

一种快速检测中药材中二氧化硫残留量的荧光探针的合成及其应用

周琳¹, 刘巍², 狄斌^{1,3*}, 陈金龙^{1,3**}

(¹中国药科大学药物分析教研室,南京 210009; ²南京师范大学能源与机械工程学院,南京 210042;

³中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室,南京 210009)

摘要 建立一种增强型(turn-on)罗丹明衍生物荧光探针检测 HSO_3^- 和硫磺熏蒸中药材中二氧化硫残留量的方法。此方法基于探针中的醛基和 HSO_3^- 在 pH 4.8 的水醇条件下发生加成反应,伴随有罗丹明衍生物中的螺内酰胺开环可使探针荧光明显增强,荧光增强程度与 HSO_3^- 的浓度呈线性相关,线性范围 0.005~20 $\mu\text{mol/L}$,相关系数 $r=0.9985$ 。此方法对 HSO_3^- 具有高灵敏度和选择性,检测限低至 2.0 nmol/L。常见的阴阳离子及还原性物质对 HSO_3^- 的检测均没有干扰。此外,将此荧光探针用于检测硫磺熏蒸中药材二氧化硫残留量,操作简便、快速,回收率良好。

关键词 罗丹明衍生物; 荧光探针; 硫磺熏蒸; 亚硫酸氢根离子; 中药材; 二氧化硫残留量

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)04-0444-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150410

Synthesis and application of a fluorescent molecular probe for rapid detection of sulfur dioxide residues in traditional Chinese herbs

ZHOU Lin¹, LIU Wei², DI Bin^{1,3*}, CHEN Jinlong^{1,3**}

¹Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²College of Energy and Mechanical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210042; ³Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (Ministry of Education), China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract A fluorescence method based on a “turn-on” rhodamine derivative fluorescent probe was developed for the detection of hydrogen sulfite ions and sulfur dioxide residues in sulfur-fumigated herbs. This method was realized through a well-known aldehyde-bisulfite addition reaction accompanied by a ring opening of spirolactam of probe molecule in pH 4.8 aqueous ethanol media which resulted in a significant fluorescence and color change. The fluorescence enhancement was linearly proportional to the concentrations of bisulfite ranging from 0.005 to 20 $\mu\text{mol/L}$ with a correlation coefficient of 0.9985. The detection limit was low as to 2.0 nmol/L and there was no interference with other familiar co-existing anions, cations and reducing reagents indicating high sensitivity and selectivity of the proposed method. In addition, the novel probe was successfully applied for the identification of sulfur dioxide residues in herbs with a satisfactory recovery in five real samples.

Key words rhodamine derivative; fluorescent probe; sulfur fumigation; bisulfite anion; traditional Chinese herbs; sulfur dioxide residues

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21305161); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20130643) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. ZJ13068)

收稿日期 2015-02-24 通信作者 * Tel: 025-83271316 E-mail: dibin@cpu.edu.cn

* * Tel: 025-83271316 E-mail: chenjl_4@hotmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 21305161);江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20130643);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. ZJ13068)

硫磺熏蒸是传统中药养护方法之一,既可防虫、菌,又能达到增白增色的效果^[1]。近年来,研究发现,中药材在熏蒸过程中,性状及化学成分多发生改变,导致药效的降低或散失,且熏蒸后残留的二氧化硫(SO_2)及硫酸盐对呼吸道、胃肠道、神经系统等均有不同程度的危害^[2]。同时,二氧化硫衍生物亚硫酸氢盐是药品中常用的抗氧化剂,当其含量超过一定限度,会对皮肤、眼、呼吸道产生刺激^[3]。因此,药品中 SO_2 和亚硫酸氢盐的含量及安全性受到高度重视。世界卫生组织规定每人每天 SO_2 摄取量不能超过 0.7 mg/kg ^[4],中国药典对中药材及饮片中 SO_2 残留限量为 150 mg/kg ^[5],美国药典限定亚硫酸氢盐作为药用辅料的加入量为 $5 \sim 80 \text{ mg/kg}$ ^[6]。由于药品的成分复杂,且其中 SO_2 和亚硫酸氢盐的含量低,因而急需开发一种灵敏度高、选择性好且成本低的方法,用于药品中 SO_2 和亚硫酸氢盐含量的快速测定。

由于 SO_2 易溶于水,因此常将 SO_2 转换成 HSO_3^- 进行检测。目前,检测 HSO_3^- 的方法主要有:比色法^[7]、电化学法^[8]、色谱法^[9]、化学发光法^[10]和毛细电泳法^[11]。其中比色法和化学发光法灵敏度低且选择性差,而色谱法等方法需要昂贵的设备或繁琐的样品处理过程。与这些方法比较,荧光探针法具有操作简单、灵敏度高和选择性好的优点,是检测复杂样品中 HSO_3^- 的备选技术。

荧光探针通常由两部分组成:识别基团和信号基团^[12]。罗丹明及其衍生物是一类典型的荧光信号基团,有机化学经常利用亚硫酸氢盐与醛发生加成反应形成醛-亚硫酸氢盐加合物,分离提纯醛类化合物。因此本研究设想:将醛基作为识别基团用于检测 HSO_3^- ,同时利用罗丹明特殊的“螺环”结构在与分析物作用后开环,颜色和荧光表现明显的增强型(*turn-on*)响应,具有很高的灵敏度,并且其具有较长的最大激发、发射波长,可以有效降低背景荧光^[13]。从中受到启发,本研究将罗丹明与醛基结合起来,开发一种“*turn-on*”型罗丹明衍生物荧光探针 C1,考察了探针工作的检测条件,分析选择性和反应机制,并将此荧光探针用于检测 5 种市售硫磺熏蒸中药材中潜在的 SO_2 残留量,快速、准确,具有很强的实用性。

1 材 料

1.1 试剂和样品

罗丹明 B、亚硫酸氢钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);水合肼(纯度 99.0%,美国 Alfa Aesar 公司);乙二醛(40%,阿拉丁试剂有限公司);其他试剂均为市售分析纯;实验用水为二次蒸馏水。

山药 (*Dioscoreae*)、金银花 (*Lonicerae japonicae*)、党参 (*Codonopsis*)、枸杞 (*Lycii*) 以及黄芪 (*Astragali*) 均来自安徽亳州中药饮片厂。

1.2 仪 器

UV-1700 紫外分光光度仪、F-4600 荧光光谱仪(日本日立公司);FT/IR-4100 傅里叶变换红外光谱仪(日本 Jasco 公司);液相色谱-质谱联用仪(液相美国 Agilent 1260,质谱美国 Agilent 6224 TOF-LC/MS);Avance AV-300 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司)。

2 方 法

2.1 探针(C1)的合成及表征

探针(C1)合成路线如图 1 所示。称取罗丹明 B 粉末 1.2 g,置 100 mL 圆底烧瓶中,加入甲醇 30 mL 溶解,缓慢加入过量水合肼 4.0 mL,水浴回流直到粉红色消失。将反应混合物倒入去离子水中,用乙酸乙酯萃取(25 mL × 3),无水硫酸钠干燥,蒸除溶剂,得浅粉色粉末罗丹明 B 酰肼(0.8 g,收率:66.6%)。取罗丹明 B 酰肼 0.4 g,溶于乙醇 15 mL,加入过量乙二醛 2 mL,室温搅拌 8 h,将反应混合物倒入饱和氯化钠溶液中析出沉淀,抽滤,用水洗涤 2 次,干燥,以石油醚-乙酸乙酯(6:1)为洗脱剂,经色谱柱纯化得到橙黄色固体 C1(0.3 g,收率 75.0%)。¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.16 (12H, t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, NCH_2CH_3), 3.33 (8H, q, $J = 7.1 \text{ Hz}$, NCH_2CH_3), 6.24 (2H, d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, Xanthene-H), 6.43 (2H, d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, Xanthene-H), 6.52 (2H, d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, Xanthene-H), 7.10 (1H, d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, ArH), 7.40 (1H, d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, N=C-H), 7.47 ~ 7.56 (2H, m, ArH), 8.03 (1H, d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, ArH), 9.44 (1H, d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, CO-H); ¹³C NMR (300 Hz, CDCl_3) δ : 12.8, 44.6, 66.3, 98.4, 104.2,

108.5, 124.3, 126.9, 127.8, 128.9, 135.2, 141.6,
149.6, 152.9, 153.2, 192.9; ESI⁺-MS (*m/z*):

497.255 3 [M + H]⁺.

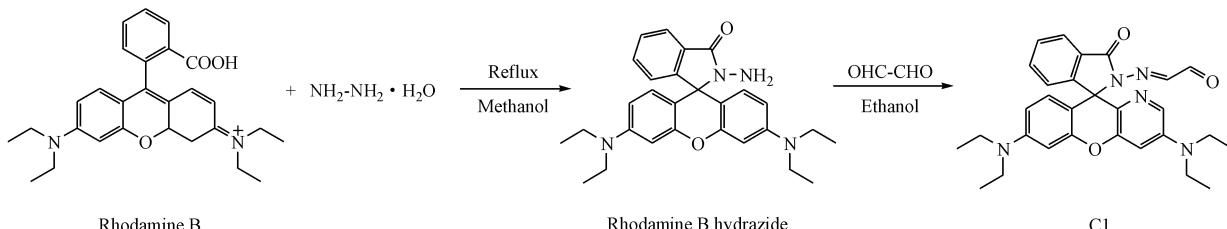


Figure 1 Synthetic route of rhodamine derivative fluorescent probe C1

2.2 溶液配制和荧光检测

亚硫酸氢钠储备液的配制：称取适量亚硫酸氢钠，用 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液（pH 4.8, 0.2 mol/L）溶解，配成不同浓度的亚硫酸氢钠溶液。

荧光检测样品的配制:于10 mL量瓶中,依次加入乙醇1.0 mL,探针C1(500 μmol/L)40 μL,Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液(pH 4.8, 0.2 mol/L)1.0 mL,不同浓度亚硫酸氢钠储备液50 μL,加水定容至10 mL,摇匀,室温避光静置20 min,在激发波长510 nm下,扫描荧光光谱,采集发射光谱588 nm波长下的荧光强度。

2.3 中药材 SO₂ 残留量的检测

参照《中华人民共和国药典》(2010 版)中药材残留 SO₂ 酸蒸馏法提取残留 SO₂。选取市售的枸杞、金银花等 5 种药材,采用改良的酸蒸馏法对药材进行前处理^[14]。分别称取各药材约 5.0 g,置两颈圆底烧瓶中,加水 60 mL 和 6 mol/L 盐酸溶液 2 mL,导入氮气至瓶底,连接回流冷凝管,在冷凝管上端连接导气管,将导气管插入到 100 mL 锥形

烧瓶底部,锥形瓶内加 pH 4.8 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液 25 mL 作为吸收液。加热两颈烧瓶内溶液至沸,保持 20 min,以确保 SO_2 收集完全。所得 SO_2 吸收溶液密封,避光保存。

为了检测药材中的 SO₂ 残留, 取乙醇 1.0 mL, 500 μmol/L C1 溶液 40 μL, Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液 (pH 4.8, 0.2 mol/L) 1.0 mL, 样品吸收溶液 50 μL, 依次加入到 10 mL 量瓶中, 用水定容至刻度, 摆匀, 室温避光静置 20 min。在激发波长为 510 nm 下, 扫描荧光光谱, 采集发射光谱 588 nm 波长下的荧光强度。

3 结果与讨论

3.1 检测机制

探针 C1 与 HSO_3^- 反应机制如图 2 所示, C1 本身是一种几乎无色、无荧光的化合物, 其结构中的醛基与 HSO_3^- 发生加成反应后, 由于电子转移使螺环结构打开, 生成粉红色有强荧光的化合物, 从而实现可视化和荧光检测 HSO_3^- 。

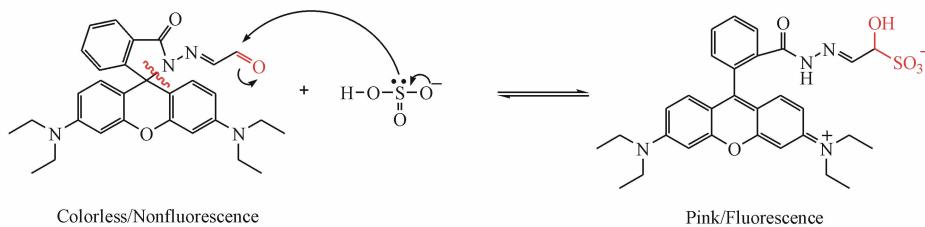


Figure 2 Proposed mechanism for the optical property changes of C1 after the addition of HSO_3^-

采用紫外分光光度法、红外光谱和液质联用法对反应机制进行验证。如图 3-A, 探针 C1 本身几乎没有紫外吸收, 加入 HSO_3^- 后, 在 565 nm 处出现明显的吸收峰, 溶液由无色变成粉红色, 颜色的变化证明探针与 HSO_3^- 反应导致螺环结构的开环。从红外光谱图(图 3-B)中可得出, 1741, 41 和 1702, 84

cm^{-1} 是探针中醛和酮的碳氧双键($\text{C}=\text{O}$)特征吸收峰,加入 HSO_3^- 后, $1\ 741.41\ \text{cm}^{-1}$ 峰消失,而酮羰基的吸收峰转移至 $1\ 697.05\ \text{cm}^{-1}$,验证了探针 C1 结构中的醛基与 HSO_3^- 发生了反应。

进一步利用液质联用的方法研究了该反应过程。图 3-C 是质谱的总离子流图，探针本身在 $t =$

18.027 min 出峰(质谱图见图 3-D, $[M + H]^+$ 497.255 3),加入 HSO_3^- 后,探针峰消失,在 $t_R = 12.880$ min 出现新的色谱峰,提取该色谱峰的质谱图(图 3-E),出现的 m/z 579.226 3 推算为 $[\text{C1} +$

$\text{H}_2\text{SO}_3 + \text{H}]^+$,即为加成反应的产物。综合紫外分光光度法、红外光谱和质谱的结果,证实了探针 C1 与 HSO_3^- 反应机制是醛基结构与 HSO_3^- 加成反应伴随有螺内酰胺开环。

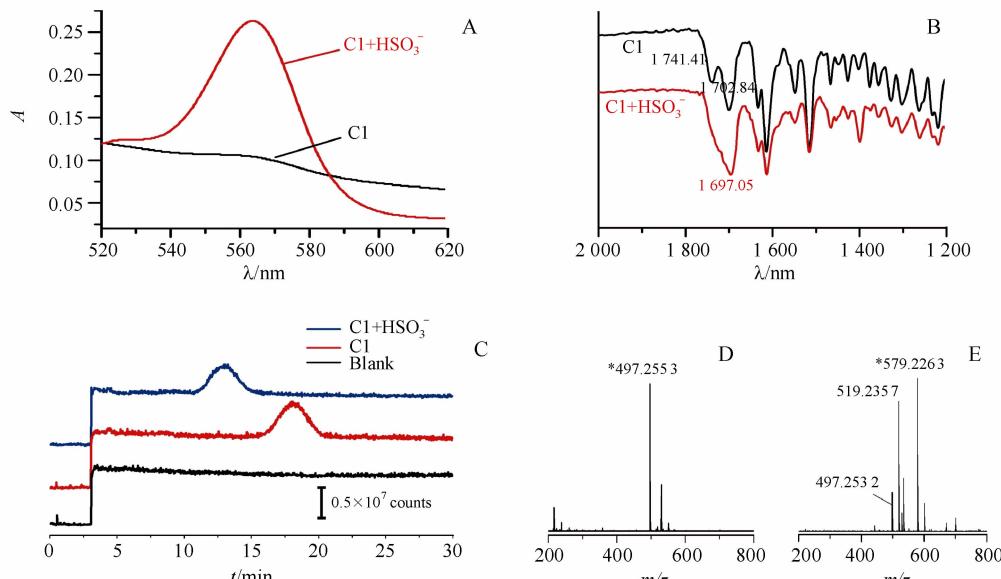


Figure 3 A:UV spectrum;B:IR spectrum;C:LC-MS spectrum;total ion chromatogram (collected of m/z arranging from 200 to 800, the first 3 min was cut off);D:Corresponding ESI-MS spectrum for only C1;E:ESI-MS spectrum for mixture of C1 with NaHSO_3 . Experimental conditions: $[\text{C1}] = 2.0 \mu\text{mol/L}$, $[\text{HSO}_3^-] = 80 \mu\text{mol/L}$. The HPLC analysis was performed with a C_{18} analytical column ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$) under 280 nm. The mobile phase was composed of methanol and 0.1% formic acid (80:20) isocratic eluent (flow rate, 1.0 mL/min) at 30 °C

3.2 检测条件优化

考察 pH 对荧光强度的影响,如图 4-A,加入 $10 \mu\text{mol/L} \text{HSO}_3^-$ 后,在 pH 4.8 时,体系的荧光强度达到最大,同时探针在此 pH 值条件下有相对较低的荧光背景,为了确保待测离子以 HSO_3^- 形式存在,因而选择 pH 4.8 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液作为反应介质。考虑到探针 C1 在乙醇中的溶解性较好,因此在溶液中加入乙醇以提高检测灵敏度。

溶液中乙醇-水比例和荧光强度关系如图 2-B 所示,在乙醇-水(10:90)的体系中荧光最强。在探针溶液中加入 HSO_3^- ,考察反应时间的影响,在反应 5 min 时荧光强度达到最高,5~15 min 内略微下降,在 60 min 内保持稳定。因此选择反应 20 min 以保证反应进行完全。总之,本研究中 HSO_3^- 检测的条件为:在乙醇-水(10:90)的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(pH 4.8, 20 $\mu\text{mol/L}$)介质中,室温反应 20 min。

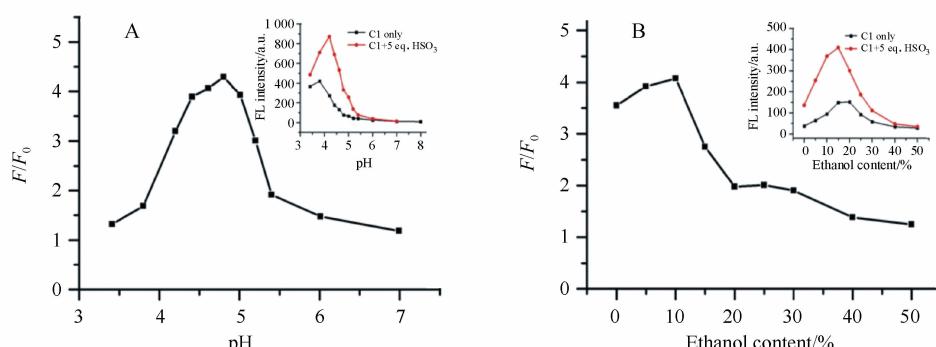


Figure 4 A:Effect of pH on F/F_0 value of the reaction of C1 ($2 \mu\text{mol/L}$) with bisulfite, Inset:fluorescence intensity versus pH;B:Effect of ethanol content on F/F_0 value of the reaction of C1 with bisulfite, Inset:fluorescence intensity versus ethanol content. Where F and F_0 are the fluorescence intensity of the reaction mixture in the presence and absence of HSO_3^- , respectively

3.3 探针的选择性考察

在探针浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$, pH 4.8 条件下, 考察不同干扰离子单独存在以及与 HSO_3^- 共存情况下对荧光强度的影响。如图 5 所示, 向溶液中加入浓度为 HSO_3^- 浓度 5 倍的干扰离子时, 无论是常见的阴、阳离子, 还是还原性物质谷胱甘肽(GSH)等存在的情况下, 干扰几乎可以忽略, 说明该探针对 HSO_3^- 具有很好的选择性。

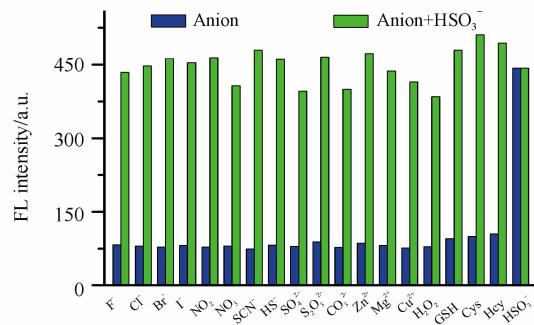


Figure 5 Selectivity of the probe C1 (2 $\mu\text{mol/L}$) to HSO_3^- (10 $\mu\text{mol/L}$) in the presence of various anions (50 $\mu\text{mol/L}$) in H_2O -ethanol solution (90:10, 20 mmol/L Na_2HPO_4 -citric acid buffer, pH 4.8)

3.4 荧光检测及线性

探针 C1 与 HSO_3^- 反应的荧光滴定曲线如图 6 所示。随着 HSO_3^- 浓度的增加, 荧光强度逐渐增强, 当 HSO_3^- 浓度达 100 $\mu\text{mol/L}$, 荧光强度基本保持稳定。在此条件下, 记录在最大发射波长 588

nm 处的荧光强度, 得到测定 HSO_3^- 浓度的标准曲线。标准曲线显示, HSO_3^- 浓度(c)的线性范围 0.005~20 $\mu\text{mol/L}$, 线性方程为: $F - F_0 = 28.92c + 8.507$ ($r = 0.9985$)。根据 IUPAC 规定, 由空白信号的标准偏差得出检测限 2.0 nmol/L ($n = 10$)。

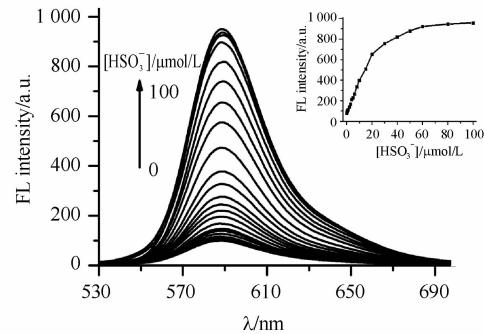


Figure 6 Fluorescence spectra of C1 (2 $\mu\text{mol/L}$) with different concentrations of HSO_3^- (0~100 $\mu\text{mol/L}$). The insert picture shows the fluorescence intensity versus bisulfite concentration

3.5 中药材 SO_2 残留量检测

为了检测此探针的实用性, 本实验选取了 5 种常见中药材: 金银花、枸杞、黄芪、山药、党参, 用酸蒸馏法提取 SO_2 , 使 SO_2 在 pH 4.8 的缓冲液中全部转换成 HSO_3^- , 用探针 C1 进行检测, 检测结果用加样回收率验证(表 1), 结果证明: HSO_3^- 的回收率在 100%~115% 之间, 此方法可以用于实际样品的检测。

Table 1 Analytical results for detection of SO_2 residue in five traditional Chinese herbs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Sample	SO_2 residues/($\mu\text{g/g}$)	Addition of HSO_3^- / ($\mu\text{mol/L}$)	Found of HSO_3^- / ($\mu\text{mol/L}$)	Recovery/%
<i>Lonicerae japonicae</i>	5.25 ± 0.17	0.01	0.0103 ± 0.001	103.00
		0.03	0.0319 ± 0.004	106.67
		0.05	0.0508 ± 0.002	101.60
<i>Lycii</i>	28.84 ± 0.40	0.03	0.0313 ± 0.002	104.14
		0.07	0.0742 ± 0.002	106.04
		0.10	0.1067 ± 0.004	106.75
<i>Astragali</i>	2.27 ± 0.20	0.01	0.0116 ± 0.001	115.74
		0.02	0.0204 ± 0.003	102.33
		0.03	0.0318 ± 0.002	106.02
<i>Dioscoreae</i>	28.55 ± 0.11	0.04	0.042 ± 0.001	104.98
		0.08	0.0825 ± 0.002	103.13
		0.12	0.1242 ± 0.001	103.50
<i>Codonopsis</i>	7.48 ± 0.03	0.02	0.0207 ± 0.001	103.50
		0.05	0.0508 ± 0.002	101.60
		0.08	0.0801 ± 0.002	100.13

4 结 论

本研究报道了一种增强型罗丹明衍生物荧光探针 C1, 在水-醇介质中与 HSO_3^- 发生加成反应, 导致了探针溶液颜色和荧光显著变化, 可进行裸眼检测和荧光检测, 具有很强的实用性。此探针对 HSO_3^- 具有高选择性和高灵敏度特点, 成功地应用于 5 种中药材中 SO_2 痕量残留的检测, 与传统的滴定法比较, 具有操作简便并且检测迅速的优点。选择性好且环境友好型荧光探针可为药品中 HSO_3^- 的快速检测和鉴定提供一定的参考与借鉴。

参 考 文 献

- [1] Wang XH, Xie PS, Lam CW, et al. Study of the destructive effect to inherent quality of *Angelicae dahuricae* radix by sulfur-fumigated process using chromatographic fingerprinting analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, **49**(5): 1221–1225.
- [2] Kan WL, Ma B, Lin G. Sulfur fumigation processing of traditional Chinese medicinal herbs: beneficial or detrimental [J]. *Front Pharmacol*, 2011, **2**(1): 1–7.
- [3] Yang XF, Guo XQ, Zhao YB, et al. Novel spectrofluorimetric method for the determination of sulfite with rhodamine B hydrazide in a micellar medium [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, **456**(1): 121–128.
- [4] World Health Organization. W. J. FAO in WHO food additives series:60[S]. 2012.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia; second supplements, Part 1* (中华人民共和国药典:第二增补本)
- [6] [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2013: 180.
- [7] American Pharmacopoeia Commission. *United States Pharmacopoeia 35-National Formulary 30* [M]. Chemical Industry Press, 2012: 645.
- [8] Stonys DB. Determination of sulfur dioxide in foods by modified Monier-Williams distillation and polarographic detection [J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1987, **70**(1): 114–117.
- [9] Sakchai S, Pornthana P, Saisunee L. Preparation flow injection analysis for the determination of sulphite in food samples utilising potassium permanganate-rhodamine B chemiluminescence detection [J]. *Food Chem*, 2010, **121**(3): 893–898.
- [10] Miura Y, Fujisaki M, Haddad PR. Spectrophotometric determination of sulfide in the presence of sulfite and thiosulfate via the precipitation of bismuth (III) sulfide [J]. *Anal Sci*, 2004, **20**(2): 363–367.
- [11] Malakootian M, Bejtollah H, Biparva P. Nanostructured base electrochemical sensor for determination of sulfite [J]. *Int J Electrochem Sc*, 2014, **9**(1): 327–341.
- [12] de Macedo AN, Macri J, Belostotsky V, et al. Strong anion determination in biological fluids by capillary electrophoresis for clinical diagnostics [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(22): 11112–11120.
- [13] Huang T, OU-yang H, Shi Z, et al. Progress on metal ions fluorescent probe based on the off-on mechanism of rhodamine derivatives [J]. *J Xiamen Univ* (厦门大学学报), 2011, **50**(9): 137–140.
- [14] Duong TQ, Kim JS. Fluoro- and chromogenic chemodosimeters for heavy metal ion detection in solution and biospecimens [J]. *Chem Rev*, 2010, **110**(10): 6280–6301.
- [15] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia; Part I* (中华人民共和国药典:一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2013: 180.