药材的显微鉴定研究提供了一种新的手段。而且该方法也可以用于其他疑难中药材的显微鉴定研究。

[参考文献]

- [1] Qiu J. China plans to modernize traditional medicine [J]. Nature 2007 446(7136): 590.
- [2] 康廷国. 中药鉴定学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [3] 黄璐琦. 中药鉴定新技术新方法及其应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [4] 雷忠萍, 贺道华, 曹翠兰. 中药显微鉴定常见的几种制片方法[J]. 安徽农业科学 2011 39(4): 1922.
- [5] 凌云, 闻一渝, 钟国跃, 等. 扫描电镜对果实种子类中药中毛状附属物的观察[J]. 中国中药杂志, 1992, 17(2): 73.
- [6] 曾志, 符林, 叶雪宁, 等. 白豆蔻、红豆蔻、草豆蔻和肉豆蔻挥发油成分的比较[J]. 应用化学 2012 29(11): 1316.
- [7] 漏新芬, 孙红祥. 聚类分析在姜科类药材化学鉴定中的应用[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(9): 520.
- [8] 任仁安. 中药鉴定学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [9] Wei X, Xiao T Q, Liu L X, et al. Application of X-ray phase contrast imaging to microscopic identification of Chinese medicines [J]. Phys Med Biol 2005 50(18): 4277.
- [10] Xue Y L, Xiao T Q, Wu L H, et al. Investigation of characteristic microstructures of wild ginseng by X-ray phase contrast microscopy [J]. Acta Phys Sin-Ched 2010 59(8): 5496.
- [11] 叶琳琳, 薛艳玲, 谭海, 等. X 射线相衬显微层析及其在野山参特征结构的定量三维成像研究 [J]. 光学学报, 2013, 33(12): 365.
- [12] Ye L L, Xue Y L, Ni L H, et al. Application of X-ray phase contrast micro-tomography to the identification of traditional Chinese medicines [J]. J Instrum, 2013, 8(7): C07006.
- [13] Xue Y L, Xiao T Q, Du G H, et al. Microscopic identification of *Panax quinquefolium* and *Panax ginseng* by X-ray phase contrast imaging [J]. Acta Optica Sin 2008 28(9): 1828.
- [14] 龙芳, 李会军, 李萍. 新技术和新方法在中药形状与显微鉴别中的应用 [J]. 中国中药杂志 2012 37(8): 1076.
- [15] Fitzgerald R. Phase-sensitive X-ray imaging [J]. Phys Today, 2000 53(7): 23.
- [16] Wilkins S W, Gureyev T E, Gao D, et al. Phase-contrast imaging using polychromatic hard X-rays [J]. Nature 1996 384(6607): 335.
- [17] Xiao T Q, Bergamaschi A, Dreossi D, et al. Effect of spatial coherence on application of in-line phase contrast imaging to synchrotron radiation mammography [J]. Nucl Instrum Meth A, 2005 548(1/2): 155.
- [18] P Verboven, E Herremans, L Borisjuk, et al. Void space inside the developing seed of *Brassica napus* and the modelling of its function [J]. New Phytol 2013 199(4): 936.

In situ investigation to three dimensional structures of Chinese medicines seeds

YE Lin-lin^{1,2}, XUE Yan-ling¹, NI Liang-hong³, XIAO Ti-qiao^{1,2*}

(1. Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201204, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] This paper is aimed to microscopic identification of traditional Chinese medicines (TCMs) using an *in situ* imaging method. In this study, two kinds of Zingiberaceae seeds, *Amomi Rotundus Fructus* and *Alpiniae Katsumadai Semen*, were investigated by synchrotron radiation in-line X-ray phase-contrast computed tomography (IXPCT) imaging method. The results showed that the microstructures of these Zingiberaceae seeds could be clearly obtained from the virtual slices information in different observing angles. It proves that IXPCT is an effective imaging method, which can provide the imaging information for the microscopic identification of the intact TCMs *in situ* and non-destructively.

[Key words] Chinese medicines microstructures; *in situ* and non-destructively imaging; X-ray microscopic computed tomography; synchrotron radiation

doi: 10.4268/cjcm20141406

[责任编辑 吕冬梅]

• 2623 •