

· 论著 ·

## 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

张彬彬<sup>1</sup>, 史毅<sup>2</sup>, 陈辉<sup>3</sup>, 朱青霞<sup>4</sup>, 陆峰<sup>1</sup> (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 吉林大学中日联谊医院, 吉林长春 130033; 3. 上海迪亚凯特生物医药科技有限公司, 上海 200070; 4. 上海交通大学附属第九人民医院, 上海 201999)

**[摘要]** 目的 建立一种薄层色谱-表面增强拉曼光谱法对染色掺伪的西红花进行检测。方法 将乙醇溶液润湿的西红花按压在表面喷有银溶胶的薄层板上, 然后对按压区域进行表面增强拉曼散射(SERS)检测。依次对润湿剂的浓度、银溶胶的喷洒时间和喷洒量等因素进行优化。结果 成功检测经金胺 O、新品红、柠檬黄和胭脂红 4 种常见染料染色的西红花药材。结论 薄层色谱-表面增强拉曼光谱法可实现对染色西红花简单、快速、灵敏的检测要求, 并满足现场快速检测的需求。

**[关键词]** 薄层色谱; 表面增强拉曼光谱; 西红花; 染色掺伪; 金胺 O; 新品红; 柠檬黄; 胭脂红

**[中图分类号]** R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)03-0215-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.006

## TLC-SERS for detection of the dyed Croci Stigma

ZHANG Binbin<sup>1</sup>, SHI Yi<sup>2</sup>, CHEN Hui<sup>3</sup>, ZHU Qingxia<sup>4</sup>, LU Feng<sup>1</sup> (1. Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Orthopedics, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, China; 3. Shanghai DiaCartra Biomedical LLC, Shanghai 200070, China; 4. Department of Pharmacy, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai 201999, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a thin layer chromatography-surface-enhanced Raman scattering (TLC-SERS) method for the detection of dyed Croci Stigma. **Method** The dyed Croci Stigma was wetted by ethanol and pressed on TLC plate sprayed with Silver sol. The pressed zone was immediately detected by a portable Raman spectrometer. Factors including the concentration of ethanol, spraying time and amount of silver sol were investigated and optimized. **Results** The dyed Croci Stigma, stained by auramine O, new fuchsin, tartrazine and brilliant ponceau were successfully detected using the established method. **Conclusion** The combination of TLC and SERS technology provides a rapid, simple and sensitive detection method which is suitable for quick field tests.

**[Key words]** TLC; SERS; Croci Stigma; dyeing adulteration; auramine O; new fuchsin; tartrazine; brilliant ponceau

近年来,随着药材市场的发展,中药材及中药饮片掺伪造假的现象屡见不鲜,常见的造假方法包括增重、掺伪、染色等,其中非法染色,以假乱真的现象尤为突出<sup>[1]</sup>。《中国药典》2015年版一部规定:西红花为鸢尾科植物番红花的干燥柱头。西红花是一种名贵的中药材和常见的香料,具有强大的生理活性<sup>[2]</sup>,其价格昂贵,使得不法商贩选用便宜易得的染料对黄花菜、草苗、丝状化学纸浆等其他物质加工染色,制成伪品。所使用染料多为非食用色素,具有致畸性和致癌性,接触或长期服用这些染色药材,会损伤人体脏器,严重的甚至威胁到人们的生命安全。因此,建立对染色西红花快速、准确、灵敏的检测方

法,其意义十分重大。

目前,国内外对染色中药材及饮片的鉴别方法有很多,包括一般经验和理化性质鉴别<sup>[3]</sup>、光谱法<sup>[4]</sup>、色谱法及其联用方法<sup>[5-7]</sup>等。其中一般经验和理化性质鉴别,虽然简单易行,但其准确度低。高效液相色谱法(HPLC法)及其联用技术灵敏、准确度高但该类方法的成本高,样品前处理烦琐,不适合现场快速检测。光谱法,尤其是拉曼光谱法,因其简单、快速、灵敏等优点,使其在染色中药材及饮片的快速检测方面展现出巨大优势<sup>[8-10]</sup>。

本文选用表面喷洒银溶胶的薄层板作为表面增强拉曼散射(SERS)基底,采用原位检测的方式,对金胺 O、新品红、柠檬黄和胭脂红 4 种常见染料染色的西红花进行快速、灵敏和专属的检测,依次考察和优化了润湿剂的浓度、银溶胶喷洒时间和喷洒量等因素,以期建立对染色西红花快速、准确的鉴别方法,满足现场快速检测的需求,有效遏制造假行为,

**[作者简介]** 张彬彬,硕士研究生,研究方向:新分析方法的研发。Email:binzhgb168@163.com

**[通讯作者]** 陆峰,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药质量控制和化学计量学研究。Email:fenglufeng@hotmail.com

保障人民群众的用药安全。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司,型号:BSA124S-CW,精度:0.000 1 g);便携式拉曼光谱仪(B&W Tek Inc. USA,型号:BWS415-785H),激发波 785 nm,分辨率  $3\text{ cm}^{-1}$ ,光谱范围  $175\sim 2\,700\text{ cm}^{-1}$ ;数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,型号:KQ-250DB);紫外分析仪(上海精科实业有限公司,型号:WFH203B);喷洒装置(上海泰坦科技股份有限公司,体积 50 ml)。

**1.2 试剂** 硝酸银、柠檬酸钠和无水乙醇均为分析纯(上海国药集团化学试剂有限公司);薄层板(山东烟台江友硅胶开发有限公司,型号:HSGF<sub>254</sub>,规格:2.5 cm×10 cm);金胺 O、新品红、柠檬黄和胭脂红均为分析标准品(阿拉丁生化试剂有限公司);西红

花(北京同仁堂,产地:浙江杭州);实验用水均为蒸馏水。

## 2 方法与结果

**2.1 染色西红花的制备** 分别取金胺 O、新品红、柠檬黄和胭脂红粉末各 3.0 mg,加 70% 乙醇 3 ml 超声溶解;即得质量浓度为 1.0 mg/ml 的 4 种染料标准溶液,其余浓度溶液通过逐级稀释获取。取适量西红花进行染色,染色后烘干备用。

### 2.2 喷洒法制备薄层 SERS 基底

**2.2.1 Lee 法<sup>[8]</sup>制备银溶胶** 称取硝酸银 45 mg,置于 250 ml 三颈烧瓶中,加入 250 ml 蒸馏水,加热至沸腾状态时,逐滴加入 1% 柠檬酸钠溶液 5 ml 并持续沸腾 60 min,冷却至室温后置于棕色瓶中避光保存。Lee 法制备银溶胶的紫外吸收谱和扫描电镜结果,见图 1。

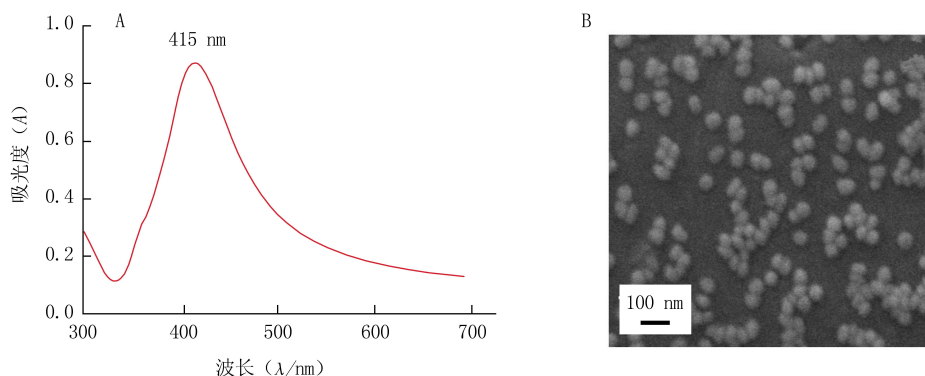


图 1 银溶胶的紫外吸收图(A)和扫描电镜图(B)

**2.2.2 薄层 SERS 基底的制备** 利用喷洒装置,在商用薄层板表面喷洒上述银溶胶 10  $\mu\text{l}$ ,制备成薄层 SERS 基底。

### 2.3 薄层 SERS 基底制备条件的考察与优化

**2.3.1 喷胶时间的考察和优化** 为研究不同喷胶时间对 SERS 检测的影响,以金胺 O (1.0 mg/ml) 为探针分子,分别考察了金胺 O 溶液滴加于薄层板前喷胶和滴加于薄层板后再喷胶这两种方式对 SERS 增强效果的影响。选用金胺 O 在  $778\text{ cm}^{-1}$  处的光谱峰作为特征峰,结果如图 2 所示,染料滴加于薄层板前喷洒银胶的 SERS 强度明显大于染料滴加于薄层板后再喷洒银胶的 SERS 强度。

**2.3.2 喷胶量的考察和优化** 以金胺 O (1.0 mg/ml) 为探针分子对喷胶量进行考察,取 1  $\mu\text{l}$  金胺 O 溶液点于 5 种新制备的不同喷胶量的薄层 SERS 基底上,点样区立即进行 SERS 检测,结果见图 3。如图所示:9  $\mu\text{l}$  内随着喷胶量的增加,基底的

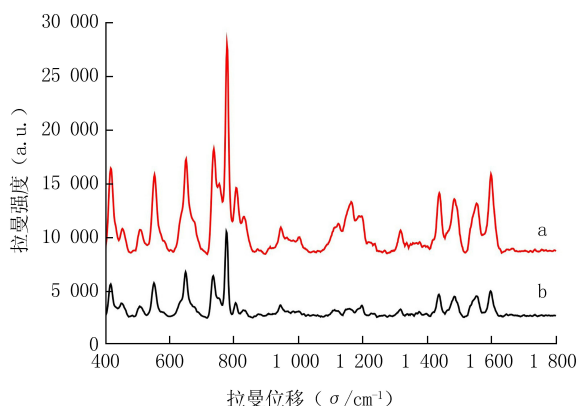


图 2 不同喷胶时间的 SERS 增强效果图

a.先喷胶后加样;b.先加样后喷胶

增强效果递增;而当喷胶量达到 12  $\mu\text{l}$  及以上时,增强效果开始逐渐减弱。

**2.4 润湿剂浓度的选择** 取 1.0 mg/ml 金胺 O 溶液染色的西红花,滴加 20%、40%、60%、80% 及

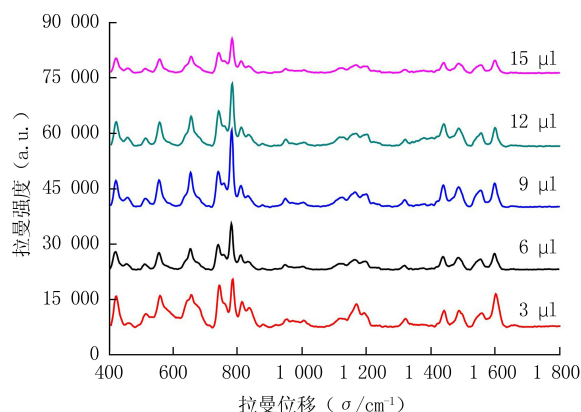


图3 不同喷胶量对 SERS 增强效果图

100% 乙醇溶液 50  $\mu\text{l}$  润湿,然后按压于薄层 SERS 基底上进行 SERS 检测;选用  $778\text{ cm}^{-1}$  处的特征峰强度作为标准比较检测结果,结果见图 4。如图所示,随着乙醇浓度的增加,SERS 信号的强度先增强后减弱,浓度为 40% 时的 SERS 信号最强。

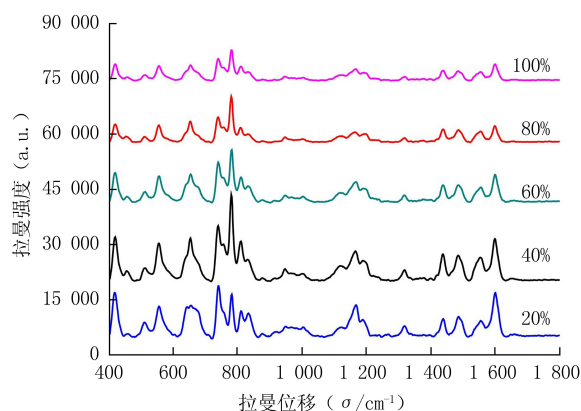


图4 不同浓度乙醇溶液作润湿试剂的 SERS 增强效果图

**2.5 染色西红花的 SERS 检测** 采用薄层色谱-表面增强拉曼光谱法检测市售西红花药材,检测结果见图 5,市售西红花检测所得光谱与空白薄层板光谱几乎完全相同。将 1.0 mg/ml 金胺 O、新品红、柠檬黄和胭脂红标准溶液 1  $\mu\text{l}$ ,滴加到上述薄层 SERS 基底上,立即对滴加区进行 SERS 检测,从而得到染料的标准 SERS 图谱。然后,检测 4 种不同浓度染料染色的西红花。检测方式如上所述,所得图谱如图 6 所示,染色后西红花的 SERS 图谱与染料的标准 SERS 图谱几乎完全相同。

### 3 讨论

**3.1 银溶胶及薄层 SERS 基底的紫外表征** 如图 1 所示,银溶胶溶液在 415 nm 处呈现银纳米粒子的特征吸收峰<sup>[9,10]</sup>。且由扫描电镜图可清晰地看出,

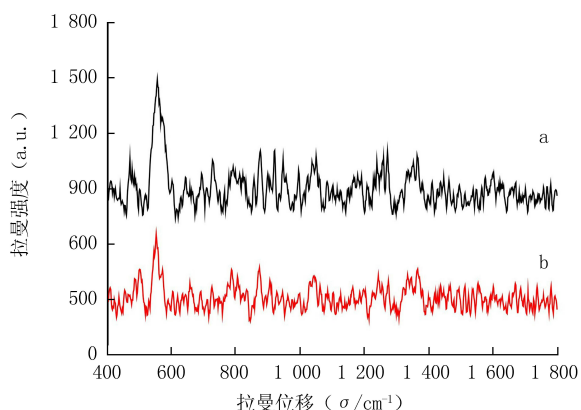


图5 薄层 SERS 基底的空白光谱和未染色西红花的 SERS 检测结果  
a.未染色西红花;b.薄层 SERS 基底

该银粒子主要以球体为主,粒径在 50 nm 左右。

**3.2 薄层 SERS 基底喷胶时间的选择** 由图 2 可知,染料滴在薄层板前喷洒银溶胶的 SERS 增强效果明显好于染料滴在薄层板后再喷洒银溶胶的效果,其原因可能是先滴加染料于薄层板上,再喷洒银溶胶,银溶胶会将滴加的染料全部覆盖,导致信号差或者无信号,而先喷洒银溶胶再滴加染料溶液,染料溶液可渗透到银溶胶空隙中,拉近染料分子和银纳米粒子的距离,从而使 SERS 信号增强。

**3.3 薄层 SERS 基底喷胶量的选择** 薄层 SERS 基底的 SERS 增强效果随着喷胶量的增加先递增后减弱。其原因是:随着喷胶量的增加,纳米粒子先是均匀分散于 TLC 板表面,当纳米粒子过多时,纳米粒子发生堆积,堆积的纳米粒子不利于“SERS 热点”的形成,导致 SERS 增强效果减弱。

**3.4 润湿试剂浓度的选择** 根据“动态表面增强拉曼散射”的原理<sup>[11]</sup>,检测过程中溶剂过度挥发会导致 SERS 信号减弱甚至丢失,乙醇浓度越高,在润湿和检测过程中乙醇挥发也越快,因此,选择 40% 乙醇溶液作为润湿试剂。

**3.5 染色西红花的鉴别** 如图所示,通过特征峰的比对可快速判断药材染色所用的染料类型。经 0.01 mg/ml 染料染色后的西红花无颜色变化,但其染料的 SERS 特征峰仍清晰可见,因此最低检测浓度可满足实际检测的需求。

### 4 结论

经过对薄层板喷胶时间、喷胶量以及润湿试剂的浓度等因素进行考察和优化后,本研究采用薄层色谱-表面增强拉曼光谱法成功鉴别了 4 种常用染料染色的西红花;此外,当染料浓度低至

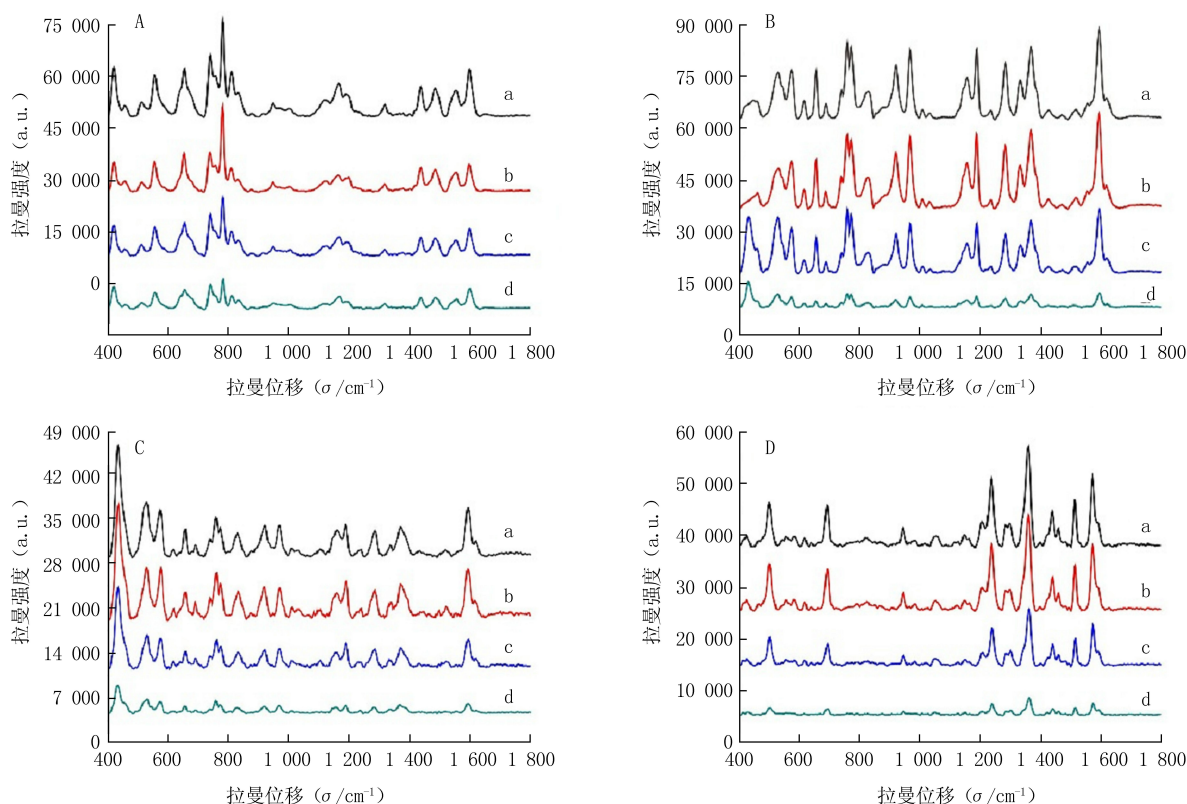


图6 4种染料的标准图谱及染色西红花的SERS检测结果

A.金胺 O;B.柠檬黄;C.新品红;D.胭脂红;a.标准图谱;  
b,c,d分别对应浓度为1.0、0.1、0.01 mg/ml的染料染色后的西红花的拉曼光谱图

0.01 mg/ml时(此浓度染料溶液的颜色已经不可见),其染色后的西红花中染料的特征图谱仍清晰可见,由此可知该方法满足实际检测的需求,这一结论使得薄层色谱-表面增强拉曼光谱法在中药材掺伪染色检测中具有非常广阔的前景。

#### 【参考文献】

- [1] 付凌燕, 闵春艳, 汪祺, 等. 市售西红花药材掺伪染色检测方法的实验研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 74-77.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 57.
- [3] 刘义梅, 陈科力. 当前中药材市场几种常见假劣药形式[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(8): 1089-1092.
- [4] Di Anibal CV, Marsal LF, Callao MP, *et al.* Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate analysis as a screening tool for detecting Sudan I dye in culinary spices [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2012, 87(4): 135-141.
- [5] 饶伟文, 蒋玲, 赵纯玉, 等. 几种染色掺伪中药的化工染料鉴定[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11): 1742-1745.
- [6] 莫连峰, 饶伟文, 赵纯玉, 等. 高效液相色谱法测定染色黄芩中金胺的含量[J]. 中国药业, 2007, 16(15): 29-30.
- [7] Fukuji TS, Castro PM, Tavares MM, *et al.* Fast determination of Sudan dyes in chilli tomato sauces using partial filling micellarelectrokinetic chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(22): 11903-11909.
- [8] 李丹, 汪冰, 李晓, 等. 表面增强拉曼光谱法快速鉴别非法染色的关黄柏药材[J]. 药学研究, 2015, 34(4): 202-205.
- [9] 郑滨兴, 吕迪亚, 方芳, 等. 基于整体柱的表面增强拉曼光谱法检测非法染色青黛[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(5): 426-428.
- [10] 李丹, 吕狄亚, 陈辉, 等. 纸基-表面增强拉曼光谱法检测染色掺伪的红花药材[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(8): 1466-1470.
- [11] 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.
- [12] 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, 2011, 31(12): 2352-2255.
- [13] Kerker M, Siiman OS, Wang D. Effect of aggregates on extinction and surface-enhanced Raman scattering spectra of colloidal silver [J]. *J Phys Chem*, 1984, 88(15): 3168-3174.
- [14] Liu H, Yang Z, Meng L, *et al.* Three-dimensional and time-ordered surface-enhanced Raman scattering hotspot matrix [J]. *Am Chem Soc*, 2014, 136(14): 5332-5341.

【收稿日期】 2017-02-11 【修回日期】 2017-03-31

【本文编辑】 顾文华