

表面增强拉曼技术检测唾液中盐酸二甲双胍

张高苗, 郑天阔, 陈 伟

宜宾学院过程分析与控制四川省高校重点实验室, 四川 宜宾

Email: 1508941625@qq.com

收稿日期: 2021年4月4日; 录用日期: 2021年4月19日; 发布日期: 2021年5月6日

摘 要

为降低糖尿病患者用药安全隐患, 本文利用金纳米表面增强拉曼散射效应, 使用785 nm便携式拉曼光谱仪, 旨在建立一种表面增强拉曼技术检测唾液中盐酸二甲双胍含量的方法。实验选取200~1000 cm^{-1} 的光谱波段, 收集不同浓度盐酸二甲双胍表面增强拉曼谱图, 将其特征峰强度与盐酸二甲双胍浓度进行线性拟合, 两者具有较好的相关性。故而, 利用金纳米粒子表面增强拉曼技术定量检测唾液中盐酸二甲双胍含量的方法具有一定的可行性, 且能为糖尿病患者治疗期间提供新的药物监测方法, 以便为患者制定个性化的给药方案。

关键词

表面增强拉曼技术, 盐酸二甲双胍, 唾液

Rapid Determination of Metformin Hydrochloride in Saliva by Surface Enhanced Raman Spectroscopy

Gaomiao Zhang, Tiankuo Zheng, Wei Chen

Key Lab of Process Analysis and Control of Sichuan Universities, Yibin University, Yibin Sichuan

Email: 1508941625@qq.com

Received: Apr. 4th, 2021; accepted: Apr. 19th, 2021; published: May 6th, 2021

Abstract

In order to reduce the safety risk of drug use in diabetic patients, this paper uses the gold nano surface to enhance the Raman scattering effect, using 785 nm portable Raman spectrometer, aims

to establish a surface-enhanced Raman technology to detect the content of metformin hydrochloride in saliva. The spectral band of 200 to 1000 cm^{-1} was selected to collect different concentrations of metformin hydrochloride surface enhancement Raman spectra, and linearly fitted the characteristic peak strength with the concentration of metformin hydrochloric acid, which had a good correlation. Therefore, the method of quantitatively detecting the content of metformin hydrochloride in saliva using gold nanoparticle surface enhancement Raman technology is feasible, and can provide a new drug monitoring method during the treatment of diabetic patients, so as to develop personalized drug administration plan for patients.

Keywords

Surface Enhanced Raman Spectroscopy, Metformin Hydrochloride, Saliva

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近年来,随着生物信息技术的进步,唾液作为一种容易采集且无损伤性的体液进入了人们的研究视角。唾液中含有大量的蛋白质和人体代谢产物,其中某些蛋白质与血液中影响老年痴呆症、乳腺癌和糖尿病等疾病中蛋白质相匹配[1] [2] [3] [4]。研究表明,糖尿病可以通过对唾液成分的分析进行初步诊断[5]。其中,常用于治疗II型糖尿病及胰岛素治疗患者的盐酸二甲双胍降糖药能有效降低糖化血红蛋白[6]。但服用量超过一定范围时容易导致患者乳酸性酸中毒、消化不良、损伤肝肾,严重的可引起加重酮症酸中毒。因此,在治疗过程中根据个体差异,制定个体化给药方案,并对用药效果进行监测至关重要。

目前,糖尿病用药的主要监测方法是高效液相色谱法,但该方法需要复杂的预处理,分析成本高,所需时间长,专业操作技能要求较高,导致检测过程极难达到快速、连续的监测[5]。且盐酸二甲双胍药物动力学表明,其药物结构稳定,很少与血浆蛋白结合,在唾液中的浓度约为血药浓度的2倍。因此,可以通过表面增强拉曼技术对唾液中盐酸二甲双胍含量进行药物监测[7]-[12]。本实验通过对不同浓度盐酸二甲双胍与特征峰强度关系的普通拉曼谱图及表面增强拉曼谱图的分析,旨在建立一种表面增强拉曼技术检测唾液中盐酸二甲双胍含量的方法,使其可应用于患者基数庞大的糖尿病患者日常药物监测中。

2. 实验部分

2.1. 实验仪器及药品

便携式拉曼光谱仪(广州标旗)、超声波震荡仪(江苏昆山)、台式高速离心机(盐城安信)、比色皿、移液枪。

蒸馏水、金纳米溶胶、盐酸二甲双胍片(北京中惠)。

2.2. 实验方法

刮去药片外层糖衣,用研钵研磨成粉末,并过50目筛。配置一定浓度药物溶液放入超声波震荡仪促溶,等待冷却得到样品。

测试前调节便携式拉曼光谱仪参数,激发波长785 nm,积分时间1 s,平均次数1次,平滑宽度2,测试范围0~4000 cm^{-1} ,功率500 mw,扣除背景。

测试时, 将待测溶液注入比色皿检测得普通拉曼谱图; 使用移液枪注入 400 μL 金纳米溶胶与待测溶液混合在相同条件下扫描, 得表面增强拉曼谱图。

3. 结果与分析

3.1. 盐酸二甲双胍的普通拉曼谱图分析

图 1 为固体与不同浓度盐酸二甲双胍的普通拉曼谱图对比, 其中黑色曲线为盐酸二甲双胍固体, 可以明显观察到在 254.16 cm^{-1} 、356.85 cm^{-1} 、424.25 cm^{-1} 、474.23 cm^{-1} 、513.87 cm^{-1} 、553.23 cm^{-1} 、642.62 cm^{-1} 、729.89 cm^{-1} 、789.54 cm^{-1} 、851.58 cm^{-1} 、891.51 cm^{-1} 、934.16 cm^{-1} 处有一系列谱峰。图 2 为不同浓度盐酸二甲双胍之间的普通拉曼谱图对比, 由于在固态和水溶液状态下各基团频率的贡献不一样, 个别特征峰发生较小的错位, 如固体盐酸二甲双胍中的 729.89 cm^{-1} 处特征峰与盐酸二甲双胍溶液中的 704.57 cm^{-1} 处特征峰。

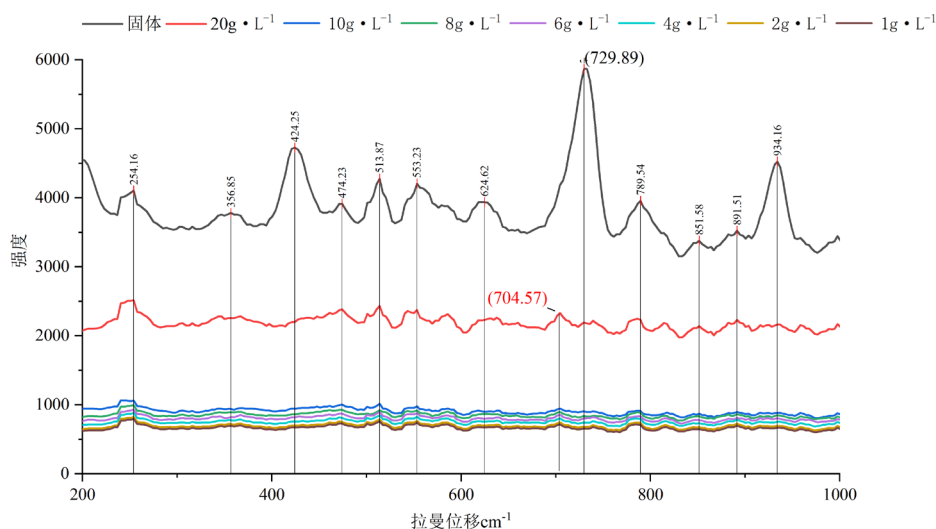


Figure 1. A common Raman spectrogram of solids and different concentrations of metformin hydrochloride

图 1. 固体盐酸二甲双胍与不同浓度盐酸二甲双胍普通拉曼谱图对比

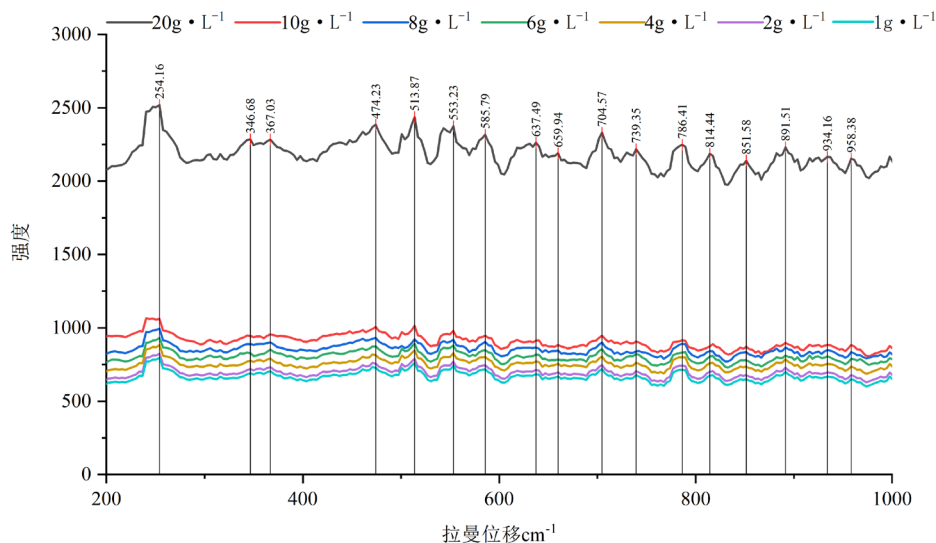


Figure 2. Comparison of Raman spectra of metformin hydrochloride with different concentrations

图 2. 不同浓度盐酸二甲双胍之间的普通拉曼谱图对比

参考相关文献[13] [14] [15], 结合图 3 盐酸二甲双胍机构式解析普通拉曼光谱特征峰, 结果见表 1。

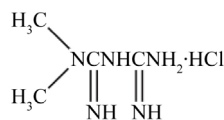


Figure 3. Structural formula of metformin hydrochloride

图 3. 盐酸二甲双胍结构式

Table 1. Resolution of common Raman spectrum characteristic peaks of solid metformin hydrochloride and metformin hydrochloride solution

表 1. 固体盐酸二甲双胍与盐酸二甲双胍溶液普通拉曼光谱特征峰解析

固体盐酸二甲双胍	盐酸二甲双胍溶液	特征峰解析
254.16 cm ⁻¹	254.16 cm ⁻¹	C-C 扭摆
356.85 cm ⁻¹ 、424.25 cm ⁻¹ 、474.23 cm ⁻¹ 、	346.68 cm ⁻¹ 、367.03 cm ⁻¹ 、474.23 cm ⁻¹	C-N-C 骨架变形
642.6 cm ⁻¹ 、729.89 cm ⁻¹ 、789.54 cm ⁻¹	637.49 cm ⁻¹ 、659.94 cm ⁻¹ 、704.57 cm ⁻¹ 、 739.35 cm ⁻¹ 、786.41 cm ⁻¹ 、814.44 cm ⁻¹	叔胺骨架伸缩
934.16 cm ⁻¹ 、	934.16 cm ⁻¹	对称的 C-N-C 伸缩

3.2. 盐酸二甲双胍的表面增强拉曼谱图分析

在盐酸二甲双胍浓度为 1000 μg·L⁻¹ 时, 其普通拉曼信号十分微弱, 为进一步获得较低浓度下盐酸二甲双胍的拉曼信号, 利用金纳米溶胶的表面增强拉曼散射效应, 采集较低浓度的盐酸二甲双胍的表面增强拉曼谱图。

取 2 mL 蒸馏水于比色皿中, 再用移液枪注入 400 μL 金纳米溶胶混合均匀进行扫描, 得到金纳米溶胶本身表面增强拉曼信号, 由图 4 红色曲线可知, 对于金纳米溶胶本身拉曼信号十分微弱, 对实验干扰性较小。

如图 4 所示, 黑色曲线为盐酸二甲双胍标准溶液(1000 μg·L⁻¹)表面增强拉曼谱图, 由图可知, 在 254.16 cm⁻¹、346.68 cm⁻¹、377.17 cm⁻¹、470.90 cm⁻¹、513.87 cm⁻¹、553.23 cm⁻¹、585.79 cm⁻¹、618.16 cm⁻¹、637.49 cm⁻¹、659.94 cm⁻¹、704.57 cm⁻¹、739.35 cm⁻¹、783.29 cm⁻¹、817.54 cm⁻¹、845.40 cm⁻¹、882.32 cm⁻¹、937.19 cm⁻¹ 有一系列的拉曼特征峰。其中 254.16 cm⁻¹ 为 C-C 扭摆, 346.68 cm⁻¹、377.17 cm⁻¹、470.90 cm⁻¹ 为 C-N-C 骨架变形, 659.94 cm⁻¹、704.571 cm⁻¹、739.35 cm⁻¹、783.29 cm⁻¹ 为叔胺骨架伸缩, 937.19 cm⁻¹ 为对称的 C-N-C 伸缩, 其中 704.57 cm⁻¹ 信号较强, 将其用于后续定量检测分析。

3.3. 盐酸二甲双胍的定量分析

为证明表面增强拉曼技术用于盐酸二甲双胍定量分析的可行性和准确性, 本文进一步采集了不同浓度的盐酸二甲双胍的表面增强拉曼谱图。以 1 g·L⁻¹ 的盐酸二甲双胍溶液为标准溶液, 依次稀释配制 1000 μg·L⁻¹、800 μg·L⁻¹、600 μg·L⁻¹、400 μg·L⁻¹、200 μg·L⁻¹、100 μg·L⁻¹ 的盐酸二甲双胍标准溶液。取 2 mL 配置好的盐酸二甲双胍标准溶液于比色皿中, 再用移液枪注入 400 μL 金纳米溶胶混合均匀进行扫描, 得盐酸二甲双胍表面增强拉曼谱图。如图 5(a)可知, 随着盐酸二甲双胍浓度的降低, 特征峰强度也随之降低。当浓度为 200 μg·L⁻¹ 时仍可明显观察到特征峰。表明表面增强拉曼技术最低检测浓度为 200 μg·L⁻¹,

具有较高的灵敏度。

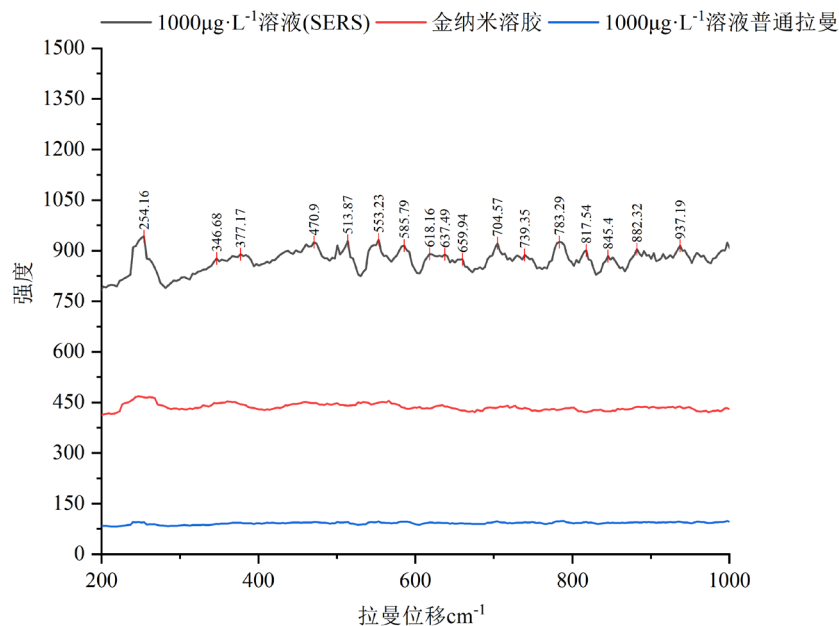
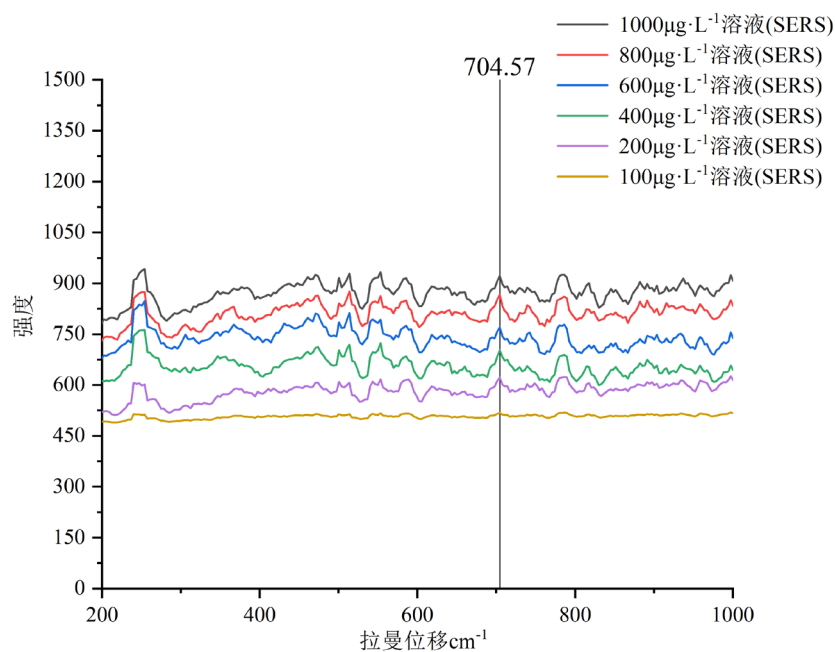


Figure 4. The common Raman spectrogram of metformin hydrochloric acid is compared with the enhanced Raman spectrometry

图 4. 盐酸二甲双胍的普通拉曼谱图与增强拉曼谱图对比

根据拉曼位移为 704.57 cm^{-1} 处叔胺骨架伸缩特征峰强度，对盐酸二甲双胍进行定量分析。如图 5(b) 所示，在 $200 \sim 1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内，其浓度与特征峰强度具有相关系数为 0.94 的线性关系，表明该方法适用于盐酸二甲双胍的定量分析。



(a)

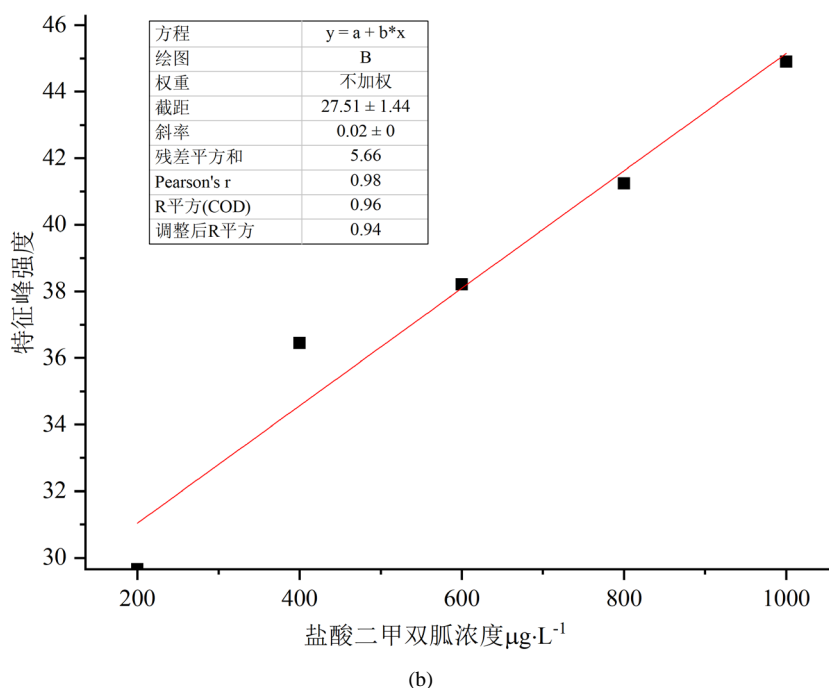


Figure 5. (a). Surface-enhanced Raman spectra of metformin hydrochloride; (b) Relationship between concentration and intensity of characteristic peak (704.57 cm^{-1})

图 5. (a) 盐酸二甲双胍的表面增强拉曼谱图; (b). 盐酸二甲双胍浓度与特征峰强度的关系

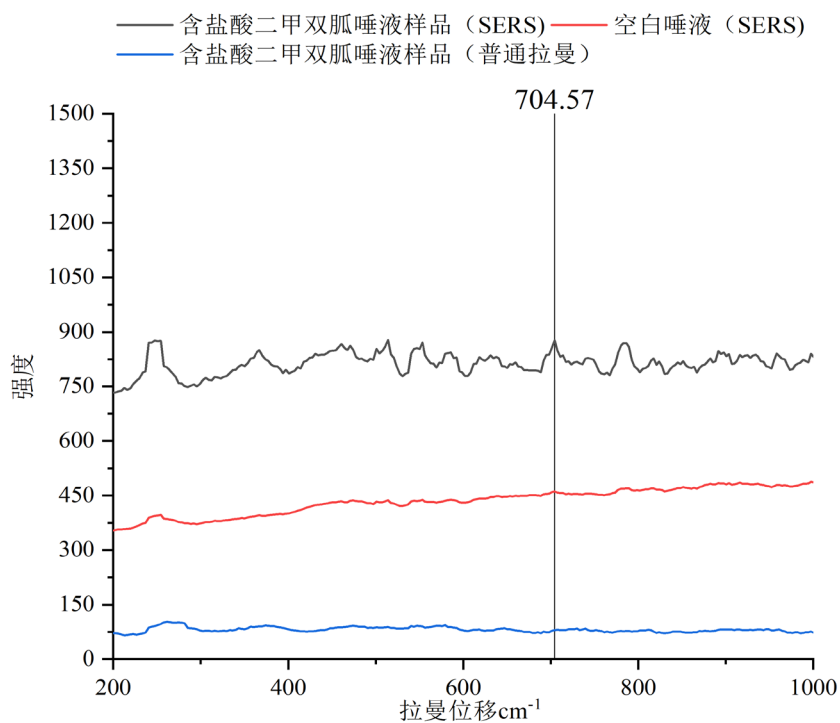


Figure 6. Surface-enhanced Raman spectra of saliva samples containing metformin hydrochloride

图 6. 含盐酸二甲双胍唾液样品的表面增强拉曼谱图

3.4. 唾液中的盐酸二甲双胍含量分析

取待测样品中空白唾液样品和含盐酸二甲双胍唾液样品各 1 mL 分别加入 0.5 mL 的饱和氯化钠溶液和 0.5 mL 的蒸馏水, 强烈震荡 2 min, 在离心机上以 $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心 5 min, 取上清液。然后将含盐酸二甲双胍唾液样品用常规拉曼检测得普通拉曼谱图, 再用移液枪分别注入 400 μL 金纳米溶胶混合均匀进行扫描, 得空白唾液样品与含盐酸二甲双胍唾液样品的表面增强拉曼谱图。结果如图 6 所示, 空白唾液样品得表面增强拉曼谱图中并未出现明显谱峰, 表明唾液中其他成分对实验干扰较小。其中蓝色曲线为含盐酸二甲双胍唾液样品的普通拉曼图, 并未观察到明显拉曼特征峰, 而含有盐酸二甲双胍唾液样品的表面增强拉曼谱图与标准样品波形相似, 结合盐酸二甲双胍浓度与特征峰强度的线性相关, 可得该唾液样品中盐酸二甲双胍含量为 $941.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。上述实验结果表明, 用金纳米粒子表面增强拉曼光谱定量检测唾液中盐酸二甲双胍含量的方法具有一定的可行性。

4. 结论

实验结果表明, 盐酸二甲双胍在浓度为 $200\sim 1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内与特征峰强度相关性较好, 其皮尔逊积矩相关系数为 0.98, 调整后趋势线拟合程度为 0.94。表明建立一种利用金纳米粒子表面增强拉曼光谱定量检测唾液中盐酸二甲双胍含量的方法可行, 为糖尿病患者治疗过程中对药物监测提供新思路。

5. 展望

针对表面增强拉曼技术的机制理论的进一步研究, 有助于制备出稳定性更高、重现性更好的基底; 并扩大不同唾液环境个体样本例数, 建立广泛的唾液样本库, 完善对检测唾液中盐酸二甲双胍含量的相关基础研究, 以期增强检测过程的可靠性和准确性。

致 谢

基金项目: 四川省大学生创新创业训练计划项目(项目号: S201910641067)。

参考文献

- [1] 姚雨露, 崔子健, 刘春伟, 焦义, 郑文新, 王燕, 曲典, 汪泓, 陈安宇. 唾液的拉曼光谱用于疾病诊断的初步研究[J]. 北京生物医学工程, 2011, 30(2): 137-140, 186.
- [2] Harper, M.M., Dougan, J.A., Shand, N.C., Graham, D. and Faulds, K. (2012) Detection of SERS Active Labelled DNA Based on Surface Affinity to Silver Nanoparticles. *Analyst*, **137**, 2063-2068. <https://doi.org/10.1039/c2an35112a>
- [3] Li, S.X., Zhang, Y.J., Zeng, Q.Y., Li, L.F., Guo, Z.Y., Liu, Z.M., Xiong, H.L. and Liu, S.H. (2014) Potential of Cancer Screening with Serum Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and a Support Vector Machine. *Laser Physics Letters*, **11**, Article ID: 065603. <https://doi.org/10.1088/1612-2011/11/6/065603>
- [4] Aggelos, P., Zoi, E.P. and Demetrios, A. (2016) Surface Enhanced Raman and 2D-Fluorescence Spectroscopy for the Investigation of Amino Acids and Egg Proteins. *Microchemical Journal*, **126**, 230-236. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.12.008>
- [5] 李琳, 杜佳, 凌智, 胡志希, 李杰. 唾液检测在心血管疾病诊疗中的应用[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(5): 593-595.
- [6] 周强, 杨立勇, 严孙杰. 2 型糖尿病口服降糖药物治疗模式及影响因素分析[J]. 福建医科大学学报, 2012, 46(6): 428-432.
- [7] 邬伟魁, 严倩茹. 超高效液相色谱法在药物有关物质分析中的应用[J]. 中国药物评价, 2015, 32(5): 277-279.
- [8] 刘莎莎. 表面增强拉曼光谱化学增强的理论研究[D]: [博士学位论文]. 大连: 大连理工大学, 2009.
- [9] 李书锋. 表面增强拉曼光谱的理论机制模型分析[J]. 安庆师范学院学报(自科版), 2008, 14(1): 24-26.
- [10] 徐广通, 袁洪福, 陆婉珍. 现代近红外光谱技术及应用进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(2): 134-142.
- [11] 张巍巍, 牛巍. 拉曼光谱技术的应用现状[J]. 化学工程师, 2016, 30(2): 56-58, 64.

-
- [12] 林洁茹. 表面增强拉曼光谱在指纹识别中的应用研究[D]: [硕士学位论文]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [13] 范蕾, 张雁, 尹利辉. 盐酸二甲双胍的表面增强拉曼光谱研究[J]. 中国药师, 2013, 16(9): 1319-1321.
- [14] 李津蓉, 戴连奎, 阮华. 基于谱峰分解的拉曼光谱定量分析方法[J]. 化工学报, 2012, 63(7): 2128-2135.
- [15] 潘家来. 激光拉曼光谱在有机化学中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1986: 63.