

· 论著 ·

基于整体柱的表面增强拉曼光谱法检测非法染色青黛

郑滨兴¹, 吕迪亚², 方芳², 刘艳华¹, 李丹³, 陆峰², 许激扬¹ (1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108)

[摘要] 目的 建立基于整体柱的表面增强拉曼光谱(surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)法快速检测非法染色的青黛。方法 采用混合溶剂乙醇-水(1:1, V/V)对染色青黛中的染料进行提取, 利用整体柱中网状孔隙有助于银纳米颗粒在空间上耦合的特性, 将样品溶液和银胶溶液混匀后滴加于整体柱上进行 SERS 光谱采集。结果 此法可得到青黛中染色掺伪量低至 500 μg/kg 的孔雀石绿 SERS 信号。结论 该方法具有快速、简便、专属性强等优点, 可运用于中药材青黛非法染色的快速检测。

[关键词] 表面增强拉曼光谱; 整体柱; 非法染色; 青黛; 孔雀石绿

[中图分类号] R927.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)05-0426-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.05.011

Detection of malachite green in natural indigo by surface enhanced Raman spectroscopy based on monolithic column

ZHENG Binxing¹, LV Diya², FANG Fang², LIU Yanhua¹, LI Dan³, LU Feng², XU Jiyang¹ (1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. School of Pharmacy, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective** To develop a rapid SERS detection method based on monolithic column for detection of dye adulterated natural indigo. **Methods** The dyes in natural indigo were extracted and mixed with silver colloid. The spectra were recorded after applying the mixture solution to the monolithic column since the intertwined pores in monolithic column could contribute for the distribution of silver nanoparticles. **Results** SERS signals of malachite green dyed natural indigo at quantity as low as 500 μg/kg could be obtained. **Conclusion** This simple, fast and specific SERS detection method based on monolithic column could be used for rapid detection of stained natural indigo.

[Key words] surface enhanced Raman spectroscopy (SERS); monolithic column; adulteration; natural indigo; malachite green

在中药市场中, 受利益驱使, 掺伪造假现象屡禁不止^[1], 包括以次充好、以伪充真、染色掺伪等, 其中染色掺伪尤为严重。青黛是一种廉价易得的中药材, 为爵床科植物马蓝、蓼科植物蓼蓝或十字花科植物菘蓝的叶或茎叶经加工制得的干燥粉末或团块, 具有清热解毒、凉血消斑、泻火定惊等功效。孔雀石绿染色青黛时有报道^[2]。孔雀石绿有毒, 可致癌, 食用孔雀石绿染色青黛不仅无预期疗效, 反而会加重病情, 因而急需快速有效的鉴别手段。

中药染色掺伪常用鉴别方法有经验鉴别和一般理化方法、色谱法与光谱法等^[3]。薄层色谱法(TLC)具有分离与鉴定的双重功能, 且操作简单成本低, 但影响因素较多, 常用于定性初筛; 高效液相色谱法(HPLC)分离性能强, 可与不同检测器联用, 具有较好的定性定量功能, 但操作烦琐、仪器复杂, 不适于快速检测; 表面增强拉曼光谱法(SERS)是一种高灵敏、高专属的新型谱学技术, 对样品预处理要求低, 已广泛应用于色素、农药残留与污水中污染物等的检测研究^[4-7]。近年来提出了基于整体柱的 SERS 检测方法^[8], 对样品进行富集后检测, 可检测浓度低至 10⁻¹⁸ mol/L 的罗丹明(R6G), 表明此法具有高灵敏性和广阔的应用前景。

笔者采用多孔有机整体柱, 结合具有较好增强

[作者简介] 郑滨兴, 硕士研究生. E-mail: zhengbinxing@hotmail.com

[通讯作者] 许激扬, 博士, 教授, 硕士生导师. 研究方向: 生物技术制药. Tel: (025)83271306; E-mail: jiyangx@126.com

效果的银胶溶液,并优化 SERS 检测条件以期建立非法染色青黛的快速有效的检测方法,从而有利于中药市场的监管,保障消费者用药安全。

1 仪器与材料

1.1 仪器 BWS415-785H 便携式拉曼光谱仪(B&W Tek, USA);TG16-WS 高速离心机(上海卢湘仪离心机有限公司);XW-80A 型漩涡混合器(上海精科实业有限公司);KQ-250DB 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);扫描电镜(Zeiss EVO MA-10)。

1.2 材料 孔雀石绿、硝酸银、柠檬酸三钠、青黛(均为分析纯,上海国药化学试剂有限公司);甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)、过氧化苯甲酰(BPO)、环己醇、正十二醇(均为分析纯,阿拉丁试剂公司);实验用水为超纯水。

2 方法

2.1 整体柱的合成 据文献[9]报道的 GMA-EDMA 整体柱合成方法制作整体柱:称取 GMA (单体)1.28 g、EDMA (交联剂)1.92 g、BPO (引发剂)0.032 g、十二醇(致孔剂)0.768 g 和环己醇(致孔剂)4.032 g,超声使其充分混匀与除气,倒入长为 10 cm、直径为 0.5 cm 的塑料管状模具中,密封后置 60 °C 水浴中 12 h;将模具剖开,取出整体柱置乙醇中过夜,室温干燥,将所得整体柱切成小圆柱,打磨平整后备用。

2.2 银胶溶液的制备 称取 45 mg 硝酸银置 500 ml 三颈圆底烧瓶中,加入 250 ml 去离子水溶解,加热至沸腾,不断搅拌的情况下逐滴加入 5 ml 1% 的柠檬酸钠溶液,沸腾状态下继续搅拌 50 min,自然冷却,即得灰绿色银胶溶液^[10],取制得的银胶溶液 1 ml 离心浓缩至所需浓度后备用。

2.3 样品溶液的配制

2.3.1 孔雀石绿对照溶液 精密称取孔雀石绿适量,加入乙醇溶解,制备成 10^{-3} mol/L 的溶液,逐级稀释制备所需浓度溶液。

2.3.2 染色青黛制备与染料提取 称取 0.05 g 青黛,加入上述孔雀石绿对照溶液涡旋混匀后烘干;向上述染色后的青黛加入混合溶剂乙醇-水(1:1, V/V)200 μ l,涡旋 30 s 后静置,待其分层,取 100 μ l 上清液备用。

2.4 拉曼光谱法检测 取 100 μ l 的样品溶液,加入 10 μ l 银胶溶液和 10 μ l 氯化钠溶液

(80 mmol/L)涡旋混匀,滴加于整体柱表面,多余的液体将随着整体柱孔隙流出,将激光光斑聚焦于整体柱表面采集 SERS 信号。

3 结果与讨论

3.1 整体柱的表征 采用扫描电镜(SEM)对所得整体柱进行表征,结果如图 1,可以看出整体柱材料具有丰富的相互交织的孔隙,呈三维结构,可使固定在整体柱材料上的纳米颗粒在空间位置上有更好的耦合作用,从而产生较好的 SERS 增强效果,利于待测物质的检测。

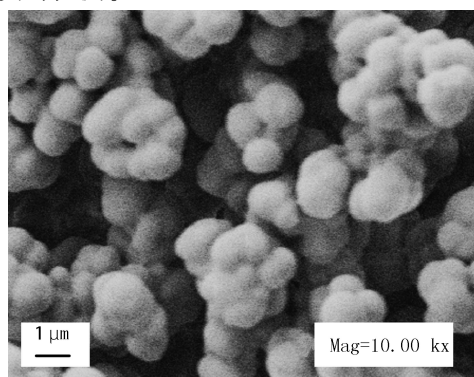


图 1 GMA-EDMA 整体柱扫描电镜图

3.2 银胶溶液浓度的选择 SERS 增强效应与银纳米粒的浓度有关^[11],为使整体柱/银胶体系有较好的 SERS 增强效果,考察相同体积不同浓度银胶溶液的增强效果。如图 2,曲线 a 为整体柱的常规拉曼图谱;曲线 b 为空白银胶溶液在整体柱上的拉曼图谱,用超纯水代替孔雀石绿溶液与银胶溶液混合后,滴加于整体柱进行光谱采集;曲线 c~g 分别为采用 1~5 倍浓缩银胶溶液所获得的 SERS 图谱。根据图 2 中标出的 423、441、1 173、1 618 cm^{-1} 的特征峰,可知随着银胶溶液浓缩倍数不断增大,SERS 信号不断增强,随后出现下降趋势。银胶溶液浓度的适当增加有助于银纳米粒子在整体柱上有效耦合从而达到良好的增强效果,但银胶溶液浓度过高将导致附着于整体柱上的银纳米粒子过度聚集,SERS 信号反而降低。实验中发现采用 4 倍浓缩银胶溶液时增强效果较佳。

3.3 最佳富集量的确定 银胶溶液与样品溶液混合后,孔雀石绿分子会吸附于银纳米粒表面,滴加于整体柱表面富集时,吸附有孔雀石绿的银纳米粒滞留在整体柱表面,多余的液体将从其内部孔隙流出。理论上,富集量(V)越大,滞留于整体柱表面的孔雀石绿分子越多,所得 SERS 信号越强。实验中对比了 V=40、60、100、150、200 μ l 时所得的增强效果,

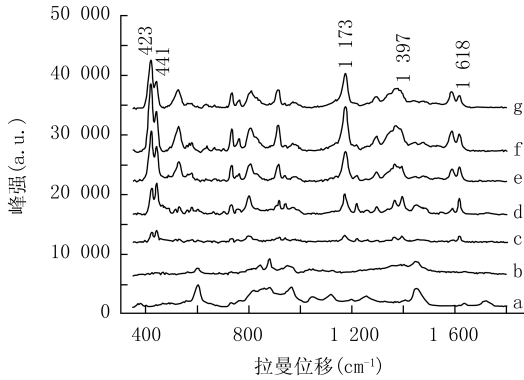


图2 不同浓度银胶溶液所得 SERS 图谱

a. GMA-EDMA 整体柱材料; b. 空白银胶溶液; c~g. 1~5 倍浓缩胶

如图3,整体柱/银胶体系中,当 $V < 100 \mu\text{l}$ 时,随着富集量的增大,SERS信号增强,符合预期情况;当 $V > 100 \mu\text{l}$ 时,孔雀石绿423、441、1 173、1 397、1 618 cm^{-1} 的特征峰反而减弱,可能由于随着富集量的增大,滞留在整体柱表面的银纳米颗粒的聚集状态发生改变;且由图4可知,当 $V > 100 \mu\text{l}$ 时,所得SERS信号的稳定性较弱。实验结果表明, $V = 100 \mu\text{l}$ 时整体柱/银胶体系的SERS增强效果最佳。

3.4 整体柱/银胶体系孔雀石绿的检测 采用上述

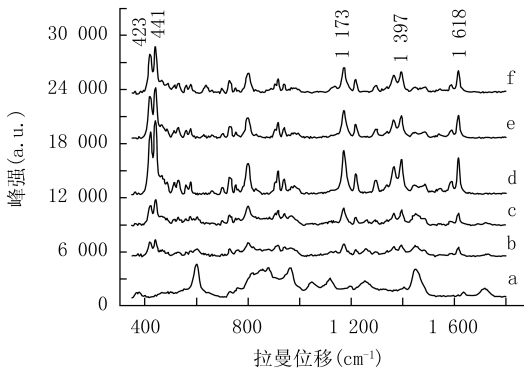


图3 不同富集量所得 SERS 图谱

a. GMA-EDMA 整体柱材料; b. $V = 40 \mu\text{l}$; c. $V = 60 \mu\text{l}$; d. $V = 100 \mu\text{l}$; e. $V = 150 \mu\text{l}$; f. $V = 200 \mu\text{l}$

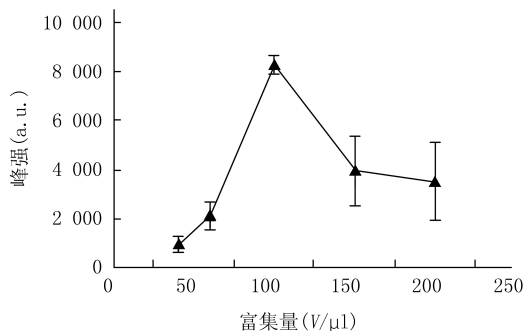


图4 孔雀石绿 441 cm^{-1} 特征峰强与富集量的关系

孔雀石绿在整体柱/银胶体系中优化的最佳检测条件,笔者对孔雀石绿的检测限进行了考察。得到系列浓度孔雀石绿在整体柱/银胶体系中的SERS图谱,由图5可知,当孔雀石绿的浓度(C)降至 10^{-10} mol/L 时仍能观察到其特征峰,在 $1 010 \text{ cm}^{-1}$ 处有时会出现整体柱自身增强峰,但并不影响孔雀石绿的检测。由423、441、1 173、1 397、1 618 cm^{-1} 特征峰可知在 $10^{-7} \sim 10^{-10} \text{ mol/L}$ 浓度范围内,随孔雀石绿浓度的降低其SERS信号呈减弱趋势。

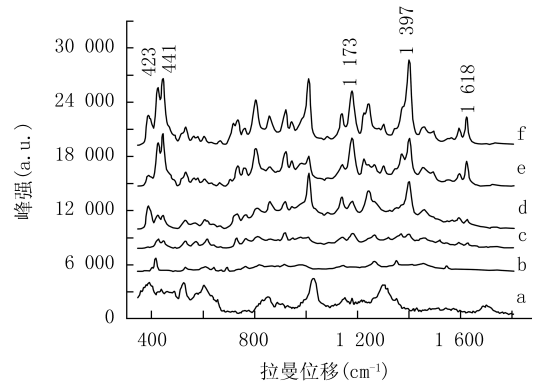


图5 基于整体柱的不同浓度孔雀石绿的 SERS 图谱

a. GMA-EDMA 整体柱材料; b. 空白银胶溶液; c. $C = 10^{-10} \text{ mol/L}$; d. $C = 10^{-9} \text{ mol/L}$; e. $C = 10^{-8} \text{ mol/L}$; f. $C = 10^{-7} \text{ mol/L}$

3.5 染色青黛的鉴别 将实验室自行制备的染色青黛按“2.4”项的方法进行测定,结果如图6所示,曲线a为未染色青黛结合上述方法测定的SERS信号,作为空白信号,未观察到孔雀石绿的特征峰,而在693和733 cm^{-1} 处出现青黛基质的未知信号峰,但并不干扰孔雀石绿的测定;曲线b~e为不同染色掺伪量(m)所得的SERS图谱,由图看出可检测低至 $500 \mu\text{g/kg}$ 孔雀石绿染色掺伪的青黛,远低于实际染色掺伪量 1 g/kg ,表明此方法结合简单的前处理能快速地检测青黛中的孔雀石绿。同时,SERS谱图中的信息对应其分子结构,可对被测样品分子进行定性,通过建立相应的染料图谱库,即可对染色掺伪中药材进行快速鉴别。

4 结论

笔者制备了多孔有机整体柱,并采用SEM对制得的整体柱进行表征,整体柱内部具有交织的孔隙,为空间网状结构,可作为金、银纳米粒良好的承载基底。通过优化银胶溶液浓度和富集量,可获得浓度低至 10^{-10} mol/L 的孔雀石绿SERS信号;对

(下转第459页)

到正常水平的患者继续观察治疗。治疗期间治疗组未发生药品不良反应,安全性好,与文献报道相符^[13-15]。综上,腺苷蛋氨酸治疗慢性乙型肝炎伴胆红素升高的疗效与安全性良好,值得临床推广使用。

【参考文献】

[1] 郭梦安.不同剂量腺苷蛋氨酸治疗肝内胆淤积性肝病的疗效观察[J].中国医师杂志,2011,13(12):1702-1703.
 [2] 陈国友,钱玉凤.腺苷蛋氨酸治疗病毒性肝炎合并高胆红素血症临床肝功能指标观察[J].中国药物经济学,2012,(3):33-34.
 [3] 郭锦辉,高卫芳,贾素洁.苦黄注射液致不良反应文献分析[J].中国医院用药评价与分析,2014,14(1):72-74.
 [4] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].肝脏,2011,16(1):2-16.
 [5] 王秀英,赵晖.不同剂量腺苷蛋氨酸治疗病毒性肝炎肝内胆淤积性临床疗效观察[J].中国现代医生,2012,50(22):28-29.
 [6] 汪燕君.腺苷蛋氨酸联合熊去氧胆酸治疗胆淤积型药物性肝炎40例[J].浙江中西医结合杂志,2012,22(8):615-617.
 [7] 朱超慧,董迎华,艾正琳,等.药物性胆淤积型肝病的治疗研究[J].胃肠病学和肝病杂志,2014,23(1):90-93.

[8] 谢敬东,赵钢德,谢青,等.丁二磺酸腺苷蛋氨酸治疗胆汁淤积性肝炎的临床疗效[J].肝脏,2013,18(8):550-552
 [9] 盛庆寿,张红星,蒋阳昆,等.腺苷蛋氨酸治疗慢性乙型肝炎高胆红素血症疗效观察[J].胃肠病学和肝病杂志,2010,19(10):909-910.
 [10] 陈威,王晓峰,孙庆丰,等.苦黄注射液联合思密达散剂治疗老年戊型肝炎30例临床观察[J].中国中医药科技,2012,19(3):255-256.
 [11] 毛果,蔡光先,陈斌.1868例慢性乙型肝炎患者中医证候分布特征及与血清病毒学指标的相关性分析[J].湖南中医药大学学报,2014,34(4):24-28.
 [12] 刘娥元.丁二磺酸腺苷蛋氨酸治疗淤胆型病毒性肝炎31例疗效观察[J].吉林医学,2013,34(15):2870-2871.
 [13] 张永红,肖新强,王文龙,等.不同剂量腺苷蛋氨酸治疗病毒性肝炎临床观察[J].肝脏,2013,18(9):627-628.
 [14] 赵巍峰,谷高玲,李长安,等.丁二磺酸腺苷蛋氨酸治疗慢性乙型重症肝炎临床疗效观察[J].中国实用医药,2013,8(20):161-163.
 [15] 雷婷,薛静,热合曼,等.腺苷蛋氨酸序贯治疗对胆汁淤积性肝病的疗效观察[J].实用临床医药杂志,2012,16(15):130-131.

【收稿日期】 2014-05-06 【修回日期】 2015-03-10

【本文编辑】 顾文华

(上接第428页)

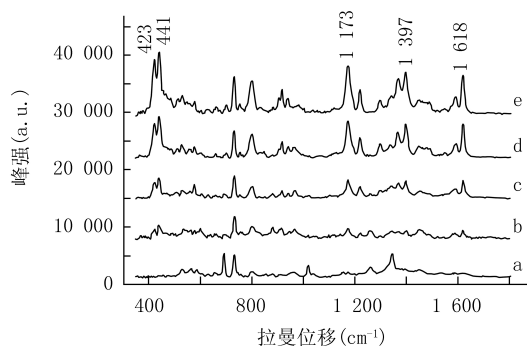


图6 不同孔雀石绿掺伪量所得SERS图谱

a.未染色青黛;b. $m=500 \mu\text{g}/\text{kg}$;c. $m=2.5 \text{ mg}/\text{kg}$;
 d. $m=5.0 \text{ mg}/\text{kg}$;e. $m=20 \text{ mg}/\text{kg}$

模拟样品检测时,可得到低至 $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的孔雀石绿信号,满足真实样品检测的需求。本研究建立的方法具有快速、简单、检测成本低、专属性强等优点,在非法染色中药材检测中具有较好的应用前景。

【参考文献】

[1] 吴云燕,孙雪妮.中药饮片染色现象不容忽视[J].中草药,2001,32(8):752-753.
 [2] 姚志昂.青黛的质量考察与掺伪研究[D].成都:成都中医药大学,2011.
 [3] 蒋玲,饶伟文.中药染色掺假的研究进展[J].首都医药,2011,18(16):16-18.

[4] 谢云飞,李言,余慧,等.整体柱-金复合基底的制备及其在色素SERS检测中的应用[J].光谱学与光谱分析,2014,34(3):681-684.
 [5] Kubackova J, Fabriciova G, Miskovsky P, et al. Sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) detection of organochlorine pesticides by alkyl dithiol-functionalized metal nanoparticles-induced plasmonic hot spots [J]. Anal Chem, 2015, 87(1): 663-669.
 [6] 渠陆陆,李大伟,翟文磊,等.基于表面增强拉曼光谱的水中芳香胺类污染物现场快速检测技术[J].环境化学,2011,30(8):1486-1492.
 [7] 樊玉霞,赖克强,黄轶群.表面增强拉曼光谱技术在食品痕量化学危害检测中的应用[J].光谱学与光谱分析,2014,34(7):1859-1864.
 [8] Li Q, Du Y, Tang H, et al. Ultra sensitive surface-enhanced Raman scattering detection based on monolithic column as a new type substrate[J]. J Raman Spectrosc, 2012, 43(10): 1392-1396.
 [9] Svec F, Fréchet JM. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media[J]. Anal Chem, 1992, 64(7): 820-822.
 [10] 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.
 [11] Zhu Q, Cao Y, Cao Y, 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(7): 1877-1884.

【收稿日期】 2015-02-09 【修回日期】 2015-05-28

【本文编辑】 顾文华