碱性溶液提取-离子色谱法测定中药中二氧化硫残留量

王欣美，夏晶，王柯，季申*
（上海市食品药品检验所，上海 201210）

[摘要] 目的：建立中药中二氧化硫的测定方法。方法：样品用碱性溶液提取，甲醛作稳定剂，经 C_{18} 小柱净化。色谱柱为 IonPac AS11-HC 型离子交换柱，流动相为 15 mmol·L^{-1} KOH，加电自动抑制模式，用配有电导检测器的离子色谱仪测定亚硫酸根。结果：二氧化硫的残留量在 1～100 μg 线性关系良好，r = 0.999 2，检测限为 0.53 mg·kg^{-1}，平均回收率为 103.7%。结论：该法具有检测时间短、偶然误差小、灵敏度高、操作简便等优点，适于大批中药样品的检测。

[关键词] 离子色谱法；碱性溶液提取；二氧化硫；中药

近年来，中药滥用硫磺熏蒸的现象日趋严重，使中药残留过量的二氧化硫，不仅会导致中药成分的变化，改变药性，还会影响人体健康。另外在国际贸易中，中药中的二氧化硫残留问题已成为贸易争端的起因和绿色壁垒手段，因此有必要对中药中的二氧化硫残留量进行监控。中药中二氧化硫残留量的测定方法一般是经酸蒸馏后用碘量法或碱量法滴定[1-2]，由于蒸馏所需时间较长，不适合大批样品的测定。本文建立了以碱性溶液提取，离子色谱法测定亚硫酸根的方法，检测中药材二氧化硫残留量，该法取样量少、检测时间短、人为误差小、灵敏度高、操作简便，适于大批样品检测，具有一定的实用价值，为中药材二氧化硫的检测提供了更新、更可靠的方法。

1 材料

ICS-1000 型离子色谱仪（美国 Dionex 公司）；Milli-Q 超纯水仪（美国 Millipore 公司）；超声波清洗器（美国 Branson）；离心机（德国 Eppendorf，转速 > 4 000 r·min^{-1}）。

氢氧化钠、甲醛（体积分数为 37%）均为分析纯，水为超纯水，电阻率为 18.2 MΩ·cm^{-1}。亚硫酸钠对照品（Sigma 公司，纯度 98%）。甘草、制天南星、金银花、制半夏、白芍、天麻、生晒参片、党参、当归、黄芩、枸杞子、山药均购自上海华宇药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取中药细粉 2 g，精密称定，精密加入含 1.5% 甲醛和 0.5% 氢氧化钠的混合溶液 25 mL，摇匀，超声处理（210 W，50 Hz）20 min，4 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清液过 C_{18} 小柱（依次用甲醇、水淋洗预处理），弃去前 5 mL 流出液，收集后 10 mL 流出液，经微孔滤膜滤过，取续滤液即得。

2.2 对照品溶液的配制

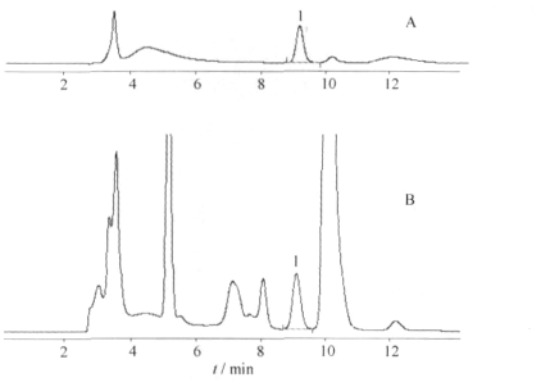
精密称取亚硫酸钠 100 mg，置 100 mL 量瓶中，加 0.74% 甲醛溶液溶解，并稀释至刻度，即得 1.0 g·L^{-1} 的标准储备液。分别精密量取标准储备液适量，用 0.74% 甲醛溶液逐级稀释成每 1 mL 含亚硫酸钠 2，5，10，20，40，100，200 μg（相当于二氧化硫 1，2.5，5，10，20，50，100 μg，临用新配）的对照品溶液。

2.3 色谱条件

IonPac AS11-HC（4 mm×250 mm）离子交换柱，IonPac AG11（4 mm×50 mm）保护柱；淋洗液 15 mmol·L^{-1} KOH；流速 1.0 mL·min^{-1}；抑制器 ASRS 4 mm 阴离子抑制器，加电自动抑制，抑制电流 38 mA；检电导检测器；检测池温度 35 ℃；柱温室温；进样量 25 μL。对照品和山药样品的离子色谱图见图 1。

[稿件编号] 20110412005
[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项（2009ZX09502-024）
[通信作者] * 季申，主任药师，Tel：（021）38839900-26601，E-mail：ji_shen2006@yahoo.com.cn
[作者简介] 王欣美，主管药师，研究方向为中药质量标准研究，Tel：（021）38839900-26127，E-mail：wangxinmei@smda.gov.cn

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



1. 亚硫酸根。

图 1 对照品(A)和山药样品(B)中的亚硫酸根的离子色谱图

2.4 测定方法

按设定的色谱条件,待基线稳定后,依次取相同体积的标准工作溶液和待测样品溶液,注入离子色谱仪,根据保留时间定性,标准曲线法定量。

2.5 方法学验证

2.5.1 线性关系试验 分别吸取标准溶液系列 25 μL,注入离子色谱仪,按照上述色谱条件分离,测定。以峰面积为纵坐标,标准溶液的浓度为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 0.224\ 7X - 0.196\ 8$,$r = 0.999\ 2$,线性范围 1 ~ 100 μg。

2.5.2 精密度试验 取同批次山药样品,按供试品溶液制备方法平行制备 6 份,按上述测定方法,依法测定,结果样品含量 RSD 3.4%。

2.5.3 准确度试验 取同批次山药样品,分别添加质量浓度为 0.2 g·L^{-1}的亚硫酸钠标准溶液 5 mL,平行 6 份,按供试品溶液制备方法制备样品,进行测定。回收率为 95.10% ~ 109.9%,平均回收率为 103.7%,RSD 4.9%。

2.5.4 稳定性试验 取一份山药供试品溶液,分别于 0,2,6,12,24 h 进行测定,记录峰面积,RSD 4.7%。结果表明,供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.5.5 检测限与定量限 以 3 倍(10 倍)信噪比所对应的浓度作为检测限(定量限),根据取样量和稀释体积,本实验的方法检测限与方法定量限分别为 0.53,1.78 mg·kg^{-1}。

2.6 样品测定 选取 10 种中药(材),按照所建立的方法进行测定,结果见表 1。

表 1 10 种中药材中二氧化硫的质量分数

品种	质量分数/mg·kg^{-1}
甘草	93.1
制天南星	162.0
金银花	129.9
制半夏	139.5
白芍	134.6
天麻	110.4
生晒参片	68.2
党参	388.0
山药	462.9
枸杞子	23.0
当归	-
黄芩	-

3 讨论

3.1 本方法与标准方法比较

目前,仅中国和韩国制订了中药中二氧化硫残留量的检测标准,方法均为酸蒸馏滴定法,原理是样品经酸蒸馏,二氧化硫逸出,用适当溶液接收,利用氧化还原反应或酸碱中和反应滴定。标准方法的优点是不需要大型仪器,但需专门制作全玻璃蒸馏装置,并且取样量大(一般为 10 g 以上);蒸馏耗时长(一般 1 h 以上);需要通入高纯氮气;测定中易产生人为、偶然误差,如蒸馏时间的长短、通入氮气的流速、滴定终点的判断等,影响结果的准确性。

本文建立的以碱性溶液提取,离子色谱法测定中药中二氧化硫的方法,其原理是样品经碱性溶液提取,使亚硫酸盐释放,利用离子色谱分离并检测亚硫酸根。该方法取样量少(2 g),耗时短(约 30 min),前处理和检测均采用仪器方法,自动化程度高,可控性强,人为误差小,专属性强,灵敏度、准确度高,适用于大批样品的检测。

3.2 碱性溶液提取二氧化硫的原理

用硫磺熏蒸中药材和饮片的过程中,单质硫生成二氧化硫,与中药材中无机元素生成亚硫酸盐。亚硫酸盐可以游离态、可逆结合态和不可逆结合态 3 种形式存在。由于不可逆结合的亚硫酸盐在生理环境下不发生解离,不会对人体健康发生危害,故一般二氧化硫或亚硫酸盐的检测对象是指游离的亚硫酸根和可逆结合的亚硫酸盐[3]。

可逆结合的亚硫酸盐(HSO_3^-)在低 pH 时稳

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

定,在 pH >7 时则分离成游离的亚硫酸根,化学平衡式如下:

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3^-$$

$$HSO_3^- \rightleftharpoons H^+ + SO_3^{2-}$$

中药的成分复杂,需要采用适当的方法将亚硫酸盐从复杂的样品基体中分离出来才能进行测定。用酸处理得到的是游离态的亚硫酸盐,而用碱处理则能将可逆结合的亚硫酸盐释放出来,得到总亚硫酸盐。因此采用碱性溶液进行样品提取。

3.3 样品前处理方法的考察

在确定采用碱性溶液进行样品提取的前提下,对影响样品提取的各个因素:提取溶剂的碱度、稳定剂、提取方式、提取时间、取样量和净化方式进行了研究。

首先对提取溶液的碱度进行了考察。采取在相同质量的同批号样品中加入不同体积的 1 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液,其他条件相同的方式进行比较测定,确定 1 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液的最佳加入量为 3 mL。

由于亚硫酸根不稳定,在水溶液中极易被氧化成硫酸根,故样品及标准溶液必须加入稳定剂,以抑制亚硫酸根的氧化。三乙醇胺、甘露醇、甲醛等均可用作稳定剂,其中甲醛最有效[4]。根据文献资料,甲醛的最佳体积分数为 74%(每 100 mL 溶液中需加入体积分数为 37% 的甲醛溶液 2 mL)[5],由于样品溶液中甲醛可能与中药中的一些化合物发生反应,因此样品中的甲醛量需过量。故在本研究中,每 25 mL 样品溶液中加入 1 mL 的体积分数为 37% 的甲醛溶液,稳定性实验证明,供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

因可逆结合态的亚硫酸盐在碱性环境中即可被释放,故采用超声或振荡的方式加速其溶出即可达到提取的目的。研究比较了这 2 种提取方式的提取效率,兼顾操作的可控性和自动化程度,选择超声处理的方式进行二氧化硫的提取。

在确定超声提取的基础上,对提取时间进行了考察,发现随超声时间的增加,含量逐渐增大,超声处理 20,30 min 所得含量基本一致,因此提取时间确定为 20 min。较之蒸馏法耗时 1 h 以上,提取时间大大缩短。

研究考察了不同取样量对测定结果的影响,结果最佳取样量为 2 g。本方法的取样量比标准方法减少了 5 倍。

由于中药样品含有较多的有机杂质,提取液不经净化直接测定可能会损伤色谱柱,并可能带来较多的杂质干扰,样品溶液进样前需经固相小柱进行净化。考察了 C_{18} 小柱和 OnGuard RP Ⅱ,结果净化除杂的效果基本一致,回收率均符合要求,因 C_{18} 小柱较为常见易得,故最终选用 C_{18} 小柱进行提取液的净化。

3.4 限量标准

鉴于二氧化硫和亚硫酸盐对人体健康的危害,世界各国对食品中的二氧化硫及亚硫酸盐规定了最大限量。FAO/WHO 联合食品添加剂专家委员会(JECFA)对二氧化硫类物质作为食品添加剂的危险性评估为:每人每日最大允许摄入量为 0 ~ 0.7 mg·kg^{-1} 体重[6]。

然而在中药领域中,仅韩国对中草药的二氧化硫残留限量进行了规定,为 30 mg·kg^{-1}(韩国食品医药品安全厅第 2008-3 号公告)[2]。我国是中药的发源地,中药材市场上用硫磺熏蒸现象日趋严重,中国药典虽制订了二氧化硫的检测方法[1],但未对二氧化硫残留量作出限量规定,造成我国中药在二氧化硫残留量方面无法可依,将使中药的安全性问题愈加严重,在中药的国际贸易中势必处于被动局面。

建议我国的相关部门尽快制订二氧化硫残留的限量法规,并从中药加工炮制源头上控制硫熏。另外,政府应加大宣传力度,改变消费者“外观好的药材疗效就好”的传统观点,从根本上杜绝硫熏现象。

用碱性溶液提取-离子色谱法测定中药中二氧化硫残留量,方法简便、快速、准确、灵敏度高、人为误差小,具有一定的实用价值,为中药中二氧化硫的检测提供了可靠的方法。

参考文献

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 61.
[2] 韩国食品医药品安全厅第 2008-3 号公告附件 1[S]. 2008.
[3] 黎永杰,赵美萍,常文保. 食品中亚硫酸盐的检测方法研究进展[J]. 食品与发酵工业,2004,30(5):99.
[4] 邹月丽. 高效液相色谱柱后荧光检测法测定腌制大蒜中亚硫酸盐的含量[J]. 食品工业,2006(4):52.
[5] 黄惠玲,王玉健,卓海华,等. 食品中亚硫酸盐的离子色谱法测定[J]. 分析实验室,2009,28(8):15.
[6] 王丽丽,纪淑娟,李顺. 食品中二氧化硫及亚硫酸盐的作用与检测方法[J]. 食品与药品,2007,9(2):64.

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

Determination of sulfur dioxide in traditional Chinese medicine by alkaline solution extraction and ion chromatography

WANG Xinmei, XIA Jing, WNAG Ke, Ji Shen*
(*Shanghai Institute for Food and Drug Control*, *Shanghai* 201210, *China*)

[Abstract] **Objective:** An ion chromatographic method was developed to analyze sulfur dioxide in traditional Chinese medicine (TCM). **Method:** The samples were extracted with alkaline solution and reacted with formaldehyde to form hydroxymethyl sulfonic acid. The Extracts were cleaned by C_{18} column and SO_3^{2-} was determined with ion chromatography equipped with a conductance detector. In the method, AS11-HC chromatographic column was used and the mobile phase was 15 mmol · L^{-1} KOH. **Result:** The calibration curve was in good linearity in the range of 1 to 100 μg (r = 0.999 2). The detection limit was 0.53 mg · kg^{-1} and the average recovery was 103.7%. **Conclusion:** The method is simple, sensitive, precise, short-time-consuming, and the random error is smaller, which is applicable to the testing of large quantity batches of TCM.

[Key words] ion chromatography; alkaline solution extraction; TCM; sulfur dioxide

doi: 10.4268/cjcmm20111911

[责任编辑 马超一]

书 讯

由张铁军、杨秀伟教授主编的《中药质量控制-方法、技术与示范》于 2011 年 4 月在科学出版社出版发行，本书是一部关于中药质量评价思路、方法和实验研究的专著，是作者承担的国家科技支撑计划项目“中药质量控制技术研究”研究成果的总结。该书介绍了药材的品种及产地的确定，研究样品的野外及田间取样，有效部位药效筛选及药效物质基础研究质量，有效成分体内过程研究，质量评价及质量控制指标的确定，样品处理方法，分析测试方法，数据处理方法，质量评价方法等质量分析的全过程，构建符合中药复杂体系特点的、科学、规范、适合推广应用的中药质理研究技术方法和系统的评价体系，并将构建的技术方法应用于 7 种中药材、2 种饮片、6 种配方颗料、5 种复方中药质量的示范性研究。本书既是研究工作的具体总结，又为中药质量评价和质量控制提供新的思路和方法，适合从事中药研究、教学、生产的人员，以及临床药员研究工作者使用。

定价 148 元。各地新华书店及医学书店有售; 邮购电话: 010-64034601，6401516; 地址: 北京市东黄城根北街 16 号科学出版社医学中心(100717); 联系人温晓萍; 请在汇款附言注明所购图书的书名、册数、联系电话、是否要发票等。

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