

# 激光拉曼光谱法无损鉴别三七及其伪品

董晶晶<sup>1,2</sup> 陈娟<sup>1</sup> 戈延茹<sup>1</sup> 戚雪勇<sup>1</sup>

<sup>1</sup>江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013

<sup>2</sup>江苏省徐州市药品检验所, 江苏 徐州 221000

**摘要** 应用激光拉曼光谱技术准确无损鉴别三七及其伪品菊三七、藤三七和姜黄。采集了三七及其伪品的拉曼光谱图,并结合二阶导数拉曼图谱对其进行定性鉴别。四种药材的图谱中均出现了1330、1040、943、310  $\text{cm}^{-1}$ 糖类碳水化合物的拉曼特征峰。三七的图谱中出现了1080  $\text{cm}^{-1}$ 和1120  $\text{cm}^{-1}$ 皂苷类化合物的拉曼振动峰;菊三七的图谱中出现了820、899、1144、2935  $\text{cm}^{-1}$   $\beta$ -谷甾醇、吡咯里西啶类生物碱及长链脂肪烃的拉曼特征峰;藤三七的图谱中出现了1462  $\text{cm}^{-1}$ 和1695  $\text{cm}^{-1}$ 的腺苷类和尿嘧啶类化合物的拉曼振动峰;姜黄的图谱中出现了962、1187、1433、1596、1630  $\text{cm}^{-1}$ 等姜黄素类化合物的拉曼振动峰。以上专属特征峰的差异可将三七及其伪品进行很好的区分,并据谱图信息可建立四味中药的拉曼指纹图谱。二阶导数拉曼光谱图可以对三七及其伪品的鉴别结果进行进一步补充验证说明。此方法可准确直接、快速鉴别三七及其伪品。

**关键词** 光谱学;激光拉曼;二阶导数光谱;三七;无损鉴别

中图分类号 R282.5 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP51.053002

## Nondestructive Identification of Panax Notoginseng and Its Analogues via Laser Raman Spectroscopy

Dong Jingjing<sup>1,2</sup> Chen Juan<sup>1</sup> Ge Yanru<sup>1</sup> Qi Xueyong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

<sup>2</sup>Institute for Drug Control of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

**Abstract** Panax Notoginseng and its analogues such as Gynura Segetum, Boussingaultia Gracilis and Curcuma Longa are identified via Raman spectra technique. The characteristic Raman spectra of Panax Notoginseng and its analogues are acquired, then they are identified by laser Raman spectroscopy and second derivative Raman spectroscopy. The structural information indicates that Panax Notoginseng and its analogues contain some carbohydrate substrates, due to some characteristic vibration peaks of carbohydrate moiety, because 1330, 1040, 943 and 310  $\text{cm}^{-1}$  characteristic absorption peaks can be observed. The characteristic vibration peaks at 1080  $\text{cm}^{-1}$  and 1120  $\text{cm}^{-1}$  indicate the existence of saponin compounds. Chrysanthemum Notoginseng shows characteristic vibration peaks at 820, 899, 1144 and 2935  $\text{cm}^{-1}$  because of the presence of  $\beta$ -sitosteroland, pyrrolizidine alkaloids compounds and long chain aliphatic compounds. The characteristic vibration peaks at 1462  $\text{cm}^{-1}$  and 1695  $\text{cm}^{-1}$  appear in Rattan Notoginseng spectroscopy, because of the existencence of adenosine compounds and uracil compounds. The characteristics vibration peaks of Rhizoma Curcumae Longae, such as 962, 1187, 1433, 1596 and 1630  $\text{cm}^{-1}$  can also be observed due to some curcumin compounds. The difference of absorption peaks between Panax Notoginseng and its analogues can be used to distinguish them. Finger spectroscopy of Panax Notoginseng and its analogues can be further established, the identification results can be further verified via second derivative Raman spectroscopy. The above method can be easily used to provide a more accurate, direct and fast identification of Panax Notoginseng and its analogues.

**Key words** spectroscopy; laser Raman; second derivative spectroscopy; Panax Notoginseng; nondestructive

收稿日期: 2013-12-25; 收到修改稿日期: 2014-01-08; 网络出版日期: 2014-03-21

基金项目: 江苏大学高级人才引进专项(05JDG014)

作者简介: 董晶晶(1981—),女,硕士研究生,主要从事中药质量控制方面的研究。E-mail: jing01132@126.com

导师简介: 戚雪勇(1969—),男,博士,副教授,主要从事化学药品和中药及其制剂质量控制方面的研究。

E-mail: qixyemail@163.com(通信联系人)

identification

OCIS codes 300.6450; 140.3550; 170.5660; 290.5870

## 1 引言

三七系五加科人参属植物三七的干燥根和根茎<sup>[1]</sup>,又名参田七、田七人参、金不换,主要分布在云南、广西,具有散瘀止血、消肿定痛的功效,被誉为“国药明珠”。目前,测定结果表明三七中含有皂苷类、糖类和氨基酸类等化学成分,其中皂苷类为主要成分<sup>[2]</sup>,具有活血补血、降压降脂、抗炎保肝、提高免疫力及抗肿瘤活性等多种生物功能<sup>[3]</sup>。由于三七价格昂贵,因此市场上常有伪品出现,性状与正品极为相似。采取快速有效、简便准确的方法对三七进行鉴别在中药质量控制中具有重要意义。

目前形貌特征<sup>[4]</sup>、显微分析<sup>[5]</sup>、高效毛细管电泳<sup>[6]</sup>、基因指纹<sup>[7]</sup>、高效液相<sup>[8]</sup>及理化、薄层鉴别<sup>[9]</sup>、近红外光谱<sup>[10]</sup>等分析方法均被用于三七及其伪品的鉴别。拉曼光谱是一种通过与入射光频率不同的散射光谱进行分析以得到分子振动、转动方面信息的散射光谱,应用于分析物质内部分子结构信息。作为一种新兴的光谱技术,拉曼光谱在实现样品客观直接、无损快速测定的同时,谱图信息更加精细准确。鉴于上述特点,拉曼光谱被广泛应用于化学、物理学、生物学等各个领域,在纯定性分析和测定分子结构等方面都有很大价值<sup>[11-13]</sup>。

近年来,拉曼光谱法尝试在中药的定性和定量分析中应用,并获得了一定的成果<sup>[14-17]</sup>,但尚未见拉曼光谱用于三七及其伪品的鉴别研究。本实验利用激光拉曼光谱并结合二阶导数技术对三七及其伪品菊三七、藤三七和姜黄进行鉴别分析,建立了一种新型、快速、无损鉴别三七真伪的方法。

## 2 实验部分

### 2.1 样品

三七中药材,产于云南。采用藤三七、菊三七和姜黄作为三七拟伪品。藤三七为落葵科植物落葵薯藤三七的珠芽,产于云南。菊三七为菊科菊三七属植物菊三七的根茎,产于四川。姜黄为姜科姜黄属植物姜黄的干燥根茎,产于广西。上述药材均购自同仁堂药店,经江苏大学药学院傅海珍老师鉴定均为正品。

### 2.2 仪器和测试条件

拉曼光谱仪器为美国热电公司 Thermo Fisher DXE 0640 共聚焦显微拉曼光谱仪,50倍镜头,光谱测量范围在  $0 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ , CCD 检测器光谱分辨率为  $1 \text{ cm}^{-1}$ ,积分时间为 20 s。采用 780 nm 半导体激光作为激发光源,激光功率为 10 mW,曝光 10 次。

### 2.3 方法

将药材分别清洁后切出新鲜平坦切片置于载玻片上,使其位于激光显微拉曼光谱仪载物台的物镜视野下,通过微机屏幕上的影像窗口调整焦距,测定,得到光谱。

### 2.4 数据处理

采用 OriginLab 公司出品的 Origin9.0 软件获得二阶导数谱,使用 FFT-Filter 平滑处理方式,平滑点数为 5。

## 3 结果与讨论

拉曼光谱为光与物质分子非弹性碰撞后与入射光之间发生的能量转换而产生的散射光谱,拉曼位移的程度对应于分子振动能级的跃迁,可以有效反映被测物质分子的内部结构信息。分子结构分析中电荷分布中心对称的化学键,如 C-C、N=N、S-S 键等,它们的红外吸收很弱,而拉曼散射却很强,一些使用红外光谱无法检测的信息通过拉曼光谱能很好地表现出来。因此拉曼光谱可以显示出被测单一或混合体系的结构特征,在物质的分析中起着十分重要的作用。并且激光拉曼光谱法的另一个特点是:被测定样品可以直接测定,不需要复杂的前期处理,测定后样品完好无损,保证了样品信息的完整性且测定方法快速简便。

拉曼光谱对中药鉴别和质量控制的测定应用还处在初级阶段,理论上只要药材的品种不同,药材中所含化学成分和相对比例就会不同,其拉曼光谱的特征峰的强度和位置就会有差异。伪品菊三七、藤三七和姜黄,与三七外观相似,常被混淆作为三七。但每种药材都有其特有的化学成分和药理作用<sup>[18-21]</sup>,在谱图中表现为均有其专属的特征峰,根据这些特征振动峰的差异,可将这四种药材很好地鉴别,从而达到区分的目的。

### 3.1 三七药材及其伪品的拉曼光谱分析

所有结果均是在峰值的最大阈值为 50 counts/s 的情况下判断。从图 1 中可以看出,三七及其伪品在 1330、1040、943、310  $\text{cm}^{-1}$  附近均有拉曼振动峰,说明这四种药材皆含有糖类碳水化合物<sup>[21]</sup>。

由于四种中药材的组成、含量等不同,吸收峰的位置、形状和强度之间存在显著的差异性,从而构成了其专属的拉曼特征峰。这些特征峰归属如下<sup>[23]</sup>:三七在 1080  $\text{cm}^{-1}$  出现人参皂苷分子结构中六元碳环的 C-C 振动峰,925  $\text{cm}^{-1}$  和 1120  $\text{cm}^{-1}$  附近出现人参皂苷分子结构中 C-O-C 醚键振动峰;藤三七在 1462  $\text{cm}^{-1}$  和 1491  $\text{cm}^{-1}$  为腺苷化合物特征频率峰,1035  $\text{cm}^{-1}$  和 1236  $\text{cm}^{-1}$  为尿嘧啶特征频率峰,1695  $\text{cm}^{-1}$  为尿嘧啶嘧啶环的 C=O 伸缩振动峰;菊三七在 899  $\text{cm}^{-1}$  和 1144  $\text{cm}^{-1}$  出现吡咯里西啶类生物碱中吡咯环的“呼吸”振动的拉曼谱峰,在 820  $\text{cm}^{-1}$  附近出现  $\beta$ -谷甾醇的 C<sub>3</sub>-O 骨架振动的强拉曼谱峰,在 356、874、980、1454、1258、2935  $\text{cm}^{-1}$  出现长链脂肪烃的拉曼振动谱峰;姜黄在 1250、1187、1152  $\text{cm}^{-1}$  等处出现姜黄素类化合物的拉曼特征峰。这些拉曼振动峰峰形尖锐,可以明显区别三七、藤三七、菊三七和姜黄四种中药材。

另外,四种中药图谱在 1630  $\text{cm}^{-1}$  和 1596  $\text{cm}^{-1}$  附近皆出现苯衍生物苯环伸缩双峰<sup>[23]</sup>,说明此四种药材中皆含有苯衍生物,例如黄酮类化合物。但是姜黄图谱中此双峰为强峰,其他三种中药的强度相对较弱。

由以上分析,可以把三七及其伪品区分开来,并对四种中药材的有效化学成分有一定的认识。

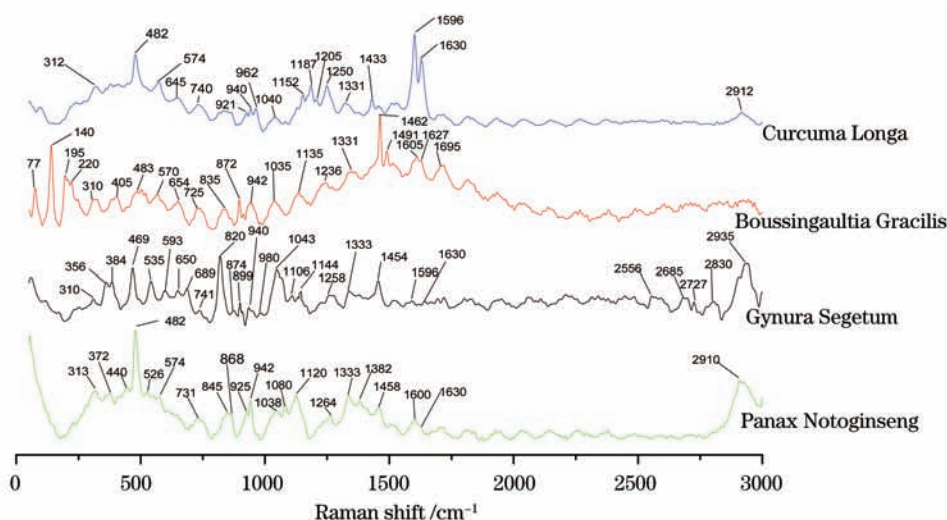


图 1 三七及其伪品的拉曼光谱

Fig.1 Raman spectra of Panax Notoginseng and its counterfeit

### 3.2 三七及其伪品的二阶导数谱的分析

二阶导数拉曼光谱体现原始拉曼图谱曲线的凹凸率,放大许多被掩盖的谱峰的变化特征,能有效提高谱图的表现分辨率,扩大谱峰间的差异。通过三七及其伪品的二阶导数拉曼光谱(图 2)发现,在 1630、1596、943、310  $\text{cm}^{-1}$  处的相似特征峰在二阶导数谱中仍然存在,在提高分辨率的同时也出现了一定的偏移。二阶导数谱可使相似峰的出峰位置更加准确直观。

同时,一些特征吸收峰的峰强增大,但出峰位置几乎没有改变。例如<sup>[22]</sup>:三七在 1080  $\text{cm}^{-1}$  和 1120  $\text{cm}^{-1}$  附近的特征吸收峰,菊三七的 356、820、874、899、980、1144 和 1454  $\text{cm}^{-1}$  处的特征吸收峰,藤三七的 77、140、195、725、1462 和 1491  $\text{cm}^{-1}$  处的特征吸收峰,姜黄的 1630、1596、1250、1187、1152  $\text{cm}^{-1}$  处的特征吸收峰。由此可见,此类强拉曼特征峰,出峰位置稳定,在鉴别过程中可以作为各种中药材的专属拉曼特征峰。

另外,伴随着分辨率的提高,二阶导数谱图相比原图谱明显精细,出现许多原图谱未出现的吸收峰,使得各味中药材的谱图信息更加丰富完善。如:三七的图谱中出现了 802  $\text{cm}^{-1}$  人参皂苷分子结构中六元碳环的“呼吸”振动峰;菊三七的图谱中在 2850~3000  $\text{cm}^{-1}$  区段内出现了 2852、2900、2952、2974  $\text{cm}^{-1}$  长链脂肪烃的特征吸收峰;藤三七的图谱中出现了 1400  $\text{cm}^{-1}$  尿嘧啶的特征频率峰;姜黄中出现了 445  $\text{cm}^{-1}$  黄酮类分子结构中 C-O-C 对称变形拉曼振动峰<sup>[23]</sup>。并且在 1273  $\text{cm}^{-1}$  附近三种伪品药材均出现特征峰,但三七在 1262  $\text{cm}^{-1}$  处出现特征峰,有 11  $\text{cm}^{-1}$  的偏移。利用这些特征峰也可以获得更多的谱图信息,从而能够更好地区分三七及其伪品。

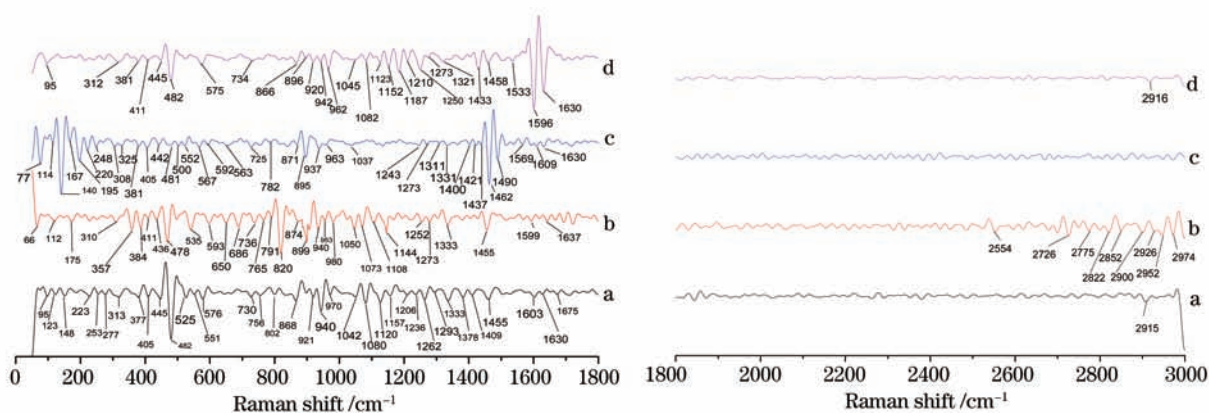


图2 三七及其伪品的二阶导数拉曼光谱。a 三七; b 菊三七; c 藤三七; d 姜黄

Fig.2 Second derivative Raman spectra of Panax Notoginseng and its counterfeit. a Panax Notoginseng; b Gynura Segetum; c Boussingaultia Gracilis; d Curcuma Longa

## 4 结 论

中药材成分复杂,但其特征光谱是所含各成分光谱的叠加结果。由于各种中药材所含成分不同、各成分含量的比例不同,致使其拉曼光谱也有所差异,利用这种差异可以将药品成功区分。拉曼光谱拥有丰富的“指纹”信息,谱图中的专属振动峰与其所含专属有效化学成分一一对应,不仅可以鉴别这四种中药材,还可以得到各味药材最原始的内部物质结构信息。

本文求导数图谱的目的是佐证原始图谱特征峰,使原始图谱特征峰峰形更加明显尖锐并且放大被掩盖的谱峰信息。一阶导数拉曼光谱反映的是原始拉曼图谱曲线斜率的大小,与原始图谱相比,其出峰位置都发生了较大的偏移。其图谱说明的只是曲线切线的斜率值大小,不能说明原始图谱的曲线凹凸变化情况。二阶导数拉曼光谱反映的是原始图谱曲线的凹凸率,理论上其出峰的位置与原始图谱一致,但是可以放大许多被掩盖的谱峰的变化特征,有效地提高谱图的表现分辨率,扩大谱峰间的差异,所以应采用二阶导数图谱进行佐证分析。

总之,运用拉曼光谱技术结合二阶导数拉曼光谱可以鉴别三七及其伪品,该方法直接客观、简便无损、准确精细,为拉曼光谱技术在中药分析和中药质量控制中的应用提供借鉴。

### 参考文献:

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China—Volume I[S], 2010, 34. 国家药典委员会. 中华人民共和国药典第1部[S], 2010, 34.
- 2 Bao Jiancai, Liu Gang, Cong Dengli, *et al.*. Research progress on chemical compositions of Panax Notoginseng [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2006, 28(2): 246–253. 鲍建才, 刘刚, 丛登立, 等. 三七的化学成分研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2): 246–253.
- 3 Feng Lubing, Pan Xifen, Sun Zeling. Research progress on pharmacological effects of Panax Notoginseng [J]. China Pharmacist, 2008, 11(10): 1185–1187. 冯陆冰, 潘西芬, 孙泽玲. 三七的药理作用研究进展[J]. 中国药师, 2008, 11(10): 1185–1187.
- 4 Zheng Qi. Character identification of Panax Notoginseng and its adulterants [J]. Zhejiang JITCWM, 2012, 22(9): 742–743. 郑琦. 三七及其伪品的性状鉴别[J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(9): 742–743.
- 5 Wang Qunhong. Identification of Panax Notoginseng and its adulterants [J]. China Pharmaceuticals, 2004, 13(5): 62. 汪群红. 三七及其伪品的鉴别[J]. 传统中药, 2004, 13(5): 62.
- 6 Hou Lianbing, Chen Zhende, Chen Zhiliang, *et al.*. Identification of Proteins from Panax pseudo-ginseng var-notoginseng and its confusable varieties by HPCE [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000, 31(1): 859–860. 侯连兵, 陈振德, 陈志良, 等. 三七及其混淆品蛋白高效毛细管电泳法鉴别[J]. 中草药, 2000, 31(1): 859–860.
- 7 Cao Hui, Liu Pingping, Fujian Yuli, *et al.*. Identification of Panax Notoginseng and its adulterants using DNA sequencing [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2001, 24(6): 395–402.

- 曹 晖, 刘平萍, 伏见裕利, 等. 三七及其伪品的DNA测序鉴别[J]. 中药材, 2001, 24(6): 395-402.
- 8 Cui Xiuming, Dong Tingxia, Chen Zhongjian, *et al.*. Identification on Panax Notoginseng and its adulterants by HPLC fingerprint chromatogram [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(10): 941-943.
- 崔秀明, 董婷霞, 陈中坚, 等. 三七及其混淆品的HPLC指纹图谱鉴定[J]. 中草药, 2002, 33(10): 941-943.
- 9 He Hua, Jiao Kai, Zhang Yuchun. Identification on Panax Notoginseng and its adulterants [J]. Journal of Lanzhou University·Medical Science, 2005, 31(3): 67-69.
- 何 华, 焦 凯, 张玉春. 三七及常见伪品鉴别[J]. 兰州大学学报(医学版), 2005, 31(3): 67-69.
- 10 Guo Ping, Yuan Yali, Xiong Ping. Differential identification of genuine and spurious Panax Notoginseng by near infrared spectra [J]. China Pharmacy, 2009, 20(30): 2367-2369.
- 郭 萍, 袁亚莉, 熊 平. 三七及其伪品的近红外光谱鉴别法[J]. 中国药房, 2009, 20(30): 2367-2369.
- 11 Ye Yuhuang, Chen Yang, Li Yongzeng, *et al.*. Discrimination of nasopharyngeal carcinoma and normal nasopharyngeal cell lines based on confocal Raman microspectroscopy [J]. Chinese J Lasers, 2012, 39(5): 0504003.
- 叶宇煌, 陈 阳, 李永增, 等. 基于拉曼光谱的鼻咽癌与正常鼻咽细胞株的分类研究[J]. 中国激光, 2012, 39(5): 0504003.
- 12 Liu Shupeng, Zhu Hongfei, Chen Na, *et al.*. Surface enhanced Raman scattering spectrum analysis of nude mouse serum with Au nanoparticles active substrate [J]. Chinese J Lasers, 2012, 39(5): 0504004.
- 刘书朋, 朱鸿飞, 陈 娜, 等. 金颗粒为活性基底的裸鼠血清表面增强拉曼散射光谱分析[J]. 中国激光, 2012, 39(5): 0504004.
- 13 Qin Zhaojun, Lai Junzhuo, Liu Bin, *et al.*. Raman spectroscopic analysis of ethanol fermentation at various initial pH levels [J]. Chinese J Lasers, 2013, 40(2): 0215001.
- 覃赵军, 赖钧灼, 刘 斌, 等. 不同初始pH值的乙醇发酵过程拉曼光谱分析[J]. 中国激光, 2013, 40(2): 0215001.
- 14 Li Ning, Zhuang Zhengfei, Guo Zhouyi, *et al.*. Raman spectroscopy technology and the application in Chinese medicine identification [J]. Chinese J Medical Physics, 2012, 29(1): 3173-3176.
- 李 宁, 庄正飞, 郭周义, 等. 拉曼光谱技术及其在中医药鉴定中的应用[J]. 中国医学物理学杂志, 2012, 29(1): 3173-3176.
- 15 K S Leung, K Chan, A Bensoussan, *et al.*. Application of atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry in the identification and differentiation of Panax species [J]. Phytochemical analysis, 2007, 18(2): 146-150.
- 16 T Pan, A Hashimoto, M Kanou, *et al.*. Development of a quantification system of ionic dissociative metabolites using an FT-IR/ATR method [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2003, 26(2): 133-139.
- 17 Wang Wei, Xi Xinxin, Yang Hao, *et al.*. Raman spectroscopy in determination of forsythine content [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2011, 32(1): 62-65.
- 王 玮, 席欣欣, 杨 浩, 等. 拉曼光谱法测定连翘苷含量的探讨[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(1): 62-65.
- 18 Xueyong Qi, Bin Wu, Yiyu Cheng, *et al.*. Simultaneous characterization of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in *Gynura segetum* by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, 23: 291-302.
- 19 Lay-Jing Seowa, Hooi-Kheng Beha, Amin Malik Shah Abdul Majida, *et al.*. Antiangiogenic activity of *Gynura segetum* leaf extracts and its fractions [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 134(2): 221-227.
- 20 Wu Ping, Yan Jianye, Huang Dan, *et al.*. Current progress in *Boussingaultia gracilis* research [J]. Science and Technology Review, 2012, 30(16): 76-79.
- 吴 萍, 严建业, 黄 丹, 等. 藤三七的现代研究进展[J]. 科技导报, 2012, 30(16): 76-79.
- 21 Cuong Mai Nguyen, Jin-Seog Kim, Thanh Ngoc Nguyen, *et al.*. Production of L- and D-lactic acid from waste *Curcuma longa* biomass through simultaneous saccharification and cofermentation [J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 35-43.
- 22 Xu Yiming. Raman Spectroscopy in Application of Structure Biology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 3.
- 许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.3.
- 23 F R Dollish, W G Fateley, F F Bentley. Characterist Raman Frequency of Organic Compounds [M]. Beijing: Chinese Chemistry Society, 1980.8.
- F R 多林希, W G 佛特利, F F 本特利. 有机化合物的特征拉曼频率 [M]. 中国化学会, 1980.8.