

· 论 著 ·

TLC-SERS 联用法检测降糖中成药中添加的格列类药品

秦剑红(解放军169医院药械科,湖南衡阳421001)

[摘要] 目的 研究降糖中成药中非法添加格列类药品的表面增强拉曼光谱(surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)检测方法。方法 利用薄层色谱法将待检成分与中药基质进行简单分离,采用表面增强拉曼光谱技术对薄层板上的微量物质进行检测。通过摸索模拟阳性样品中格列类药品的 SERS 检测条件,建立可用于降糖中成药中非法添加物的检测方法。结果 采用有机溶剂 DMF 制备所得的银溶胶可以获得较好的格列类药物 SERS 图谱。结论 该研究所建立的 TLC 与 SERS 联用方法检测简便、快速、经济,可用于降糖中成药中非法添加格列类药品的快速检测。

[关键词] 表面增强拉曼光谱;中药制剂;非法添加;格列类药物

[中图分类号] R927.1, R977 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)03-0206-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.03.011

Detection of glinides adulterated in traditional Chinese medicine for diabetes by TLC-SERS

QIN Jianhong(Department of Pharmacy, No. 169 Hospital of PLA, Hengyang 421001, China)

[Abstract] **Objective** To establish detection method of glinides adulterated illegally in hypoglycemic traditional Chinese medicine (TCM) by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). **Methods** Adulterated chemicals and TCM matrixes were separated by TLC first. Then trace substances in TLC plate was tested by SERS method. By investigating SERS detection conditions of glinides chemicals in simulated positive samples, a detection method was established to detect illegal adulterant in hypoglycemic TCM. **Results** Better SERS spectra of glinides could be obtained by silver sol prepared with organic solvent DMF. **Conclusion** The detection method coupled with TLC and SERS in this paper was simple, fast and economical which could be used to detect glinides adulterated illegally in hypoglycemic Chinese patent medicine quickly.

[Key words] surface enhanced Raman spectroscopy; traditional Chinese medicine; adulteration; glinides

一直以来,中药制剂掺假现象屡禁不止,其种类繁多,作用机制不明,且相应的检测质量标准尚不完善,使得不法分子有机可乘。对于中药掺杂化学成分的检测,常用方法有薄层色谱法(TLC)^[1,2]、高效液相色谱法(HPLC)^[3,4]、液质联用法(LC-MS)^[5,6]等。传统的 TLC 法操作简单,但存在较高的假阳性;HPLC、LC-MS 法灵敏度高且准确性好,但其样品前处理过程复杂,且需要特定规格的试剂和色谱柱,检测成本较高,不易于基层推广。随着便携式拉曼光谱仪的普及,表面增强拉曼光谱技术逐渐在分析检测领域得到较多应用^[7,8]。表面增强拉曼散射光谱(surface enhanced Raman scattering, SERS)能够提供分子能级的指纹图谱,且信号强度高,通常为常规拉曼光谱的 $10^4 \sim 10^6$ 倍。将其与 TLC 方法相结合,先对复杂样品进行初步分离,然后采用 SERS 技术检测,获得待测物的特征指纹图谱,从而进行更准确

的定性判别。目前,SERS 技术已用于水污染的现场监控^[9]、中药成分非法添加西药成分的检测^[10]、生物尿样中可卡因代谢产物的定量分析^[11]、中草药中结构相似生物碱成分的鉴别^[12]等。

本研究采用 TLC 与 SERS 联用方法对降糖中成药中添加的格列类药物(格列喹酮、格列本脲、格列美脲、格列吡嗪、格列齐特)进行检测,首次采用有机相银溶胶获得了 5 种格列类化学降糖药的 SERS 图谱,可用于中药中非法添加该类化学药成分的快速检测。

1 材料与仪器

1.1 材料 格列齐特(批号:100296-201004)、格列本脲(批号:100135-200404)、格列美脲(批号:100674-201102)、格列吡嗪(批号:100281-200602)、格列喹酮(批号:100280-201002)对照品均购自中国药品生物制品检定所;硝酸银、柠檬酸三钠、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP-K30)等试剂均为分析

纯,购自国药集团化学试剂有限公司;薄层板 HSGF₂₅₄ (烟台江友硅胶开发有限公司);实验用水为二次蒸馏水;实验中所用的降糖中药阴性样品(不含非法添加成分)由山东省食品药品检验所提供。

1.2 仪器 BWS415-785H 型便携式拉曼光谱仪(必达泰克),配有 BAC151 视频显微拉曼检测系统,激发光源 785 nm,分辨率 $3.5\text{ cm}^{-1}@912\text{ nm}$,光谱范围 $175\sim 2\,700\text{ cm}^{-1}$;TG16-WS 型高速离心机(上海卢湘仪);KQ-250DB 型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);WFH-203B 型紫外分析仪(精科实业);普析通用 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计。

2 方法

2.1 银胶溶液的配制 将 10 ml AgNO_3 与 PVP(摩尔比 10:1)的混合溶液加入 100 ml 沸腾的 DMF 中,其中 AgNO_3 $1\times 10^{-3}\text{ mol/L}$,继续加热 1 min,见溶液由无色变为黄绿色,最终变为黄棕色的银胶溶液,冷却备用。

2.2 样品溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 称取格列本脲、格列齐特、格列美脲、格列喹酮、格列吡嗪对照品适量,加甲醇-氯仿(1:1)溶解,分别制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液备用。

2.2.2 模拟阳性样品溶液 取降糖类中药阴性样品(不含非法添加成分)适量,研细,另精密称取适量降糖药对照品加入其中,使各个成分添加量均为 1% (W/W),加甲醇-氯仿(1:1)溶解,超声 10 min,离心后取上清液,作为降糖药的模拟阳性样品溶液。

2.2.3 真实样品溶液 取降糖类中成药样品各 1.5 mg,研细,加甲醇 1 ml 溶解,超声 15 min,以 10 000 r/min 离心 5 min 后取上清液,作为真实样品溶液备用。

2.3 检测方法 吸取对照品溶液和模拟阳性样品溶液各 1 μl ,点于同一硅胶板上,以环己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(9:5:1)展开后取出,晾干,置于紫外灯(254 nm)下检视定位,于阳性样品色谱条带中与对照品 R_f 值相同位置处,滴加纳米银溶胶 5 μl ,对滴加银胶的位置进行检测,放大 20 倍,积分时间 20 s,激光功率 100 mW,将所得图谱与对照品的 SERS 谱进行对比分析,得出结果。

2.4 数据预处理方法 采用软件 Matlab 7.6 对所得光谱进行谱段选取($300\sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$)、Savitzky-Golay (Sgolay) 法平滑、adaptive iteratively reweighted Penalized Least Squares (airPLS) 法基线校正和归一化等预处理;制图软件使用 Origin 7.5。

3 结果与讨论

3.1 薄层色谱条件的优选 参照国家药品标准^[13]和相关文献方法^[2,14],对薄层色谱展开条件进行比较。实验中考察了(a)氯仿-环己烷-乙醇-冰醋酸(8:13:1:1);(b)环己烷-乙酸乙酯-甲醇-冰醋酸(14:6:1:0.1);(c)环己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(5:5:1)的展开情况。结果(a)、(b)体系下,分离效果均不理想,选择较简单的(c)体系进行调节,三者比例为 9:5:1 时效果较佳,格列喹酮、格列齐特、格列美脲、格列本脲、格列吡嗪的 R_f 值分别为 0.72、0.66、0.56、0.47、0.35。

3.2 不同银溶胶的检测结果

3.2.1 银溶胶的选择与制备 采用传统的柠檬酸钠还原法制备所得银溶胶^[15,16]进行实验时,增强效果均较差,几乎无增强信号;尝试使用氯化钠、硝酸钾等凝聚剂,并换用不同浓度的银溶胶,效果仍不理想。可能由于检测物均为水不溶性,难以与水溶性的纳米银粒子结合形成 SERS“热点”,故无法产生较好的增强效应。因此,对于这种疏水性物质,考虑采用有机溶剂制备的有机相的银溶胶进行检测。在制备有机相纳米银溶胶时,参照文献[17]、[18],尝试采用甲醇、乙腈、聚乙二醇、N,N-二甲基甲酰胺、四氢呋喃等溶剂制备纳米银溶胶,最终选择以 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)作为溶剂制备纳米银颗粒。DMF 在整个反应过程中作为溶剂与还原剂,此外,为防止纳米银粒子的团聚,可在制备过程中加入 PVP 作为保护剂,达到延缓银离子还原的效果。

3.2.2 银溶胶的紫外表征 采用 DMF 作为还原剂,以 PVP 作为保护剂制备所得纳米银溶胶的紫外吸收光谱如图 1。其最大吸收位置只有一个,说明所制纳米银溶胶为球型,且其最大吸收峰位于 408 nm,根据文献[15]推测,此处制得的纳米银直径在 50 nm 左右,且半峰宽较窄,说明纳米颗粒分布较均匀。

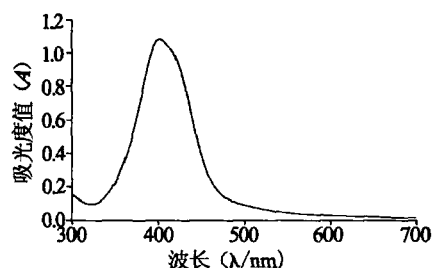


图 1 银溶胶的紫外表征图谱

3.3 模拟阳性样品检测 将实验室自行制备的模

拟降糖中药阳性样品按照“1.4项”下的方法进行检测,得到结果如图2所示。以格列喹酮为例,其SERS谱中出现的特征峰476, 499, 527, 610, 634, 663, 679, 743, 783, 808, 821, 834, 1004, 1029, 1090, 1125, 1164, 1188, 1205, 1275, 1349, 1442, 1600, 1615 cm^{-1} (409, 865 cm^{-1} 除外),均可对应于其固体样品的拉曼光谱中的特征信号(图3),其中409, 865 cm^{-1} 处特征信号来自于银胶溶剂 DMF (图4)。

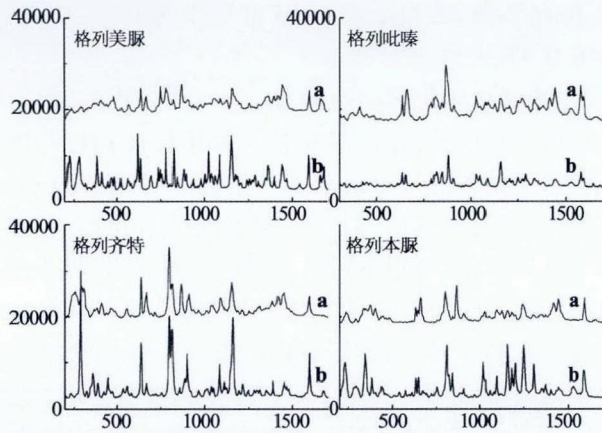


图2 格列类药物的 SERS 谱(a)及其常规拉曼光谱(b)

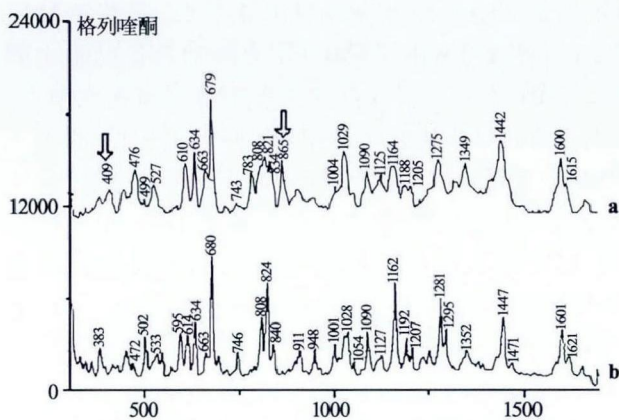


图3 格列喹酮的 SERS 谱(a)及其常规拉曼光谱(b)

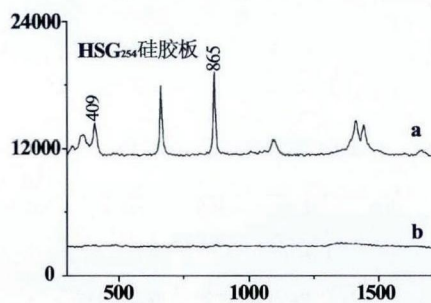


图4 空白硅胶板滴加银溶胶的 SERS 谱(a)及其常规拉曼信号(b)

采用有机相银溶胶获得的格列类降糖药的 SERS 图谱,含有丰富的特征信息,用于定性鉴别时准确性较高,进一步提高了本方法用于中药掺杂该类物质检测的专属性。

3.4 真实样品检测 利用建立的方法对7种真实的降糖中药样品进行检测,结果发现6号样品中非法添加了格列美脲,与山东省食品药品检验所提供的检测结果一致。

4 结论

本研究所建立的检测方法用于降糖类中成药中非法添加格列类化学药品的快速检测时,具有灵敏度高、专属性强、操作简单快速、检测成本低等优点,在中药掺杂快速检测、食品安全监控、农药残留检测等领域具有较好的应用前景。

【参考文献】

- [1] 王铁松,全禹,郑洁,等. 薄层色谱法快速筛查降脂、降压、止咳平喘类中药制剂中的29种添加化学药物[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(11): 857-861.
- [2] 陈玉武,张凤萍,高晓昱. 薄层色谱法初筛少数中药制剂中添加降糖类化学药物[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(7): 1298-1300.
- [3] 吕情花,李永华. HPLC法测定中成药通宣理肺胶囊(颗粒、片)中非法添加的化学药品[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(21): 225-226.
- [4] 钟伟新,王平,曾凡. HPLC法测定中成药和保健食品中违法添加的6种肾上腺皮质激素[J]. 今日药学, 2012, 22(5): 282-284.
- [5] 李丹,文红梅,崔福春,等. LC-MS/MS法快速测定中成药、保健食品中非法添加的36种化学成分[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1527-1532.
- [6] Chen Y, Zhao L, Lu F, et al. Determination of synthetic drugs used to adulterate botanical dietary supplements using QTRAP LC-MS/MS[J]. Food Addit Contam Part A, 2009, 26(5): 595-603.
- [7] 陈斌,余岳林,张少敏,等. 中成药和保健食品中非法添加西药成分检测方法的探索[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(10): 1677-1680.
- [8] 颜杰,刘志强,程振田. 中成药及中药保健食品中非法添加化学药品现状与对策[J]. 中国医疗前沿, 2007, 42(9): 716-718.
- [9] Li D, Qu LL, Zhai WL, et al. Facile on-site detection of substituted aromatic pollutants in water using thin layer chromatography combined with surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Environ Sci Technol, 2011, 45(9): 4046-4052.
- [10] Zhu QX, Cao YB, Chai YY, et al. Rapid on-site TLC-SERS detection of four antidiabetes drugs used as adulterants in botanical dietary supplements[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406: 1877.
- [11] Huang RF, Han S, Li XS. Detection of tobacco-related biomarkers in urine samples by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with thin-layer chromatography[J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(21): 6815.

(下转第230页)

儿多为低龄儿童,对药物敏感性高,肝肾发育不全,每日复诊提高了患儿的依从性,也使门急诊患儿得以根据病情及时调整用药量和用药品种,有效提高了用药的合理性。

3.4 有利于提高患儿的依从性 由于适合低龄患儿口服的抗生素剂型较少,口服依从性较差,所以儿童抗生素输液比例较成人略高。影响门急诊抗生素输液治疗的因素有:抗生素的稳定性、患者的依从性、病情观测缺乏导致无法及时调整疗程等^[2]。OUIVAS 的建立,有效地降低了这些因素的影响,很大程度上提高了我院患儿静脉输液药物治疗的质量,为患儿提供了更好的医疗服务。

4 完善 OUIVAS 的建议

OUIVAS 尚处于发展初期,还存在一些有待完善之处。首先,药剂师和医生直接沟通不畅,对处方存在的不合理之处,需依赖患儿家长传递信息,而患儿家长和医务人员知识的不对等性可能导致其无法理解药剂师或是错误传达了信息。患儿家长在医生、药房两边跑可能会延误用药而耽误病情,亦可能会引起矛盾产生纠纷。其次,OUIVAS 目前还没有权威统一的工作制度和操作规程。第三,OUIVAS 目前尚无统一的验收标准和收费标准。

4.1 进一步完善医院信息系统 在计算机软件中嵌入审方软件。辅助药剂师审核处方,避免人员疏漏,为患儿用药安全增添一道保障。同时,在处方上标注患儿体重,有助于药剂师确定用药量的合理性。此外,建立医生和药剂师的通信系统。遇到不合理处方时,若信息系统支持药剂师在电子处方上标记,然后将信息传递给处方医生,待处方医生确认后,信息重新传递给药剂师,这样就可以使处方用药信息在医务人员之间顺利沟通。

4.2 建立相关的工作制度与操作规程 儿童医院根据自己的实际运行情况,参考 PIVAS,制定了 OUIVAS 相关的工作制度与操作规程。但由于运行时间尚短,相关的工作制度与操作规程也尚不完善,因此除了在日后的运行中需要不断地总结完善之外,也希望相关部门尽快出台权威统一的 OUIVAS 工作制度和操作规程。

4.3 需要有 OUIVAS 的合理收费与报销制度 美国医疗保险体系支持将静脉配置服务的费用与药品费用联系在一起,对于静脉药物的配制设有专项经费补偿;英国医疗体系则将这项服务费与药品费用分离,对使用静脉药物所产生的配制费用给予报销^[3,4]。国内已有部分省市卫生厅制定了 PIVAS 收费标准^[5,6],如江苏省卫生厅已出台了试行的 PIVAS 验收标准,相信随着 PIVAS 相关标准的出台,OUIVAS 的相关标准也会逐步完善起来。

【参考文献】

[1] Armour DJ, Cairns CJ, Costello I, *et al.* The economics of a pharmacy-based central intravenous additive service for paediatric patients[J]. *Pharmaco Econom*, 1996, 10(4):386-394.
 [2] Peter T, Frame MD. Outpatient intravenous antibiotic therapy [J]. *J Amer Med Ass* 1982, 248(3):336-339.
 [3] Allwood MC. Practical guides I: central intravenous additive services[J]. *J Clin Pharm her*, 1994, 19(3):137-145.
 [4] 王小乐, 陈盛新. 静脉输液混合加药服务[J]. *药学实践杂志*, 2007, 25(2):124-127.
 [5] 张峻, 施莹, 殷家福. 云南省 PIVAS 验收和收费标准的建立及实施[J]. *药品评价*, 2010, 7(2):55-58.
 [6] 龚婷, 郭韧, 吴翠芳, 等. 静脉用药调配中心的建设与收费标准探讨[J]. *药品评价*, 2012, 9(14):38-40.
 [收稿日期] 2013-03-26 [修回日期] 2013-10-21
 [本文编辑] 陈静

(上接第 208 页)

[12] Federica P, Nobuko SB, Marco L, *et al.* TLC-SERS study of Syrian rue (*Peganum harmala*) and its main alkaloid constituents [J]. *J Raman Spectrosc*, 2013, 44(1): 102.
 [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版二部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 附录 210.
 [14] 汪泉, 李翔, 许威, 等. TLC 法快速鉴别保健品中非法添加的 7 种降糖类物质[J]. *安徽医药*, 2012, 16(4): 464-466.
 [15] 尹利辉, 张雁. 正电性纳米银胶的表征及加入不同凝聚剂后的表面增强拉曼散射光谱[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30

(12): 2352-2355.
 [16] Lee PC, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols[J]. *J Phys Chem*, 1982, 86(17): 3391-3395.
 [17] Robin L, Garrel L, Richard H. Surface-enhanced Raman spectroscopy using nonaqueous[J]. *J Colloid Interf Sci*, 1985, 105(2): 483.
 [18] Isabel PS, Luis ML. Synthesis of silver nanoprisms in DMF[J]. *Nano Lett*, 2002, 2(8): 903-905.
 [收稿日期] 2014-04-02 [修回日期] 2014-04-21
 [本文编辑] 顾文华