

· 研究报告 ·

TLC-SERS 同时检测银黄软胶囊中 3 种非法添加成分

宋卫国¹, 陆永辉¹, 张中湖², 张会敏¹ (1. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 2. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

[摘要] 目的 建立薄层色谱-表面增强拉曼光谱(TLC-SERS)联用技术同时检测中成药银黄软胶囊中非法添加的西药化学成分双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定。方法 将待测样品点于硅胶板,用石油醚-乙酸乙酯(3:5)进行薄层展开,在 254 nm 紫外光下进行定位检测,在分离的各个斑点处按优选的最佳条件喷加纳米银胶溶液,用表面增强拉曼光谱(SERS)进行定性鉴别。结果 本研究建立了 TLC-SERS 联用技术同时检测银黄软胶囊中非法添加的双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定的方法,并确定了 3 种化学成分的最低检测限。结论 TLC-SERS 联用技术快速、准确、灵敏度高,可同时快速检测银黄软胶囊中非法添加的双氯芬酸钠、芬布芬和盐酸罗通定 3 种成分。

[关键词] 银黄软胶囊;非法添加;薄层色谱-表面增强拉曼光谱

[中图分类号] R917

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)02-0166-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.201908092

Simultaneously detect three illegal additive components in Yinhuang soft capsule by TLC-SERS

SONG Weiguo¹, LU Yonghui¹, ZHANG Zhonghu², ZHANG Huimin¹ (1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

[Abstract] **Objective** To establish a simultaneous detection of diclofenac sodium, fenbufen and rotundine hydrochloride illegally added in Yinhuang soft capsules by TLC-SERS. **Methods** The samples to be measured were placed on the silica gel plate, and the thin layer was developed with petroleum ether-ethyl acetate (3:5). Location detection was carried out under 254 nm ultraviolet lamp. Nano-silver colloidal solution was sprayed at each spot of separation according to the optimum conditions, and then qualitative identification was done by TLC-SERS. **Results** A method for simultaneous determination of diclofenac sodium, fenbufen and rotundine hydrochloride illegally added in Yinhuang soft capsule by TLC-SERS was established. And the minimum detection limits of three chemical constituents were determined. **Conclusion** TLC-SERS was a rapid, accurate and sensitive method for the simultaneous and rapid detection of diclofenac sodium, fenbufen and rotundine hydrochloride illegally added into Yinhuang soft capsule.

[Key words] Yinhuang soft capsule; illegal addition; TLC-SERS

银黄软胶囊是一种清热、解毒、消炎作用的中成药。因中药起效慢、副作用少,一些不良商家为了寻求暴利,在中成药中添加西药成分,短时间内提高中成药的疗效,误导消费者以寻求高利润。因双氯芬酸钠有消炎镇痛作用、芬布芬有抗炎作用、盐酸罗通定有镇痛作用,就成了不良商家非法添加

的成分之列,据报道有 30% 的抗风湿类健康产品中非法添加了双氯芬酸钠^[1],多种抗风湿镇痛类中药制剂中非法添加双氯芬酸钠、芬布芬等此类化学药物^[2]。因此,建立一种快速有效的检测方法,对可能非法添加了西药成分的中成药进行现场检测具有重要的意义。

近几年,薄层色谱-表面增强拉曼光谱(TLC-SERS)联用技术广泛地应用于各种领域^[3-4],尤其是在药物非法添加研究领域被逐渐认可^[5-8]。本研究应用 TLC-SERS 联用技术,探索双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定在中成药银黄软胶囊中非法添加的鉴别方法,以期为进一步的中成药快速检验提供实验依据。

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划(2017-133),山东省食药监局发展计划类(SDFDAFZLY201808)资助

[作者简介] 宋卫国,副研究员;研究方向:药物分析,药品快检技术, Email: shhc999@163.com

[通讯作者] 张会敏,副研究员;研究方向:中药化学, Email: huiminzhang@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与amp;试剂

便携式拉曼光谱仪(BWS415, B&W Tek Inc., U.S.A),激光发射波长785 nm,分辨率 5 cm^{-1} ;WFH-203B型三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司);离心机(TG16-WS, 上海卢湘仪离心机有限公司);KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);薄层板 HSGF₂₅₄(烟台市化学工业研究所)。

双氯芬酸钠(批号: 100334-200302, 供含量测定用)、芬布芬(批号: 100415-201102, 纯度 99.4%)、盐酸罗通定(批号: 100222-200702, 供鉴别用)均购自中国食品药品检定研究院。实验所用阴性样品由山东省食品药品检验所提供, 银黄软胶囊(批号: 359161004, 石药集团欧意药业有限公司)。乙酸乙酯(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20150410)、石油醚(天津市富宇精细化工有限公司, 批号: 12589-2007);硝酸银(批号: 20140320, 国药集团化学试剂有限公司), 柠檬酸钠(分析纯, 批号: 20120429, 国药集团化学试剂有限公司);实验用水为蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的制备

对照品溶液: 精密称取对照品双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定对照品 2 mg, 置 EP 管中, 加入甲醇 2 ml 溶解, 制成浓度为 1 mg/ml 的溶液, 作为对照品溶液, 冷藏保存, 备用。

模拟假阳性样品溶液: 取中成药银黄软胶囊(经山东省食品药品检验院薄层色谱-质谱联用法检测, 不含以上 3 种对照品, 可作为阴性样品)一次剂量, 置 EP 管中, 并精密量取双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定对照品溶液加入 EP 管中, 与银黄软胶囊样品溶液混匀, 甲醇溶解, 振荡, 超声(40 kHz, 250 W)30 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 微孔滤膜滤过, 作为假阳性样品, 冷藏保存, 备用。

阴性样品溶液: 取中成药银黄软胶囊一次剂量, 置 EP 管中, 加入甲醇 2 ml 溶解, 振荡, 超声(40 kHz, 250 W)30 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 微孔滤膜滤过, 作为阴性样品, 冷藏保存, 备用。

1.2.2 纳米银胶溶液的制备

精密称取 45 mg 的硝酸银, 加入少量去离子水使其溶解。溶解后移至 250 ml 的容量瓶中, 用去离子水定容。用电磁搅拌加热器不断搅拌并将其加热至微沸, 逐滴加入 5 ml 浓度为 1% 柠檬酸钠

溶液并继续加热, 保持微沸 60 min, 继续搅拌至溶液冷却, 得灰绿色银溶胶, 避光保存^[8]。

1.2.3 最佳光谱条件的优选

分别取 1 mg/ml 双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定对照品溶液, 以点样点胶比为变量, 激光功率, 积分时间为定值, 检测出峰效果, 筛选 3 种成分的最佳点样点胶比; 同理筛选 3 种成分的最佳激光功率、积分时间。

1.2.4 检测限的考察

以对照品溶液与阴性样品溶液作为对照, 将配制的添加不同浓度对照品的模拟阳性样品点在同一块硅胶薄层板上, 按优选的最佳光谱条件设置点样点胶比、激光功率、积分时间, 根据信噪比(S/N=3)评价出峰效果, 确定各个对照品的检测限。

1.2.5 表面增强拉曼光谱检测

将配置好的各种样品、对照品溶液置于薄曼联用仪内对应位置, 高效硅胶薄层板置于仪器平台上, 设置点样量与点样位置, 由联用仪完成点样操作。取出点样后的薄层板, 以选定的石油醚-乙酸乙酯(3:5)展开系统, 室温下展开 80 mm, 取出晾干, 放回联用仪, 于内置 254 nm 紫外灯下检视定位以确定点胶位置, 设置合适的点胶量、激光强度与积分时间, 由联用仪完成点胶操作后, 随即进行拉曼检测。

2 结果

2.1 最佳出峰条件的筛选结果

对照品双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定最佳出峰条件分别是: 双氯芬酸钠点样点胶比 2:3, 激光功率 30%, 积分时间 30 s; 芬布芬点样点胶比 2:2, 激光功率 40%, 积分时间 30 s; 盐酸罗通定点样点胶比 1:2, 激光功率 50%, 积分时间 30 s。拉曼图谱如图 1 所示。

2.2 检测限的考察结果

从图 2、图 3、图 4 中可以看出, 3 种对照品在薄层色谱中分离程度高, 双氯芬酸钠的比移值(Rf)值为 0.75, 芬布芬 Rf 值为 0.54, 盐酸罗通定 Rf 值为 0.21。由“2.1”项可知, 双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定最佳点样点胶比分别为 2:3、2:2、1:2(即点样量分别为 2 μl 、2 μl 、1 μl), 故银黄软胶囊中添加的双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定最低检测限对应的点样沉积量分别为 0.2 μg 、0.2 μg 、0.1 μg 。

2.3 模拟的假阳性样品考察结果

从图 5 薄层板中可以看出, 同时添加了 3 种对照品的银黄软胶囊模拟的假阳性样品溶液 4、5、

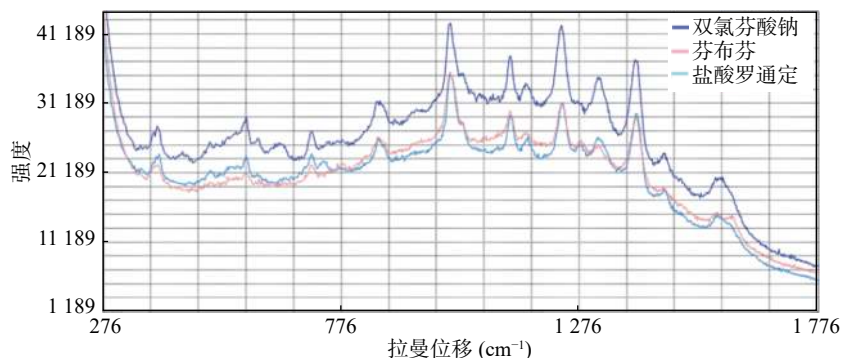


图1 3种成分最佳出峰条件下的SERS图谱

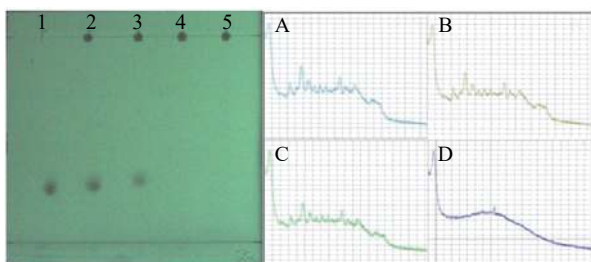


图2 双氯芬酸钠薄层及各斑点拉曼光谱

1.1 mg/ml 双氯芬酸钠; 2.添加 1 mg/ml 双氯芬酸钠; 3.添加 0.1 mg/ml 双氯芬酸钠; 4.添加 0.01 mg/ml 双氯芬酸钠; 5.阴性样品

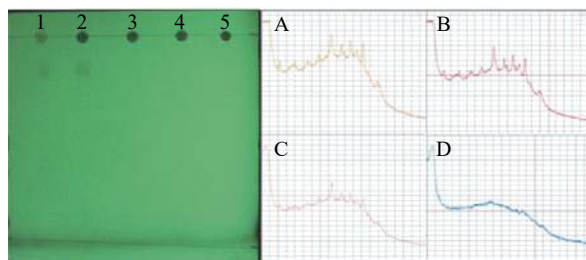


图4 盐酸罗通定薄层及各斑点拉曼光谱

1.1 mg/ml 盐酸罗通定; 2.添加 1 mg/ml 盐酸罗通定; 3.添加 0.1 mg/ml 盐酸罗通定; 4.添加 0.01 mg/ml 盐酸罗通定; 5.阴性样品

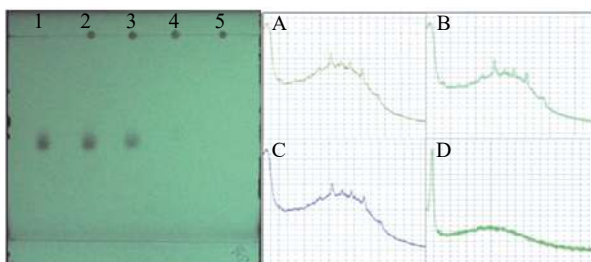


图3 芬布芬薄层及各斑点拉曼光谱

1.1 mg/ml 芬布芬; 2.添加 1 mg/ml 芬布芬; 3.添加 0.1 mg/ml 芬布芬; 4.添加 0.01 mg/ml 芬布芬; 5.阴性样品

6、7号中出现了与双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定相同Rf值的斑点,可初步确定4、5、6、7中添加了双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定。为进一步确证,对各斑点进行SERS检测,在拉曼仪数据处理系统中与相应对照品色谱斑点的SERS光谱进行对比,结果表明4、5、6、7号中对应斑点的SERS

图谱与双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定对照品的SERS图谱相同,见图5中SERS图谱。

2.4 3种成分的拉曼光谱分析

由图6可知,双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定3种成分的分子结构中均含有苯环、C—C、C=O基团,故3种成分的拉曼光谱特征峰有9个共有峰,在576、712、1004、1130、1240、1316、1394、1454、1564 cm⁻¹左右,同一共有峰的强度有所不同,取代基不同拉曼位移略有变化(见表1)。此外,由于3种成分的分子结构含有不同的基团,也有相应的差异峰,如740 cm⁻¹为盐酸罗通定特有峰。共有峰、差异峰以及峰强度共同组成了区别于其他成分的特征峰群,这为TLC-SERS专属性鉴别提供了依据。

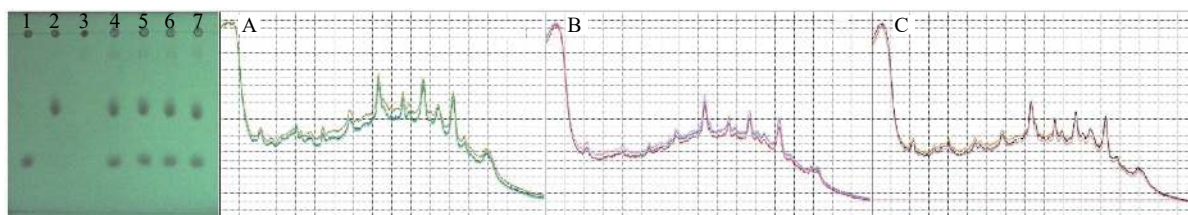


图5 模拟假阳性样品薄层及拉曼光谱

1.双氯芬酸钠; 2.芬布芬; 3.盐酸罗通定; 4-7.添加以上3种成分的银黄软胶囊
A.4-7号样品中双氯芬酸钠光谱峰 B.4-7号样品中芬布芬光谱峰 C.4-7号样品中盐酸罗通定光谱峰

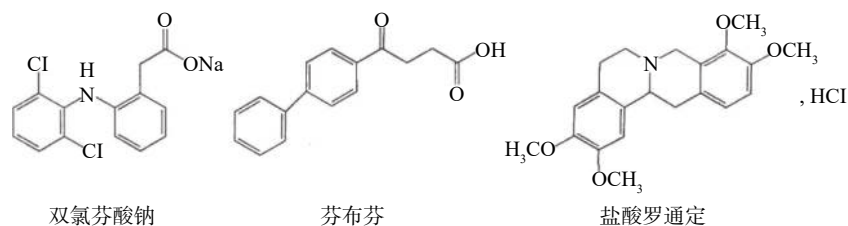


图6 3种成分的分子结构

表1 3种成分的拉曼光谱特征峰 (cm⁻¹)

成分	特征峰												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
双氯芬酸钠	390	576	712	854	1 004	1 130	1 162	1 238	1 316	1 394	1 454	1 570	-
芬布芬	384	576	712	854	1 004	1 130	1 240	1 276	1 316	1 394	1 454	1 564	-
盐酸罗通定	394	576	712	740	1 005	1 132	1 168	1 240	1 278	1 320	1 395	1 456	1 564

3 讨论

本研究通过反复试验,确定了TLC展开剂为石油醚-乙酸乙酯(3:5),得到了较好的展开效果。在展开的TLC薄层板上,3种对照品对应的斑点处,模拟假阳性样品与3种对照品有相同斑点;经过进一步的SERS检测,模拟假阳性样品的斑点拉曼光谱特征峰与对照品斑点拉曼光谱特征峰一致,且重复性良好,说明TLC-SERS联用技术简便、准确、可靠,可同时检测银黄软胶囊中非法添加的双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定3种成分。

本研究采用TLC-SERS联用技术所建立的检测方法,对中成药银黄软胶囊中非法添加西药双氯芬酸钠、芬布芬、盐酸罗通定3种成分的,能满足同时、快速检测的要求。该方法实用性强,对人员技术要求低,尤其适合现场快速检测。

【参考文献】

[1] 蓝献泉,黄义纯,黄红雯,等.抗风湿类中成药及保健品中非法添加双氯芬酸钠的快速筛查方法研究[J].*中南药学*,2014,

12(9):902-905.

[2] 吴小红,李焕德,朱荣华,等. HPLC-MS/MS法鉴别中药制剂中非法添加的多种解热镇痛类化学药物[J]. *中南药学*,2010,8(10):724-729.

[3] ZHANG J N, MA X Y, WANG Z P. Real-time and *in situ* monitoring of abrin induced cell apoptosis by using SERS spectroscopy[J]. *Talanta*,2019,195:8-16.

[4] LI D W, QU L L, ZHAI W L, 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.

[5] 王磊,陈梦云,李晓,等. TLC-SERS法快速分析抗精神失常类中药的化药成分[J]. *实验室研究与探索*,2016,35(5):22-26.

[6] 张彬彬,史毅,陈辉,等. 薄层色谱-表面增强拉曼光谱法快速检测染色掺伪的西红花[J]. *药实践杂志*,2017,35(3):215-218.

[7] 赵瑜,尹利辉,胡昌勤. 拉曼光谱法在快速筛查紫杉醇脂质体制剂中的应用[J]. *中国医药导报*,2018,15(19):24-29.

[8] 张中湖,李军,谢强胜,等. TLC-SERS高通量筛查中成药与保健食品中添加的降糖化学物质[J]. *药物分析杂志*,2019,39(3):467-476.

【收稿日期】 2019-08-21 【修回日期】 2020-01-27

【本文编辑】 陈盛新