显微共聚焦拉曼检测中药中非法添加的化学降糖药

曹玲[1],王玉[1,2*],罗疆南[2]

(1. 江苏省食品药品检验所,南京 210008;2. 中国药科大学,南京 210009)

摘要 目的:建立检测中药中非法添加化学降糖药的拉曼光谱法。方法:采用显微共聚焦拉曼光谱法,使样品在显微镜下微区成像,逐点选择不同的点采集拉曼光谱图,并与对照品光谱图进行比对分析,判断是否非法添加。结果:在市场监督抽样的中药中检出非法添加盐酸二甲双胍,检出结果进一步得到 HPLC - MS 法验证。结论:显微共聚焦拉曼光谱可作为中药、保健食品中非法添加化学药物检测的可选方法。

关键词: 拉曼光谱法;显微共聚焦拉曼;中药;降糖药

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254 - 1793(2011)03 - 0539 - 05

Confocal Raman microscopy identification of synthetic hypoglycemic drugs adulterated in Chinese traditional medicines

CAO Ling[1], WANG Yu[1,2*], LUO Jiang - nan[2]

(1. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China;
2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract **Objective:** To develop a method of Raman spectroscopy for the identification of Synthetic Hypoglycemic Drugs adulterated in Chinese traditional medicines. **Methods:** The spectra of the samples, collected by confocal Raman microscopy with the spatial mapping and multivariate analysis of Raman maps, were compared with those obtained from the reference substances. **Results:** The synthetic hypoglycemic drugs such as metformin hydrochloride adulterated in the products supplied for inspection were rapidly differentiated. The results were further demonstrated by HPLC - MS analysis. **Conclusion:** Confocal Raman microscopy can be used as an alternative method for the identification of the adulteration of Chinese traditional medicines and health - care food with synthetic drugs.

Key words: Raman spectroscopy; confocal Raman microscopy; Chinese traditional medicines; synthetic hypoglycemic drugs

随着生活水平提高,生活节奏加快,体力活动减少,以及营养过剩、人口老龄化问题的显现,糖尿病等一些慢性病的患者正逐年上升,而且还出现低龄化趋势[1]。

中药在防治糖尿病方面彰显了其独有特性,并已取得了良好的效果。但是中药见效较慢,患者常常在追求快速疗效的情况下选择西药治疗。一些不法企业在利益的驱动下,为了增强中药的降糖效果,在中药制剂或保健食品中非法添加各种降糖类化学药品,一些患者往往在不知情的情况下大量服用,随意增减用量,忽略药物的副作用,造成不可挽救的后果。

化学降糖药种类很多,最为常用的是双胍类如盐酸二甲双胍、苯乙双胍和磺酰脲类(又称格列类)如格列本脲、格列吡嗪等。建立准确可靠的方法检测这些易于非法添加的化学物质是非常必要的。近年来,采用 HPLC 及相关检测技术对非法添加化学品进行了一些研究[2~5]。

拉曼光谱在水溶液中可直接测定,样品制备简单、甚至无需样品制备和不破坏样品,用拉曼微光谱还可以在多相固体样品中研究小颗粒。在拉曼光谱各种技术中,显微拉曼光谱已成为最为成熟、应用最为广泛的技术之一。显微拉曼光谱技术是将拉曼光谱分析技术与显微分析技术结合起来的一种应用技术,又称为显微共聚焦拉曼光谱。与其他传统技术

* 通讯作者 Tel:(025)86632807;E - mail:clidc@sina.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

相比,共聚焦显微拉曼光谱更易于直接获得大量有价值的信息,辅以高倍光学显微镜,具有微观、原位、多相态、稳定性好、空间分辨率高等特点,可实现逐点扫描,获得高分辨率的三维图像。

本文建立检测中药中非法添加化学降糖药的显微拉曼光谱方法。经验证,方法简便、快速、准确,可快速检测中成药及保健品中非法添加的降糖类化学成分。

1 仪器与试药

LabRAM HR 800 拉曼光谱仪(法国 HORIBA Jobin Jvon 公司),配有 CCD 数组检测器(512×122 像素)和全息光栅(4×24 微米),仪器分辨率为 4 cm^{-1}。激发光波长可选,分别为 532,633,783.8 nm,激光功率为 70 mW。在 4000~200 cm^{-1} 波数之间进行拉曼光谱扫描,积分时间为 2s。内置可自动切换的光栅,具可选的多种光谱分辨率,大芯片 CCD 探测器;采用针孔共聚焦技术,配置百万像素彩色摄像头,用于观察样品及拍照;可同时观察样品和激光光斑,以精确定位激光激发样品点;具有高稳定性研究级显微镜;物镜:10X(0.25,10.6 mm),50X(0.75,0.37 mm),100X(0.9,0.21 mm),LWD 50X(0.5,10.6 mm),LWD 20X(0.4,12 mm),SL-WD 20X(0.35,24 mm);及 XY 手动样品台。

盐酸二甲双胍(批号 100664-200401)、盐酸苯乙双胍(批号 100922-200701)、格列美脲(批号 100647-200301)、格列本脲(批号 100135-200404)对照品均购自中国药品生物制品检定所。降糖灵胶囊(批号 0804040,0704040)、消渴丸(批号 J00313)等 15 批样品来自市场监督抽样,由江苏省食品药品检验所提供。

2 测定方法

拉曼光谱测定中,先取对照品直接置拉曼显微光学平台上,对采集拉曼光谱的仪器参数进行优化,不同的对照品,优化选择不同的激发波长、照射到样品上的功率和不同的光栅块,进行光谱扫描,得到上述多种降糖化学成分对照品的拉曼光谱图,作为对照光谱。

将样品置拉曼显微光学平台上,显微镜下成像,在一定范围内,根据显微镜下观察点的颜色、背景等不同,逐点寻找非法添加的成分点,尽可能按与测定上述对照品相同的测定条件,分别进行共聚焦激光拉曼扫描,得到各样品的拉曼光谱图,并和上述对照光谱一一比对,根据光谱的相似性和主要特征峰的存在与否,判断样品是否存在上述非法添加的化学成分。

无论是对照品还是样品,所有光谱图均为一次性扫描结果,且未经过光谱平滑化处理。数据处理和图谱标识通过 GRAMS/32 软件程序完成。

使用 Labspec 软件,对荧光背底进行拟合和扣除。

采用建立的拉曼光谱法检出阳性结果的样品,进一步用 HPLC/MS 法分析验证,所采用的实验条件如样品制备方法、色谱条件、质谱条件等可参见文献[5]。

3 结果与讨论

按前述方法,将采集的各对照品光谱作为对照光谱。

采集样品光谱时,为和对照品的对照光谱进行比对,所用的仪器参数理论上应尽可能和对照品光谱采集时一致。但是,激发波长、照射到样品上的功率和不同刻线数的光栅等条件实际上常进行适当的调整,以获得最佳的光谱图,并尽可能避免荧光的干扰。

将采集的样品光谱与上述对照品一一比较,结果表明在上述样品中,有两批降糖宁胶囊(样品 A,批号 0804040;样品 B,批号 0704040)中非法添加了盐酸二甲双胍。因此,本文着重讨论双胍类药物如盐酸二甲双胍、苯乙双胍的拉曼光谱,及其和非法添加该化学成分的样品光谱比对的结果。同时,以常用的格列本脲和格列美脲为例,简单讨论格列类药物的拉曼光谱特征,以便对更多的非法添加药物进行筛选和比对。

3.1 检出非法添加药物的对照品拉曼光谱

图 1-A、B 分别为盐酸二甲双胍、苯乙双胍对照品的拉曼光谱。采集光谱时选定的仪器参数为:激发波长 633 nm,照射到样品上的功率 4~5 mW,光栅 1800 $gr \cdot mm^{-1}$。

图 1-C、D 分别为格列本脲、格列美脲对照品的拉曼光谱。采集光谱时选定的仪器参数为:激发波长 473 nm,照射到样品上的功率 4~5 mW,光栅 1800 $gr \cdot mm^{-1}$。

3.2 非法添加盐酸二甲双胍的样品拉曼光谱

为减少荧光背景的干扰,经反复优化后,对采集样品拉曼光谱时的仪器参数进行了适当调整,具体如下:激发波长 785 nm,照射到样品上的功率 8 mW,光栅 600 $gr \cdot mm^{-1}$,但以此扫描得到的原始拉曼光谱图仍有一定的荧光背景(如图 2 所示),和已得到的对照图谱一一比对,可初步推断出可能非法添加的成分。经去荧光背景后,再和对照图谱一一比对,可以看出样品 A、样品 B 的拉曼光谱与盐酸二甲双胍对照品的拉曼光谱在谱峰位移值、谱带宽、峰形特征等方面均有着较显著的一致性。据此可以判定样品 A、样品 B 中含有盐酸二甲双胍,即两批降糖宁胶囊中非法添加了盐酸二甲双胍,如图 3 所示。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

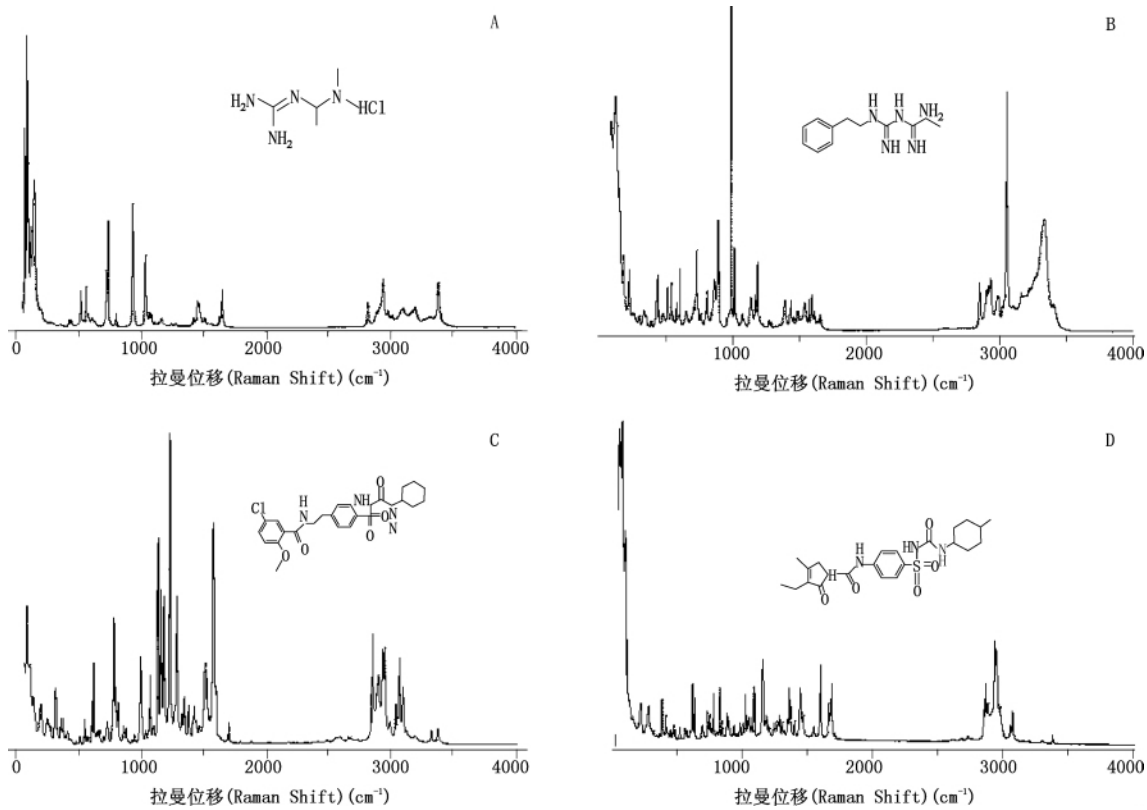

图1 盐酸二甲双胍(A)、苯乙双胍(B)、格列本脲(C)和格列美脲(D)拉曼光谱图

Fig 1 Raman spectra ofmetformin hydrochloride (A), phenformin (B), glibenclamide (C) and glimepiride(D)

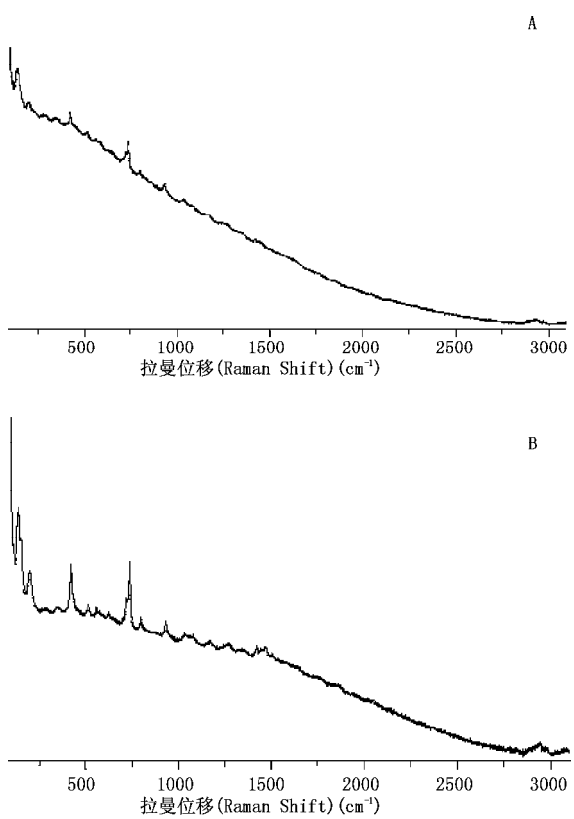

图2 未去荧光背景的样品A和样品B原始拉曼光谱

Fig 2 Ramanspectra of samples A and B without fluorescence removed

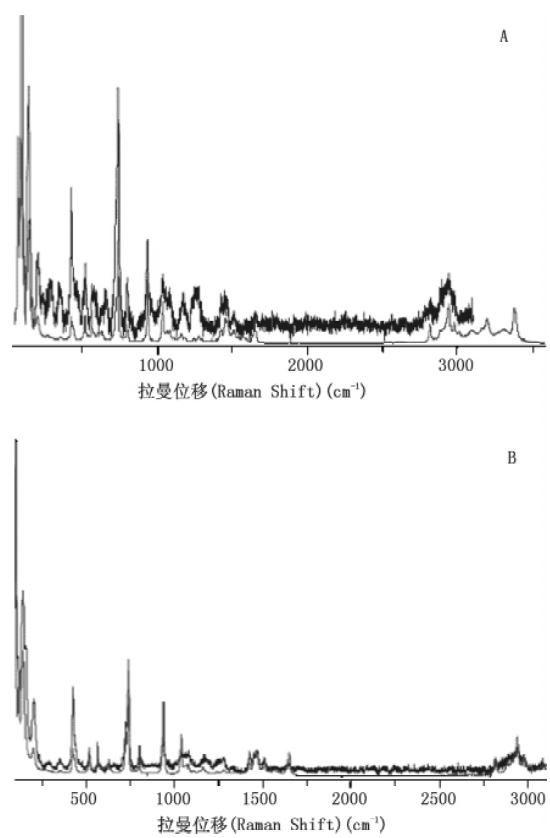

图3 去荧光背景后降糖宁胶囊样品A、样品B与盐酸二甲双胍的比较

Fig 3 The comparison of Raman spectra of Jiangtangning capsule A、B and Metformin hydrochloride after fluorescence removed.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.3 光谱分析

根据采集的拉曼光谱,表1、表2分别列出了双胍类(二甲双胍和苯乙双胍)、本脲类(格列本脲和格列美脲)等典型化学降糖药的主要拉曼峰位移频率及归属。

表1 二甲双胍和苯乙双胍的主要拉曼峰位移频率(cm^{-1})及其归属

Tab 1 Raman peaks frequencies (cm^{-1}) of metformin and phenformin, and their assignments

二甲双胍 (metformin)	苯乙双胍 (phenformin)	归属 (assignment)
3378 m,3310w	3343 s (broad) (宽峰)	νNH_2
3194w,2940 m,2817w	3064 s,2945w,2861w	$\nu_{as}CH + \nu_s CH$
1646w	1606w,1552w	$\delta NH_2 + \nu$ 环(ring)
1444w	1446w,1406w	$\delta CH_2 + \delta CH_3$
1279w,1163w	1204 m,1178w,1151w	$\nu C-N + \delta CH_2$
1036 m	1032 m	$\nu C-N$
	1003 s	Ring breathing(环呼吸)
938 s	903 s	$\delta CH_2/\delta CH_3$
	878 m	δNH_2
799w,737 s	824w,746 m	$\delta CH + \nu CC + NH$
624w,562 m, 518 m,429 m	622w,557w, 527w,450w	Ring deformation(环变形) + CH bending(弯曲) + mixed vibration(混合振动)

表2 格列本脲和格列美脲的主要拉曼峰位移频率(cm^{-1})及其归属

Tab 2 Raman peaks frequencies (cm^{-1}) of glibenclamide and glimepiride, and their assignments

格列本脲 (glibenclamide)	格列美脲 (glimepiride)	归属 (assignment)
3372w,3319w	3371w,3290vw	νNH_2
3071 m,2952 s,2858 s	3066 m,2933vs,2859 m	$\nu_{as}CH + \nu_s CH$
1715w	1741vw	$\nu C=O$
	1677 s	$\delta NH_2 + /\nu$ 环(ring)
	1664 m	$\nu C=C$
1594 s	1594 s	ν 环(苯环等)(benzene ring et al.)
1529 m	1543w	δNH(酰胺Ⅱ带)(amide II band)
1441w	1441 m	$\delta CH_2 + \delta CH_3 + \nu$ 环(ring)
1399w	1397m	νCN(酰胺Ⅲ带)(amide III band)
1368w	1363 m	$\nu CN + \delta CH_2 + \delta CH_3$
1305 s	1307w	$\nu_{as}SO_2 + \nu C-N$
1249vs	1282w	$\nu_s SO_2 + \nu C-N$
1202 s,1182 m	1203w,1181w	$\nu CO + \nu C-N$
1156 s,1095 m	1153 s,1086 m	νCO
1019 m	1023 m	Ring breathing(环呼吸)
907w	881 m	$\delta CH_2/\delta CH_3$
841w,810 m,753w	844w,823 m,780 m	CH bending out of plane(平面外弯曲) + $\nu CC + \delta NH_2 + \delta NH$
648 m,634w,564w	627w,616 s,414w	Ring deformation(环变形) + CH bending(弯曲) + mixed vibration(混合振动)

盐酸二甲双胍和盐酸苯乙双胍除含有相同的双胍基本单元外,结构中有不同的基团,前者为1,1-二甲基双胍盐酸盐,分子中有一个双胍单元,一个叔胺基和两个与叔胺基相连的甲基,后者为1,-(2-苯乙基)双胍盐酸盐,分子中除双胍单元外,有一个与仲胺相连的苯乙基,但是没有叔胺基。表1列出上述两个化合物拉曼位移频率以及各对应峰的归属,可以看出两者主要峰的拉曼位移频率相似,且各对应峰的归属也相同。但是,仍有一些明显可区分之处,在3194~2817 cm^{-1}范围的峰可归属ν_{as} CH或/和ν_sCH的振动,但盐酸苯乙双胍在3064 cm^{-1}处非常强的峰应是由与苯环上ν_1 =CH的振动引起的;在1646~1552 cm^{-1}范围的峰应归属于V_2 NH_2振动,但同样由于苯环存在,盐酸苯乙双胍在此区域的峰应含有ν_3环C=C振动的贡献。盐酸苯乙双胍与盐酸二甲双胍最特征的区别是前者在1002 cm^{-1}呈现非常强的拉曼散射峰,这是典型的环呼吸振动,而盐酸二甲双胍分子中没有苯环,可作为区别两个化合物最有效的依据。

格列本脲和格列美脲均具有磺酰脲的基本结构,比较两者的拉曼光谱,可以看到在主要拉曼峰位移频率方面两者有一定的相似性,但是又各有特征性的散射峰相互区别,如在3372 cm^{-1}~3290 cm^{-1}范围的峰均可归属为NH的伸缩振动;CH对称或不对称振动峰相对较强,C=O伸缩振动峰相对弱;和格列本脲相比,格列美脲在1677 cm^{-1}和1664 cm^{-1}出现两个较强的峰,可能是苯环与杂环共同贡献的结果,以上这些峰的强度和变化是区别两者的重要信息。归属于SO_2不对称和对称伸缩振动和C-N伸缩振动的峰,格列本脲均有较强的峰,而格列美脲的峰相对较弱,这一差异也有助于对两者进行区别比较。另一个不同之处,格列本脲的C-O振动在1200 cm^{-1}左右有强峰,而格列美脲的相应峰相对较弱,这个差异可从结构上给予解释,因为前者除C=O外,还有C-O-C键,而后者仅有C=O键,所以CO伸缩振动的峰强度较弱。以上是对格列本脲与格列美脲的简单解析和比较,如果有更多的磺酰脲类药物也可以用类似的方法进行比较。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4 小结

4.1 化学降糖药种类很多,本文着重研究了最为多见的非法添加的化学降糖药双胍和磺酰两大类中的几种。近年来,非法添加的手段不断变化,添加化学降糖药的种类也在变化中。因此,为保证非法添加检测的可靠性,要尽可能建立涵盖各种对照品的拉曼光谱库。

4.2 荧光干扰是拉曼光谱的主要缺点之一。采用共聚焦显微拉曼检测时,仅选择化学添加物的微粒进行检测,虽然可减少中药基质的干扰,但并不能完全消除荧光干扰。可采用消除荧光的光谱处理技术,必要时,也可采用特殊的,如表面增强拉曼光谱等技术以消除荧光并增加检测灵敏度。本研究中通过选择合适的激发波长,并使用 Labspec 软件,对荧光背底进行拟合和扣除。

4.3 在进行红外光谱或拉曼光谱的振动信息解析时,通常多关注 400 ~ 4000 cm^{-1} 范围的光谱峰,值得注意的是,在以上几种化学降糖药的拉曼光谱的低波数范围,也有较丰富的拉曼光谱峰,如进行更准确的结构确证,可深入解析这些峰的归属。同时,也可借助这些低波数的峰进行鉴别比较。

致谢:感谢法国 HORIBA Jobin Yvon 公司和美国 Thermo Nicolet 公司为开展本研究工作提供了必需的仪器和良好的协助。

参考文献

1 YANG Cai - feng(杨彩凤),CAO Qian(曹茜). Research advance in syndrome pattern of traditional chinese medicine of type Ⅱ diabetes (Ⅱ型糖尿病中医证候研究进展). *J Tianjin Univ TCM*(天津中医药大学学报),2008,27(2):106

2 ZHANG Mei - wen(张美雯),XU Jiang - hong(许江红),ZHANG Ruo - liang(张若良). Detection of phenformin hydrochloride added to Xiaokeling Tablets by TLC and HPLC(TLC、HPLC 法检查消渴灵片中加入盐酸苯乙双胍). *Jiangxi J TCM*(江西中医药),2008,37(12):80

3 ZHANG Zhe(张喆),GAO Qing(高青),YU Qian(余倩),*et al*. Detection of anti - diabetic agents in traditional Chinese medicines and health care products by HPLC - MS/MS(中药制剂及保健品中违禁添加 9 种化学降糖药的 HPLC - MS/MS 定性检测). *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志),2007,38(1):39

4 CHEN Xian - long(程显隆),LIU Hui(刘卉),XIAO Xin - yue(肖新月),*et al*. HPLC - DAD - MS detection of rosiglitazone mixed illegally into traditional Chinese medicinal antidiabetic preparation and shell of capsules of traditional Chinese medicinal antidiabetic preparation (HPLC - DAD - MS 联用法检测中药降糖制剂及胶囊壳中非法添加罗格列酮的研究). *Chin J Pharm. Anal*(药物分析杂志),2007,27(9):1325

5 LUO Jiang - nan(罗疆南),CAO Ling(曹玲),TAN Li(谭力),*et al*. Determination of 11 anti - diabetics mixed illegally into traditional Chinese medicines and health care products by HPLC - MS/MS (HPLC - MS/MS 检测中药及保健品中添加的 11 种降糖类化学药物). *Chin Pharm J*(中国药学杂志),2010,45(11):862

(本文于 2010 年 8 月 30 日收到)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net