

综述与专论

基于天然产物的 PROTAC 及其在靶标验证中的应用进展

徐琳¹, 王京², 张磊^{*1,2}

(1.遵义医科大学 药学院, 贵州 遵义 563000; 2.凯里学院 大健康学院, 贵州 凯里 556011)

摘要:天然产物是创新药物先导化合物的重要来源,具有结构多样性以及功能独特性。目前,天然产物在癌症、心脑血管疾病、神经系统疾病、自身免疫性疾病等的治疗中发挥重要作用。同时,蛋白质靶向嵌合体(PROTAC)技术的兴起为临床分子靶向药物耐药提供了新的解决方案,天然产物及其衍生物作为 PROTAC 的重要组成部分,在靶向蛋白降解药物的开发中发挥着重要作用。综述了基于天然产物的 PROTAC 以及 PROTAC 技术在天然产物靶标鉴定中的应用进展。

关键词:PROTAC;靶点鉴定;靶向药物;天然产物;研究进展

中图分类号:R284 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)06-0001-08

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0005

PROTAC Based on Natural Products and Its Application in Target Validation XU Lin¹, WANG Jing², ZHANG Lei^{*1,2}

(1.School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; 2.School of Life and Health Sciences, Kaili University, Kaili 556011, China)

Abstract: Natural products are the important sources of lead compounds for innovative drugs, exhibiting structural diversity and functional specificity. At present, natural products play an important role in the targeted therapy of cancer, cardiovascular and cerebrovascular diseases, nervous system diseases, and autoimmune diseases. The development of protein degradation targeted chimeras(PROTAC) provides a new strategy for clinical molecular targeted drug resistance. Natural products and their derivatives, as important parts of PROTAC, play an important role in the development of protein targeted drugs. This article reviewed the progress in the application of natural product-based PROTAC, as well as PROTAC technology for the identification of natural products targets.

Key words: PROTAC; target identification; targeted drug; natural product; research progress

天然产物是指动物、植物和微生物体内的化学成分或其代谢产物,具有结构新颖多样、生物活性独特等特点,是当今药物发现的重要来源。天然产物及其衍生物已应用于多种疾病的治疗中,包括心脑血管疾病、恶性肿瘤和传染病等^[1]。活性天然产物的靶点鉴定是深入了解其作用机制,指导其结构优化的关键。目前天然产物靶点鉴定主要包括基于亲和力的靶点鉴定、基于活性的蛋白质分析(ABPP) 和无标签的靶点鉴定 3 种方法。传统基于亲和力的靶点鉴定方法取决于小分子化合物和靶点蛋白质的瞬时结合,这种结合需要足够强,以便从整个蛋白质组中分离目标蛋白质。ABPP 专门用于识别功能活性蛋白质,如酶。无标签靶点识别方法如 DARTS 或 CETSA 联合质谱法等也受到靶标与小分子亲和力和靶标蛋白对蛋白水解或热变性的限制^[2]。由于天然产物结构复杂且可能存在多成分、多靶点的作用模式,以及与靶点蛋白瞬时、弱亲和力的相互作用为天然

产物精确靶点的鉴定带来了很大困难。蛋白质靶向嵌合体(PROTAC) 利用蛋白酶体具有特异性降解蛋白底物的功能,采用化学合成方法将靶蛋白结合配体与泛素化 E3 连接酶配体通过 Linker 连接,形成可以自发介导靶蛋白降解的双功能分子化合物,具有广阔的研究与应用价值。本文总结了天然产物及其衍生物的 PROTAC 以及将 PROTAC 与蛋白质组学等方法结合用于天然产物的潜在靶标鉴定的新策略及其应用。

收稿日期:2024-01-03;网络首发日期:2024-03-22

基金项目:黔科合基础项目(ZK[2023]499)。

作者简介:徐琳(1998-),女,贵州遵义人,硕士生,主要研究方向为药物化学。

通讯作者:张磊, E-mail: lei_chang@yeah.net。

引用本文:徐琳,王京,张磊.基于天然产物的 PROTAC 及其在靶标验证中的应用进展[J].化学试剂,2024,46(6):1-8。

1 天然产物靶标验证方法

天然产物靶点研究可以揭示天然产物的作用机制,并为新药开发提供理论基础。目前天然产物靶标鉴定主要包括标记法和非标记法。标记法是指小分子与亲和探针偶联,涉及色谱法、凝胶电泳法及质谱法^[3]。标记法需要对天然产物进行结构修饰,可能影响天然产物的特异性和亲和力,同时一些天然产物没有合适的化学修饰位点等限制了标记法的应用。因此,无标记天然产物靶标鉴定的直接方法,如药物亲和力响应靶向稳定性(DARTS)、蛋白质氧化速率稳定性(SPROX)、细胞热位移分析(CETSA)、热蛋白质组分析(TPP)以及间接的方法如蛋白质降解技术、基因组学方法和 CAMP 等基于生物信息学分析方法应运而生。DARTS 技术由 Lomenick 等^[4]于 2009 年首次提出,推测药物与靶蛋白结合后使蛋白结构更加稳定,从而具有抗蛋白酶水解的特性。Wang 等^[5]首先利用 DARTS 技术发现 ACTN4 是鞣花酸在乳腺癌干细胞中的直接结合靶点。Kim 等^[6]采用 DARTS 技术与 MSI 结合验证了姜黄素与 APN 相互作用。Huang 等^[7]采用 DARTS 技术与等温滴定量热法等技术结合发现蝙蝠葛苏林碱可直接作用于热休克蛋白 90(HSP90),破坏 β -catenin 的稳定性,从而抑制肺癌的肿瘤发生。Liu 等^[8]利用 DARTS 技术发现木香烃内酯可通过直接靶向 CDK2,抑制小胶质细胞介导的神经炎症。Sun 等^[9]利用 DARTS 技术鉴定发现 ABL1 是补骨脂素肝毒性的直接靶标。DARTS 具有操作简单、耗时短等优势,不需要对化合物进行结构修饰,以原有的结构分析与蛋白的相互作用,可以用于寻找化合物的新靶点也可以从成分复杂的天然药物和复方药物中发现新的靶点,但 DARTS 技术需要蛋白丰度高,以及实验中蛋白酶和细胞裂解液的选择会影响天然产物靶点识别,干扰 DARTS 技术的准确性,同时由于药物结合位点与蛋白酶识别位点的不同或蛋白本身对蛋白酶具有抗性而出现假阴性或假阳性结果。与 DARTS 类似,SPROX 是另一种基于配体诱导的靶点稳定性的检测方法,利用分子与靶点结合后增加靶蛋白抗氧化能力的原理,检测靶蛋白甲硫氨酸的氧化水平。Dearmond 等^[10]应用 SPROX 技术寻找中药活性成分白藜芦醇的靶点,发现除了之前已经确定的胞质脱氢酶,还存在 6 个潜在的靶点蛋白。SPROX 优点在于不需要纯化蛋白,可以与串联质

谱标签 TMT、SILAC 相结合,通过标记蛋白质氨基来确定肽的相对含量。SPROX 需要对甲硫氨酸残基氧化来测量热力学变化,不同的甲硫氨酸残基可能表现出相同的氧化速率,不足以为天然产物配体与靶点蛋白相互作用的确证提供充分的信息^[11]。CETSA 技术由 Martinez 等^[12]于 2013 年首次提出,主要基于天然产物与靶蛋白结合后热力学稳定性发生变化的原理。Wang 等^[13]利用 CETSA 技术,结合分子对接和质谱等证明莪术醇能与鼻咽癌细胞中的 NCL 蛋白结合,并使之降解,从而发挥抗癌作用。CETSA 常用于靶点的确定,但存在所需药物浓度高、通量不足等缺点^[14]。为了增加其在靶点和脱靶识别以及生物标志物识别上的应用,Savitski 等^[15]于 2014 年在 CETSA 的基础上开发了热蛋白质组分析(TPP)技术。Kak-egwa 等^[16]采用 TPP 技术鉴定出 Conophylline 可与 GPX4 结合,通过靶向 GPX4 诱导脂质活性氧积累和自噬。Chen 等^[17]建立一种基于 XGBoost 的简化热蛋白质组学分析方法,发现雷公藤甲素可通过与 HnRNP A2/B1 的潜在相互作用,调节肿瘤细胞活性。TPP 技术具有稳定性好、鉴定蛋白数量多的优点,而且不需要用抗体进行孵育检测,是一种广谱的蛋白鉴定技术。但存在耗时长、花费高、对膜蛋白的检测有限等问题。

目前,天然产物靶标识别的方法各有优缺点,多种方法结合更有利于天然产物靶点的识别。近年来,用于间接识别和确证非标记天然产物与靶点结合的方法也逐渐发展起来,例如蛋白降解 PROTAC 技术等^[18]。

2 PROTAC 技术

2.1 PROTAC 的设计及优势

2001 年, Sakamoto 等^[19]首次提出 PROTAC 概念,他们将甲硫氨酰氨肽酶-2(MetAP-2)的共价抑制剂 Ovalicin 和能识别 Skp1-Cullin-F-box(SCF)泛素连接酶的磷酸肽偶联,合成了第一个靶向蛋白降解的嵌合分子 PROTAC1,该分子可将 MetAP-2 招募至 SCF,诱导其泛素化和降解。2008 年, Schneekloth 等^[20]设计合成了第一个小分子 PROTAC,由靶向 MDM2 E3 泛素连接酶的小分子抑制剂 Nutlin 和 AR 小分子配体以及中间的 PEG Linker 构成;2019 年第一个 PROTAC 药物 ARV-110 进入临床试验用于治疗前列腺癌^[21]。至此,PROTAC 研究开启新的阶段,多个用于降解

致病蛋白质的 PROTAC 分子逐渐进入临床。目前已报道的基于 PROTAC 降解的蛋白包括:蛋白激酶^[22] (RIPK2、BTK、BCR-ABL、CDK2/4/6/9、PI3K、BTK、Fak、ERK1/2、HER2、c-Met、TBK1 等)、核受体^[23] (AR、ER)、表观遗传蛋白^[24] (PCAF/GCN5)、神经退行性疾病相关蛋白^[25] (Tau 蛋白)、抗凋亡蛋白、转录因子、支架蛋白、细胞因子、病毒相关蛋白等。

在传统小分子抑制剂的开发过程中,由于构象等原因许多关键疾病蛋白被认为是“不可成药”,而 PROTAC 技术是一种简单而有效的解决方案。PROTAC^[26] 是由一个 E3 泛素连接酶配体和一个靶蛋白配体,通过特殊设计的“Linker”结构连接最终形成三联体“PROTAC”活性形式。该三联体是一种具有双重功能的小分子,能够同时靶向特定蛋白,并招募 E3 泛素连接酶。在细胞内,PROTAC 的靶蛋白配体和靶蛋白结合,E3 连接酶配体和 E3 泛素连接酶的底物结合区结合,从而通过 Linker 把靶蛋白“拉近”到 E3 泛素连接酶旁边,随后通过泛素-蛋白酶体系统将靶蛋白降解。与传统的小分子抑制剂相比,PROTAC 策略具有一系列优势^[27]:首先,PROTAC 只需要结合在靶标蛋白的任意位点,不需要占据或阻断其活性位点。一些没有传统药物或抑制剂结合位点的蛋白可被泛素化途径降解,且 PROTAC 对靶标蛋白的降解效率与其和靶标蛋白的亲和力之间没有直接关系。其次,在靶标蛋白被泛素化后,PROTAC 分子将被释放并重新结合到新的靶蛋白上,导致其泛素化。因此,PROTAC 的泛素化依赖性降解,有望解决传统药物使用浓度较高的问题;第三,PROTAC 策略可以应对传统药物毒副作用大的问题。大多数蛋白家族包含多种结构高度相似的亚型,但不同亚型在不同疾病中的功能和表达水平各不相同。如果随机使用非特异性抑制剂,可能导致严重的毒性,以能够与特定构型的靶标蛋白结合的小分子构建 PROTAC,可实现对靶标蛋白的选择性降解。

因此,作为一种新的治疗策略,PROTAC 扩大了可成药靶点的范围,以及其具有催化作用,可提高选择性、活性和安全性,可有效降解多种突变体靶蛋白,克服耐药性并具备潜在广谱性等优势得到了广泛应用。

2.2 PROTAC 技术存在的问题

虽然 PROTAC 具有很好的靶向降解活性,但

PROTAC 的相对分子量通常超过 1 000 Da,导致其药代动力学性质较差,给药后难以被吸收。更为重要的是,PROTAC 存在一定的脱靶效应。此外,一些蛋白在一定水平上的表达有助于维持机体基本的生理功能,靶标蛋白的过度降解,可能会影响机体的正常生理活动。因此,在设计 PROTAC 分子时,应综合考虑其体内药代动力学特征、靶点特异性,以及在实际使用时的适当给药浓度等,以最大限度地提高利用效率、降低潜在的毒性效应^[28]。

3 基于天然产物的 PROTAC 及其分子靶点

3.1 基于天然产物及其衍生物的 PROTAC

天然产物通常通过多个靶标相互作用而产生活性,但其与靶标的亲和力较弱。PROTAC 可以有效、特异性地降解靶蛋白,并且可以在较低剂量下与靶蛋白结合,这可能是一种有效的策略以鉴定天然产物不可检测的靶点。因此,基于天然产物设计的 PROTAC 具有较强的蛋白质降解潜力,这些天然产物包括激素、黄酮、生物碱、萜类和微生物代谢产物等。

3.1.1 基于激素类天然产物的 PROTAC

雄激素受体 (Androgen receptor, AR) 属于核受体超家族中的类固醇受体,近年来研究发现,AR 是前列腺癌发生和发展的关键驱动因子,尤其是转移性去势抵抗性前列腺癌 (Metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC)。迄今为止,全球共有多个 AR PROTAC 降解剂进入临床试验,进展最快的是 Arvinas 公司开发的 ARV-110,目前处于临床 II 期。此外,Arvinas 公司开发的 ARV-766、Bristol Myers Squibb 公司开发的 CC-94676、海创药业公司开发的 HP518、开拓药业公司开发的 GT20029 以及 Accutar 公司开发的 AC-0176,目前均处于 I 期临床试验中^[29]。

雌激素受体 α (ER α) 是类固醇激素核受体,拮抗雌激素与 ER α 的相互作用是治疗乳腺癌的重要方法^[30]。由于传统药物的耐药性,利用选择性雌激素受体降解剂靶向 ER α 的降解也是乳腺癌治疗发展的重要方向^[31]。雌二醇 (1,图 1) 是具有生物活性的天然雌激素。Cyrus 等^[32] 设计了基于雌二醇的靶向内质网降解剂,一端连接雌二醇,另一端由缺氧诱导因子 1 α 衍生的合成五肽组成。结果表明,雌二醇 C7 位连接得到的 PROTAC (2,图 1) 具有最强的蛋白降解活性和对雌激素受

体最高的亲和力,该降解剂有望克服乳腺肿瘤对他莫昔芬和氟维司汀等传统药物的耐药性,成为潜在的治疗及克服耐药手段。ARV-471 是由 Arvinas 公司开发的一款靶向 ER 的口服 PROTAC,用于治疗雌激素受体阳性/人表皮生长因子受体 2 阴性($ER^+/HER2^-$)的局部晚期或转移性乳腺癌患者。AC682 是冰洲石生物公司基于 AI 药物发现平台开发的一款 $ER\alpha$ 降解剂,是一种口服生物可利用的嵌合降解分子,也是国内首款获批临床试验的 ER-PROTAC^[29]。

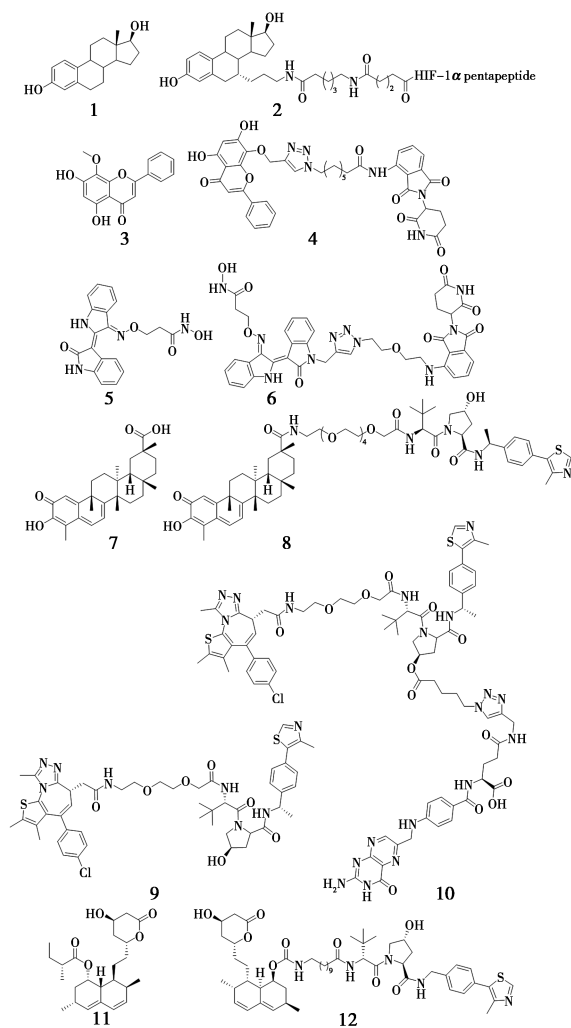


图 1 天然产物及其 PROTAC 结构

Fig.1 Structures of natural products and their corresponding PROTAC

3.1.2 基于黄酮、生物碱、萜类天然产物的 PROTAC

黄芩素(3,图 1)是一种天然黄酮类物质,能够抑制 CDK8/CDK9 等^[33],具有抗炎、抗肿瘤^[34]等功效。Bian 等^[35]利用该骨架,通过 E3 连接酶 CRBN 配体,设计合成了一系列靶向 CDK9 的

PROTAC(4,图 1)。化合物 4 以蛋白酶体和 CRBN 依赖性的降解 CDK9,并选择性地抑制 CDK9 过表达癌细胞的增殖。该研究证明基于黄芩素设计的 PROTAC 是一种有效的 CDK9 降解剂。

靛玉红是来源于中药青黛中的生物碱,具有双吲哚骨架,可用于治疗慢性粒细胞白血病^[36]。Cao 等^[37]将源自靛玉红的选择性 HDAC6 抑制剂(5,图 1)与 E3 连接酶 CRBN 配体泊马度胺连接得到了具有低细胞毒性的 HDAC6 降解剂(6,图 1),可减弱脂多糖诱导小鼠体内 NLRP3 炎症小体的激活,首次证明 HDAC6-PROTAC 可能是治疗 NLRP3 炎症小体相关疾病的新策略。

雷公藤红素(7,图 1)是一种天然的五环三萜,具有抗肿瘤^[38,39]、抗炎^[40]、抗血栓活性^[41,42]等多种生物活性,但存在严重的毒副作用,同时抗肿瘤分子靶标未明确。Wang 等^[43]将雷公藤红素与 E3 连接酶 VHL 配体连接得到化合物 8(图 1),可显著降低 NR4A1 蛋白水平,进一步实验结果显示化合物 8 可靶向 T 细胞、B 细胞、MDSCs 等多种细胞类型,具有较强的抗肿瘤作用。

3.1.3 基于维生素来源的天然产物 PROTAC

研究表明,叶酸受体 FOLR1 在多种肿瘤细胞中高表达^[44]。Liu 等^[45]利用叶酸和肿瘤中叶酸受体的高亲和作用,在传统蛋白水解靶向嵌合体化合物 9(图 1)侧链修饰叶酸基团,得到化合物 10(图 1)。基于叶酸和叶酸受体的高亲和力,使该 PROTAC 可以精准靶向肿瘤细胞,在进入细胞后释放叶酸部分,实现对肿瘤细胞中特定蛋白的选择性降解。该策略有望解决传统 PROTAC 分子对非肿瘤细胞毒副作用的难题。

3.1.4 基于微生物代谢产物的 PROTAC

APL-16-5 是从药用植物内生真菌 *Aspergillus* sp.CPCC 40073512 中分离得到的一种天然化合物。2022 年,Zhao 等^[46]发现 APL-16-5 同时结合 E3 泛素连接酶 TRIM25 和流感病毒 PA 亚基,基于 PROTAC 机制诱导 TRIM25 依赖的 PA 泛素化及其降解,阻断病毒 RNA 复制,具有良好的体内抗甲型流感病毒活性。该研究发现了第一个来源于微生物天然产物的 PROTAC 分子,表明微生物代谢产物可成为天然 PROTAC 分子的重要来源。

洛伐他汀(11,图 1)是由土曲霉发酵产生的天然产物,通过竞争性抑制胆固醇合成途径中羟

甲基戊二酸辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶, 治疗原发性高胆固醇血症等^[47]。他汀类药物治疗后, HMG-CoA 还原酶蛋白通常上调, 引发与不良反应相关的更高剂量药物的需求。Luo 等^[48] 采用 PROTAC 技术开发了基于 E3 连接酶 VHL 配体的 HMGR-PROTAC。化合物 12 (图 1) 具有良好的安全性和口服生物利用度, 能够在体内促进 HMG-CoA 还原酶降解和降低胆固醇, 可单独或与他汀类药物协同治疗高血脂症。

3.2 PROTAC 技术用于天然产物靶标鉴定

Wu 等^[49] 将 PROTAC 技术与定量蛋白组学、微量热泳动分子互作检测技术相结合, 从被降解的差异蛋白中找到中药靶点, 并通过下游的一系列分子、生物化学和动物实验进行功能验证, 为中药成分的靶点鉴定提供新的策略。团队前期从中药千金子中获得了一系列千金烷二萜类化合物, 其中化合物 13 (图 2) 具有最强的抗炎活性, 且毒性较低。将化合物 13 的核心骨架化合物 14 (图 2) 与 E3 连接酶 CRBN 配体沙利度胺通过 PEG Linker 相连, 得到 PROTAC 分子化合物 15 (图 2)。将 PROTAC 与细胞共孵育后用定量蛋白组学分析发现, MAFF 蛋白在化合物 15 处理后发生显著的降解。上述研究结果表明, MAFF 蛋白可能是千金烷二萜类化合物 13 的作用靶点之一。

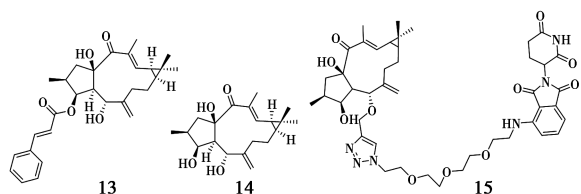


图 2 二萜类结构及其 PROTAC

Fig.2 Structures of diterpenes and its PROTAC

Li 等^[50] 将青蒿素二聚体 16 (图 3) 作为 PROTAC 分子的靶头, 利用 E3 连接酶配体沙利度胺以不同长度的 Linker 合成了一系列 PROTAC。研究发现, 降解活性最好的化合物 17 (图 3) 对肿瘤细胞 RS4; 11、RPMI-8226、U266 的

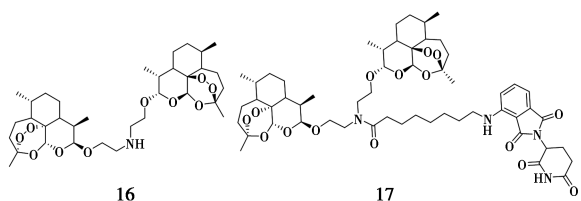


图 3 青蒿素二聚体结构及其 PROTAC

Fig.3 Structures of artemisinin dimer and its PROTAC

IC₅₀ 值分别为 (50.6 ± 6.3)、(235.3 ± 26.0) 和 (342.8 ± 11.6) nmol/L。标记定量蛋白组学分析结果显示, PCLAF 等 8 个蛋白显著下调, 经 Western Blot 验证后发现, PCLAF 能够被化合物 17 显著降解, 并且该降解能够被蛋白酶体抑制剂 MG132 所抑制, 表明 PCLAF 可能是青蒿素的潜在靶标。

植物来源的 2-乙酰基呋喃萘醌 (18, 图 4) 具有显著的抗癌活性。Hanafi 等^[51] 为了探究化合物 18 的作用机制, 设计了多个系列的 PROTAC 分子, 发现化合物 19 (图 4) 强效诱导 ZFP91 降解, 且此过程不能被化合物 18 竞争, 因此化合物 19 的抗肿瘤活性部分依赖于 ZFP91 蛋白的降解。

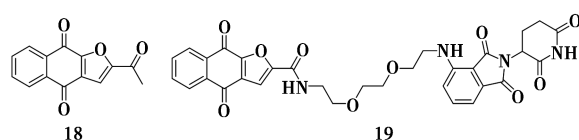


图 4 化合物 18 结构及其 PROTAC

Fig.4 Structures of compound 18 and its PROTAC

吴茱萸碱 (20, 图 5) 是一种从茱萸中提取的生物碱, 具有抗肿瘤等活性。Chen 等^[52] 基于吴茱萸碱已报道的衍生物 21 (图 5), 以 10 位羟基作为连接位点, 通过不同长度的烷基连接 E3 连接酶配体来那度胺, 成功设计了一系列 PROTAC 分子。在 HCT116 细胞的体外抗增殖实验中, 化合物 22、23 (图 5) 的 IC₅₀ 值分别为 0.019 和 0.021 μmol/L。标记定量蛋白组学分析结果显示, 化合物 22 可以剂量依赖的方式降解 REXO4 而发挥抗肿瘤作用。

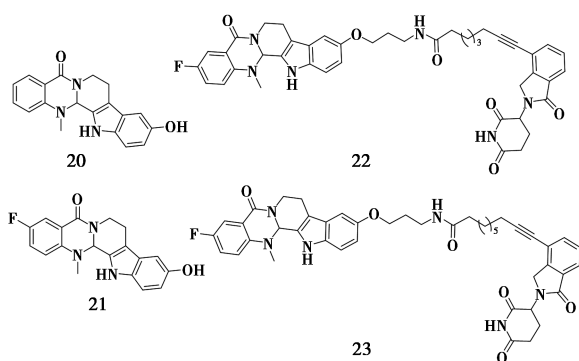


图 5 吴茱萸碱结构及其 PROTAC

Fig.5 Structures of evodiamines and their PROTAC

此外, 刘接卿等^[53] 通过 PROTAC 方法证实, 淫羊藿素的抗肿瘤靶标为 GRIA3 蛋白。Qi 等^[54] 设计合成 UA-PROTA 揭示了 MDM2 是熊果酸的

靶向结合蛋白。

4 总结与展望

天然产物是自然界的生物体在进化过程中为了适应环境、竞争拮抗、沟通交流等而产生的功能性代谢产物,与合成化合物相比,天然产物具有更加多样性的骨架类型,更丰富的官能团和更复杂的立体构型,独特的结构赋予了天然产物独特的生物学性质。因而,天然产物一直是生命科学领域重要的研究对象和新药发现的重要源泉。但由于天然产物的靶点研究尚不明确,严重阻碍了天然产物的发展。阐明天然产物与靶点的相互作用对于揭示天然产物在生物体内的作用模式以及确定天然产物作用靶点,对于化合物结构优化与药物开发至关重要。相较于标记法鉴定天然产物靶标的方法,非标记鉴定天然产物靶标可以最大程度的保留天然产物的结构和活性,以及适用于一些无化学修饰位点的天然产物靶标鉴定,但同样存在靶点特异性低,结合亲和力需求高等不足。PROTAC 技术的出现,为解决这一问题提供了一个新的解决办法。2001 年 PROTAC 概念提出至今,已有许多 PROTAC 药物进入临床,其中包含许多天然产物,本文综述了 PROTAC 技术在天然产物靶标鉴定中的应用,这些天然产物包括来源于激素、黄酮、生物碱、萜类、维生素以及微生物代谢产物的天然产物,进一步说明将天然产物设计成 PROTAC 用于改善天然产物选择性,降低毒副作用以及提高成药性的可能性。以及将天然产物设计成 PROTAC,形成可自发降解的双功能分子,基于 PROTAC 依赖泛素化蛋白酶体降解系统的特性,以天然产物衍生的 PROTAC 分子为探针,将其原型与 PROTAC 分子分别处理后的细胞裂解液进行差异蛋白质组学的测定和分析,结合 KEGG 通路分析等生物信息学方法,从被降解的差异化蛋白质中挑出候选靶蛋白,再通过体外靶点验证方法如 MST、CETSA、DARTS、RNAi 技术、体内靶点相关通路验证等实验进一步确证该天然产物的作用靶点。基于 PROTAC 技术的靶点鉴定与基于亲和力的靶点鉴定不同,基于 PROTAC 技术的靶点鉴定依赖于靶点-PROTAC-E3 连接酶三元复合物的形成,而不需要靶点蛋白与化合物之间的强结合,甚至可以通过稳定微弱的配体-靶蛋白相互作用,诱导靶蛋白的有效降解,并提高配体的选择性,在某种程度上是一个放大的信号,消

除由于实验设计和操作导致的误差,以及基于亲和力的靶点鉴定方法得到的假阳性或假阴性结果。因此,基于 PROTAC 的方法将是目前天然产物靶标鉴定方法的一个重要补充,可以为天然产物的靶点鉴定提供新方法,并可用于发现已知药物作用的新作用靶点。

参考文献:

- [1] ATANASOV A G, ZOTCHEV S B, DIRSCH V M, et al. Natural products and drug discovery [J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2021, **20**(3): 200-216.
- [2] PARK H, HA J, PARK B S. Label-free target identification in drug discovery via phenotypic screening [J]. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2019, **50**: 66-72.
- [3] YUE R, SHAN L, YANG X, et al. Approaches to target profiling of natural products [J]. *Curr. Med. Chem.*, 2012, **19**(22): 3 841-3 855.
- [4] LOMENICK B, HAO R, JONAI N, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, **106**(51): 21 984-21 989.
- [5] WANG N, WANG Q, TANG H, et al. Direct inhibition of ACTN4 by ellagic acid limits breast cancer metastasis via regulation of β -catenin stabilization in cancer stem cells [J]. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2017, **36**(1): 172.
- [6] KIM Y, SUGIHARA Y, KIM T Y, et al. Identification and validation of VEGFR2 kinase as a target of voacangine by a systematic combination of DARTS and MSI [J]. *Biomolecules*, 2020, **10**(4): 508.
- [7] HUANG X, YAN X, ZHANG Q H, et al. Direct targeting of HSP90 with daurisorline destabilizes β -catenin to suppress lung cancer tumorigenesis [J]. *Cancer Lett.*, 2020, **489**: 66-78.
- [8] LIU Y C, FENG N, LI W W, et al. Costunolide plays an anti-neuroinflammation role in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial activation by targeting cyclin dependent kinase 2 [J]. *Molecules*, 2020, **25**(12): 2 840.
- [9] SUN S, WANG M, YUAN Y, et al. A new strategy for the rapid identification and validation of direct toxicity targets of psoralen-induced hepatotoxicity [J]. *Toxicol. Lett.*, 2022, **363**: 11-26.
- [10] DEARMOND P D, XU Y, STRICKLAND E C, et al. Thermodynamic analysis of protein-ligand interactions in complex biological mixtures using a shotgun proteomics approach [J]. *J. Proteome Res.*, 2011, **10**(11): 4 948-4 958.
- [11] LOMENICK B, OLSEN R W, HUANG J. Identification of

- direct protein targets of small molecules[J]. *ACS Chem. Biol.*, 2011, **6**(1): 34-46.
- [12] MARTINEZ M D, JAFARI R, IGNATUSCHCHENKO M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay [J]. *Science*, 2013, **341**(6 141): 84-87.
- [13] WANG J, WU J, LI X, et al. Identification and validation nucleolin as a target of curcumin in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *J. Proteomics*, 2018, **182**: 1-11.
- [14] DRAKE W R, HOU C W, ZACHARA N E, et al. New use for CETSA: Monitoring innate immune receptor stability via post-translational modification by OGT [J]. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2018, **50**(3): 231-240.
- [15] SAVITSKI M M, REINHARD F B, FRANKEN H, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome [J]. *Science*, 2014, **346**(6 205): 1 255 784.
- [16] KAKEGWA J, OHTSUKA S, YOKOYAMA M, et al. Thermal proteome profiling reveals glutathione peroxidase 4 as the target of the autophagy inducer conophylline [J]. *Mol. Pharmacol.*, 2021, **100**(3): 181-192.
- [17] CHEN P, ZHAO P, HU M, et al. HnRNP A2/B1 as a potential anti-tumor target for triptolide based on a simplified thermal proteome profiling method using XGBoost [J]. *Phytomedicine*, 2023, **117**: 154 929.
- [18] 李玉斌, 吕超, 张卫东. 非标记的天然产物靶点识别和确证方法及应用 [J]. *药学报*, 2019, **54**(1): 82-88.
- [19] SAKAMOTO K M, KIM K B, KUMAGAI A. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cul1-F box complex for ubiquitination and degradation [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**(15): 8 554-8 559.
- [20] SCHNEEKLOTH A R, PUCHEAULT M, TAE H S, et al. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics [J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**(22): 5 904-5 908.
- [21] NEKLESA T, SNYDER L B, WILLARD R R, et al. ARV-110: An oral androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer [J]. *J. Clin. Oncol.*, 2019, **37**(7): 259.
- [22] YU F, CAI M, SHAO L, et al. Targeting protein kinases degradation by PROTACs [J]. *Front. Chem.*, 2021, **9**: 679.
- [23] FLANAGAN J J, NEKLESA T K. Targeting nuclear receptors with PROTAC degraders [J]. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2019, **493**: 110 452.
- [24] JANGAMPALLI A P, REDDY P H. Phosphorylated tau targeted small-molecule PROTACs for the treatment of alzheimer's disease and tauopathies [J]. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2021, **1 867**(8): 166 162.
- [25] VOGELMANN A, ROBAA D, SIPPL W, et al. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) for epigenetics research [J]. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2020, **57**: 8-16.
- [26] LI X, PU W, ZHENG Q, et al. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy [J]. *Mol. Cancer*, 2022, **21**(1): 99.
- [27] LI K, CREWS C M. PROTACs: Past, present and future [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2022, **51**(12): 5 214-5 236.
- [28] CHOUDHARY D, KAUR A, SINGH P, et al. Target protein degradation by protacs: A budding cancer treatment strategy [J]. *Pharmacol. Ther.*, 2023, **250**: 108 525.
- [29] 李炳坤, 杨宁, 李鹏运, 等. 基于蛋白降解靶向嵌合体 (PROTAC) 的药物研发新模式 [J]. *军事医学*, 2023, **47**(1): 1-12.
- [30] BOYAPATI S M, SHU X O, RUAN Z X, et al. Polymorphisms in ER- α gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival [J]. *Clin. Cancer Res.*, 2005, **11**(3): 1 093-1 098.
- [31] PATEL H K, BIHANI T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment [J]. *Pharmacol. Ther.*, 2018, **186**: 1-24.
- [32] CYRUS K, WEHENKEL M, CHOI E Y, et al. Jostling for position: Optimizing linker location in the design of estrogen receptor-targeting PROTACs [J]. *ChemMedChem*, 2010, **5**(7): 979-985.
- [33] POLIER G, GIAISI M, KOHLER R, et al. Targeting CDK9 by wogonin and related natural flavones potentiates the anti-cancer efficacy of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 [J]. *Int. J. Cancer*, 2015, **136**(3): 688-698.
- [34] HE L, LU N, DAI Q, et al. Wogonin induced G1 cell cycle arrest by regulating wnt/ β -catenin signaling pathway and inactivating CDK8 in human colorectal cancer carcinoma cells [J]. *Toxicology*, 2013, **312**: 36-47.
- [35] BIAN J, REN J, LI Y, et al. Discovery of wogonin-based PROTACs against CDK9 and capable of achieving anti-tumor activity [J]. *Bioorg. Chem.*, 2018, **81**: 373-381.
- [36] YANG L, LI X, HUANG W, et al. Pharmacological properties of indirubin and its derivatives [J]. *Biomed. Pharmacother.*, 2022, **151**: 113 112.
- [37] CAO Z, GU Z, LIN S, et al. Attenuation of NLRP3 inflammasome activation by indirubin-derived PROTAC targeting HDAC6 [J]. *ACS Chem. Biol.*, 2021, **16**(12): 2 746-2 751.
- [38] XU H, ZHAO H, DING C, et al. Celastrol suppresses

- colorectal cancer via covalent targeting peroxiredoxin 1 [J]. *Signal Transduct. Target Ther.*, 2023, **8**(1): 51.
- [39] 陈倩虹, 周婷, 李媚, 等. 雷公藤红素的结构修饰及抗肿瘤活性研究进展 [J]. *化学试剂*, 2024, **46**(1): 17-25.
- [40] ALLEN S D, LIU Y G, KIM T, et al. Celastrol-loaded PEG-b-PPS nanocarriers as an anti-inflammatory treatment for atherosclerosis [J]. *Biomater. Sci.*, 2019, **7**(2): 657-668.
- [41] JOSHI V, VENKATESHA S H, RAMAKRISHNAN C, et al. Celastrol modulates inflammation through inhibition of the catalytic activity of mediators of arachidonic acid pathway: Secretory phospholipase A 2 group II A, 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 [J]. *Pharmacol. Res.*, 2016, **113**: 265-275.
- [42] OUYANG M, QIN T, LIU H, et al. Enhanced inflammatory reaction and thrombosis in high-fat diet-fed ApoE^{-/-} mice are attenuated by celastrol [J]. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 2021, **129**(5): 339-348.
- [43] WANG L, XIAO Y, LUO Y, et al. Unleashing the power of NR4A1 degradation as a novel strategy for cancer immunotherapy [J]. *bioRxiv*, 2023, doi: 10.1101/2023.08.09.552650.
- [44] VARAGANTI P, BUDDOLLA V, LAKSHMI B A, et al. Recent advances in using folate receptor 1 (FOLR1) for cancer diagnosis and treatment, with an emphasis on cancers that affect women [J]. *Life Sci.*, 2023, **326**: 121 802.
- [45] LIU J, CHEN H, LIU Y, et al. Cancer Selective target degradation by folate-caged PROTACs [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**(19): 7 380-7 387.
- [46] ZHAO J, WANG J, PANG X, et al. An anti-influenza a virus microbial metabolite acts by degrading viral endonuclease PA [J]. *Nat. Commun.*, 2022, **13**(1): 2 079.
- [47] TOBERT J A. Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors [J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, **2**(7): 517-526.
- [48] LUO G, LI Z, LIN X, et al. Discovery of an orally active VHL-recruiting PROTAC that achieves robust HMGCR degradation and potent hypolipidemic activity in vivo [J]. *Acta Pharm. Sin. B*, 2020, **11**(5): 1 300-1 314.
- [49] WU Y, YANG Y, WANG W, et al. PROTAC technology as a novel tool to identify the target of lathyrane diterpenoids [J]. *Acta Pharm. Sin. B*, 2022, **12**(11): 4 262-4 265.
- [50] LI Y, ZENG Z W, CHEN D, et al. Facilitated drug repurposing with artemisinin-derived PROTACs: Unveiling PCLAF as a therapeutic target [J]. *J. Med. Chem.*, 2023, **66**(16): 11 335-11 350.
- [51] HANAFI M, CHEN X, NEAMATI N. Discovery of a napabucasin PROTAC as an effective degrader of the E3 Ligase ZFP91 [J]. *J. Med. Chem.*, 2021, **64**(3): 1 626-1 648.
- [52] CHEN S, BI K, LIANG H, et al. PROTAC derivatization of natural products for target identification and drug discovery: Design of evodiamine-based PROTACs as novel REXO4 degraders [J]. *J. Adv. Res.*, 2023, doi: 10.1016/j.jare.2023.10.014.
- [53] 刘接卿, 李婕, 张佩玺, 等. 淫羊藿素 PROTACs 及其制备方法和应用; CN 114 890 995 [P]. 2023-06-20.
- [54] QI Z, YANG G, DENG T, et al. Design and linkage optimization of ursane-thalidomide-based PROTACs and identification of their targeted-degradation properties to MDM2 protein [J]. *Bioorg. Chem.*, 2021, **111**: 104 901.

生化与药用试剂

多维度综合评价瞬时高温灭菌对丹参质量的影响

庄新慧^{1,2}, 焦连庆^{*1}, 于敏¹, 田齐聪², 张凤清^{*2}

(1. 吉林省中医药科学院, 吉林 长春 130012; 2. 长春工业大学 化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012)

摘要:为考察瞬时高温灭菌对丹参质量的影响, 采用 HPLC 法测定 10 批灭菌前后丹参中 8 种化学成分含量, DPPH·法测定丹参灭菌前后抗氧化活性, MTT 法测定灭菌前后丹参大鼠肝星状细胞 (HSC-T6) 存活率。建立 HPLC 指纹图谱, 液质联用 (LC-MS) 法确定共有峰结构, 采用聚类分析和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 预测不同丹参差异性质量标志物; 通过丹参与过量 DPPH 反应后的 HPLC 峰面积变化, 筛选丹参抗氧化成分; 采用偏最小二乘法回归 (PLS-DA) 分析法, 得出共有峰与 DPPH·抗氧化活性间的谱效关系, 结合单体化合物抗氧化活性大小, 最终确定丹参抗氧化活性质量标志物。灭菌前后 8 种化学成分含量、DPPH·清除率及细胞存活率经 *t* 检验均无显著性差异 ($P>0.05$); 灭菌前后指纹图谱相似度均大于 0.9, 同一批次样品灭菌前后聚为一类, 瞬时高温灭菌对丹参质量未产生影响; 紫草酸甲酯、丹酚酸 B、丹参酸甲酯、丹参酮 I、隐丹参酮、丹酚酸 F、丹参酮 II A、二氢丹参酮 I 可作为丹参质量差异标志物; 迷迭香酸、丹酚酸 B、紫草酸、丹酚酸 F 可作为抗氧化活性的质量标志物。

关键词: 丹参; 瞬时高温灭菌; DPPH·抗氧化活性; 质量标志物; 质量评价

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)06-0009-08

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0803

Multi-Dimensional Comprehensive Evaluation of the Impact of Instantaneous High-Temperature Sterilization on the Quality of *Salvia Miltiorrhiza* ZHUANG Xin-hui^{1,2}, JIAO Lian-qing^{*1}, YU Min¹, TIAN Qi-cong², ZHANG Feng-qing^{*2} (1. Jinlin Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China; 2. School of Chemistry and Life Sciences, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)

Abstract: To investigate the impact of instantaneous high-temperature sterilization on the quality of *Salvia miltiorrhiza*, the content of eight chemical components in *Salvia miltiorrhiza* before and after sterilization was determined using HPLC, the antioxidant activity of *Salvia miltiorrhiza* before and after sterilization was measured using the DPPH· method, and the cell viability of rat hepatic stellate cells (HSC-T6) before and after sterilization was measured using the MTT method. Set up HPLC fingerprints, the shared peak structures were determined using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), differential quality markers for different batches of *Salvia miltiorrhiza* were obtained through cluster analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The antioxidant components of *Salvia miltiorrhiza* were screened by HPLC peak area changes after reaction with excess DPPH. Partial least square regression (PLS-DA) analysis method was used to obtain the spectral effect relationship between the common peak and DPPH· antioxidant activity, combined with the antioxidant activity of monomer compounds, and finally determine the antioxidant activity quality markers of *Salvia miltiorrhiza*. The contents of 8 chemical components, DPPH· clearance rate and cell survival rate were not significantly different by *t* test before and after sterilization ($P>0.05$). The similarity of fingerprints before and after sterilization was greater than 0.9, the same batch of samples clustered into one class before and after sterilization, instantaneous high temperature sterilization had no effect on the quality of *Salvia miltiorrhiza*. Methyl vioxalate, salvianolic acid B, methyl salvianolic acid, tanshinone I, cryptotanshinone, salvianolic acid F, tanshinone II A and dihydrotanshinone I could be used as markers of quality difference of salvianone. Rosmarinic acid, salvianolic acid B, purple oxalic acid, salvianolic acid F can be used as quality markers of antioxidant activity.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; instantaneous high-temperature sterilization; DPPH· antioxidant activity; quality markers; quality evaluation

收稿日期: 2023-12-13; 网络首发日期: 2024-04-16

基金项目: 吉林省发展和改革委员会项目 (2020C032-6)。

作者简介: 庄新慧 (1999-), 女, 江苏盐城人, 硕士生, 主要研究方向为天然药物化学及代谢研究。

通讯作者: 焦连庆, E-mail: jiaolq2017@163.com; 张凤清, E-mail: 1044424827@qq.com。

引用本文: 庄新慧, 焦连庆, 于敏, 等. 多维度综合评价瞬时高温灭菌对丹参质量的影响[J]. 化学试剂, 2024, 46(6): 9-16。

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 为唇形科植物丹参的干燥根茎, 具有活血下瘀, 通经止痛, 清心除烦, 凉血消痛的功效^[1,2]。丹参中的有效成分主要为水溶性丹酚酸类和脂溶性丹参酮类, 水溶性成分以丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 等为主, 脂溶性主要以二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 等为主^[3]。丹参具有良好的抗氧化活性, 在治疗活性氧诱发的心脑血管疾病方面疗效显著, 其有效成分能够通过阻断自由基链反应和清除体内产生的自由基来减少对心脏的损害^[4]。

丹参在采收、加工、储藏期间容易滋生细菌从而会影响其质量, 选择有效且对其质量没有影响的灭菌方法尤为重要。丹参药材灭菌方法的研究报道主要有流通蒸汽灭菌法^[5]、⁶⁰Co 辐照灭菌法^[6]、微波灭菌法^[7], 均仅以丹参酮 II A 含量作为评价指标, 不能全面反映对丹参整体质量的影响。流通蒸汽灭菌和 ⁶⁰Co 辐照灭菌前后, 丹参酮 II A 含量差异显著, 不适用于丹参灭菌; 瞬时高温灭菌 (High Temperature Short Time, HTST) 利用直接蒸汽或热交换器将食品、药品等在 150~180 °C 高温下持续灭菌几秒至十几秒使微生物失活, 灭菌时间极短, 效率高, 无环境污染, 自动化程度高。本课题组前期研究结果^[8,9]表明瞬时高温灭菌可在不影响苦丁茶冬青、甘草、大叶冬青等药材主要成分及抗氧化活性的前提下杀灭微生物, 表明了瞬时高温灭菌的有效性及其可行性。

本研究一方面通过对不同批次丹参中多种化合物含量进行化学计量分析, 明确影响丹参质量的重要标志物; 另一方面, 丹参提取液 DPPH· 抗氧化活性体现丹参全成分的抗氧化活性, HPLC 法分析丹参与过量 DPPH· 反应表征的是丹参中单体的抗氧化活性强弱及反应速率, 上述分析结果结合丹参 8 种单体化合物 DPPH· 抗氧化活性 IC₅₀ 值和不同批次丹参抗氧化活性与化学成分间的谱效关系, 确定丹参中抗氧化活性质量标志物, 探索丹参抗氧化活性物质基础。体外细胞毒性试验作为药物安全性评价的重要环节^[10], 用于初步评价瞬时高温灭菌过程中是否产生毒性物质从而对丹参药材的安全性造成影响。本研究建立了包括丹参多种化学成分含测、DPPH· 抗氧化活性测定、指纹图谱及谱效分析、微生物限度检查及体外细胞毒性等多个维度的质量评价体系, 全面评价瞬时高温灭菌对丹参质量及安全性的影响, 为瞬

时高温灭菌技术在丹参生产中的应用、质量控制及药效评价提供科学依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

WS-FMD15 型过热蒸汽瞬时灭菌系统 (长春钴智制药有限公司); BSA12S-CW 型电子天平 (德国赛多利斯科学仪器有限公司); LC-20A 型高效液相色谱仪、Waters SYNAPT G2 型超高效液相色谱-四极飞行时间质谱联用仪 (日本岛津公司); RT-6100 型酶标分析仪 (深圳雷杜生命科学有限公司); KQ-250E 型超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); FD-1D-50 型冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司)。

丹参购自山东药材市场, 经吉林省中医药科学院南敏伦研究员鉴定为唇形科植物丹参。对照品迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A、丹参素 (纯度 >98%, 中国药品生物制品检定所); 乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 甲酸 (色谱纯, 天津光复科技发展有限公司); DPPH· 试剂 (纯度 >98.5%, 上海麦克林生化科技有限公司); HSC-T6 大鼠肝星状细胞 (北京博沃尔斯生物科技公司); 优级胎牛血清、细胞培养级 PBS (1x)、DMEM/F12 培养基 (大连美伦生物公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 瞬时高温灭菌处理丹参样品

分别取 10 批丹参样品 500 g, 粉碎, 过三号筛 (50 目), 瞬时高温灭菌 170 °C 处理 10 s, 工艺参数来源于本课题组前期优化工作, 采用无菌均质袋分装, 即得。

1.2.2 微生物限度检查

按 2020 年版《中国药典》四部“非无菌产品微生物限度检查法 (通则 1105)”^[11], 分别检测霉菌和酵母菌总数、需氧菌总数及控制菌 (大肠埃希菌、沙门菌、耐胆盐革兰阴性菌)。

1.2.3 对照品溶液的制备

精密称取 8 种对照品, 加 75% 甲醇配制成每 1 mL 分别含有 3 mg 丹酚酸 B、1 mg 丹参素、1 mg 迷迭香酸、1 mg 紫草酸、1 mg 二氢丹参酮 I、1 mg 隐丹参酮、1 mg 丹参酮 I、0.5 mg 丹参酮 II A 的对照品溶液, 过微孔滤膜 (0.22 μm), 4 °C 冷藏保存, 即得。

1.2.4 供试品溶液的制备

精密称取灭菌前和灭菌后丹参样品粉末各 0.3 g,置 25 mL 棕色量瓶中,加 75% 甲醇溶液稀释至刻度,超声处理 30 min,静置,晾至室温,用 75% 甲醇补足减失重量,微孔滤膜过滤(0.22 μm),即得供试品溶液。

1.2.5 色谱条件

色谱柱:Agilent HC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:0.1% 甲酸水溶液(A),乙腈(B),梯度洗脱;柱温 25 ℃,流速 1.0 mL/min,检测波长 280 nm,进样量 10 μL;洗脱程序:0~8 min, 10%~15% B;8~15 min,15%~21% B;15~30 min,21% B;30~40 min,21%~30% B;40~50 min,30%~60% B;50~65 min,60%~75% B;65~70 min,75%~95% B^[12]。

1.2.6 8 种化合物含量测定

按 1.2.5 条件进样测定,供试品溶液进样 10 μL,对照品溶液进样 5 μL,计算即得。

1.2.7 方法学考察

丹参中 8 种化合物的测定方法按照已发表的文献[12]测定,文献已进行方法学考察,建立的指纹图谱的测定方法也与文献方法相同。

1.2.8 质谱参数

电喷雾离子源(ESI);样品锥电压 35 V;喷雾电压正离子 3 000 V;负离子 2 400 V;源温 150 ℃;去溶剂气为氮气;温度 300 ℃;流速 300 L/h。

2 结果与讨论

2.1 灭菌前后丹参微生物限度检查

药典规定的非无菌药品微生物限度标准中,

需氧菌总数在 10⁵ CFU/g 以下,霉菌和酵母菌总数不超过 10² CFU/g,控制菌不得检出大肠埃希菌(1 g)、沙门菌(10 g)、耐胆盐革兰阴性菌(1 g)。灭菌前 10 批丹参需氧菌、霉菌和酵母菌均不可计,不符合药典规定的标准;瞬时高温灭菌后 10 批丹参样品各微生物总数见表 1,检查项目中细菌数、霉菌数、酵母菌数及控制菌检查结果均符合药典规定,结果表明瞬时高温灭菌能够有效降低丹参药材微生物限度水平,达到符合药典规定的灭菌效果。

表 1 微生物限度检查

Tab.1 Microbial limits checks (CFU/g)					
批次	需氧菌/ ×10 ³	大肠 埃希菌	耐胆盐革兰 阴性菌	沙门菌	霉菌和 酵母菌
1	4.0	—	<10	—	10
2	5.0	—	<10	—	20
3	2.0	—	<10	—	40
4	2.4	—	<10	—	10
5	3.6	—	<10	—	30
6	1.8	—	<10	—	50
7	4.1	—	<10	—	80
8	2.9	—	<10	—	38
9	2.6	—	<10	—	40
10	3.0	—	<10	—	60
未灭菌	不可计	—	<10	—	不可计

2.2 丹参 8 种化合物含量

瞬时高温灭菌后 10 批丹参中 8 种丹酚酸类和丹参酮类化合物含量及总含量结果见表 2, S1'~S10' 为丹参灭菌前 10 批样品, S1~S10 为丹参灭菌后 10 批样品。

表 2 灭菌前后丹参 8 种被测成分含量

Tab.2 Contents of 8 tested ingredients of <i>Salvia miltiorrhiza</i> before and after sterilization (%)									
样品	丹参素	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II A	总含量
S1'	0.041	0.141	0.191	3.230	0.194	0.165	0.103	0.192	4.257
S1	0.039	0.136	0.188	3.102	0.205	0.186	0.239	0.204	4.299
S2'	0.040	0.141	0.192	3.262	0.130	0.119	0.147	0.128	4.159
S2	0.039	0.143	0.200	3.289	0.145	0.131	0.165	0.136	4.248
S3'	0.027	0.119	0.158	2.434	0.086	0.072	0.085	0.075	3.057
S3	0.028	0.126	0.167	2.659	0.082	0.066	0.084	0.070	3.282
S4'	0.033	0.106	0.137	2.159	0.067	0.058	0.073	0.059	2.693
S4	0.035	0.105	0.142	2.223	0.071	0.061	0.074	0.064	2.774
S5'	0.035	0.136	0.196	3.041	0.189	0.184	0.229	0.191	4.202
S5	0.036	0.134	0.200	3.017	0.208	0.199	0.260	0.212	4.265
S6'	0.032	0.135	0.199	3.063	0.142	0.130	0.162	0.143	4.006

续表

样品	丹参素	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II A	总含量
S6	0.033	0.136	0.199	3.071	0.169	0.138	0.174	0.153	4.072
S7'	0.051	0.125	0.175	2.793	0.123	0.112	0.138	0.122	3.639
S7	0.025	0.127	0.178	2.831	0.126	0.110	0.137	0.119	3.652
S8'	0.019	0.120	0.163	2.583	0.083	0.074	0.088	0.078	3.207
S8	0.033	0.126	0.161	2.622	0.083	0.072	0.084	0.076	3.259
S9'	0.033	0.132	0.197	2.965	0.220	0.194	0.250	0.211	4.203
S9	0.035	0.137	0.120	3.076	0.220	0.189	0.241	0.210	4.229
S10'	0.040	0.114	0.161	2.433	0.111	0.103	0.122	0.108	3.191
S10	0.029	0.126	0.172	2.559	0.122	0.103	0.119	0.115	3.346

2.3 DPPH·抗氧化活性测定结果

2.3.1 丹参样品及 8 种化合物单体 DPPH·抗氧化活性测定

参照陈仁强等^[13]方法并加以改进,制成丹参药材质量浓度为 0.6、0.36、0.3、0.18 mg/mL 的 75% 甲醇溶液。在紫外波长 517 nm 下测定样品组溶液及样品对照组溶液、空白组溶液吸光度,每组样品设置 3 复孔,实验结果取平均值,样品对照组用样品溶剂替代 DPPH·溶液,空白组样品溶液用无水乙醇替代样品溶液,根据式(1)计算自由基清除率,结果见表 3。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_0)/A_i] \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_0 为样品对照溶液吸光度值; A_1 为样品溶液吸光度值; A_i 为空白溶液吸光度值。

表 3 灭菌前后 10 批丹参样品 DPPH·清除率

Tab.3 DPPH·clearance rate of 10 batches of *Salvia miltiorrhiza* samples before and after sterilization (%)

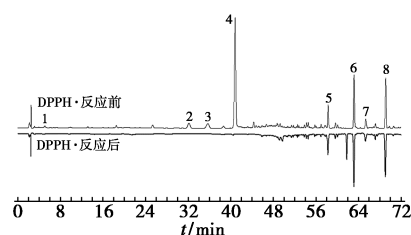
批号	灭菌前 $\bar{x} \pm S$	灭菌后 $\bar{x} \pm S$	批号	灭菌前 $\bar{x} \pm S$	灭菌后 $\bar{x} \pm S$
1	83.12±1.02	83.70±1.09	6	81.90±1.58	83.10±1.20
2	82.30±1.46	83.80±0.78	7	80.30±1.17	81.20±1.99
3	80.80±0.91	81.01±1.55	8	80.61±1.48	81.30±1.76
4	77.39±1.04	79.02±1.01	9	81.40±1.18	82.03±1.69
5	81.30±1.26	82.80±1.56	10	77.81±1.60	80.00±1.16

为了进一步验证丹参中影响 DPPH·抗氧化活性的化学成分,单独以丹参 8 种化合物单体进行抗氧化活性测定,将丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 8 种对照品分别用甲醇溶液稀释至 0.06、0.036、0.024、0.018 $\mu\text{g/mL}$,以样品浓度和自由基清除率进行线性回归得到方程,计算丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的 DPPH·抗氧化活性 IC_{50} 值分别为 0.091、0.025、0.030、0.028 $\mu\text{mol/L}$,4 种水溶性丹参化合物抗氧化活性大小顺序为迷迭香酸>丹酚酸 B>紫草酸>丹参素,4 种

脂溶性丹参化合物二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A 吸光度值大于 DPPH·对照组,无 DPPH·抗氧化活性。

2.3.2 HPLC 法筛选丹参 8 种化合物中 DPPH·抗氧化成分

取浓度为 12 mg/mL 丹参供试品溶液与 4 mg/mL DPPH 溶液反应 20 min,按 1.2.5 色谱条件注入高效液相色谱仪进行测定。丹参样品反应 20 min 前后 HPLC 图见图 1;根据峰面积变化计算反应率,结果见表 4。4 种水溶性成分丹参素、



1.丹参素;2.迷迭香酸;3.紫草酸;4.丹酚酸 B;
5.二氢丹参酮 I;6.隐丹参酮;7.丹参酮 I;8.丹参酮 II A

图 1 丹参样品反应 20 min 前后 HPLC 色谱图对比
Fig.1 Comparison of HPLC chromatograms before and after the reaction 20 min of *Salvia miltiorrhiza* samples

表 4 丹参样品反应前后峰面积变化及反应率

Tab.4 Changes in peak area and reaction rate of *Salvia miltiorrhiza* sample before and after reaction

化合物	反应前 峰面积	反应 20 min 后 峰面积	反应 65 min 后 峰面积	反应量	反应率/ %
丹参素	48 217	0	0	48 217	100
迷迭香酸	237 321	0	0	237 321	100
紫草酸	249 210	0	0	249 210	100
丹酚酸 B	2 998 364	0	0	2 998 364	100
二氢丹参酮 I	342 345	390 824	353 164	未反应	0
隐丹参酮、 丹参酮 I	1 019 508	1 020 772	1 020 880	未反应	0
丹参酮 II A	932 024	924 546	917 378	未反应	0

迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 反应率均为 100%, DPPH·抗氧化活性强;4 种脂溶性成分中二氢丹参酮 I 反应 20 min 后峰面积增加了 48479,最大吸收波长由反应前的 241、290 nm 变为 244、288 nm,可能有其他反应产物与二氢丹参酮 I 进行了叠加,隐丹参酮和丹参酮 I 色谱峰峰面积变化不明显,反应时间增加至 65 min 时,各峰面积变化不明显,不再继续发生反应,3 种化合物均无抗 DPPH·抗氧化活性;丹参酮 II A 反应后峰面积减少量少,抗氧化活性不显著,这与丹参 8 种化合物单体 DPPH·抗氧化活性结果相一致。

2.4 MTT 法测定灭菌前后丹参样品 HSC-T6 细胞存活率

2.4.1 样品溶液制备

精密称量 1 g 丹参样品,加入 20 倍量水溶液超声提取 30 min,过滤,取上清液,冷冻干燥,加水配制成浓度依次为 2 000、1 000、500、250、125 μg/mL 的供试品溶液。

2.4.2 细胞存活率测定

取处于对数生长期的 HSC-T6 细胞悬液,植入 96 孔板中,37 ℃ 培养箱中通入 5% CO₂ 培养 24 h 至细胞贴壁。分别吸取 100 μL 供试品溶液加入细胞中作为给药组,对照组每孔加入 100 μL 新鲜培养液,每组受试物设 6 复孔。采用 MTT 法^[14]在波长 450 nm 下测定待测物吸光度 OD 值,实验重复 3 次,按下列公式计算细胞存活率 RGR。

$$RGR(\%) = [(\text{给药组平均 OD 值}) / (\text{对照组平均 OD 值})] \times 100\%$$

(2)

灭菌前后不同浓度丹参样品溶液作用于 HSC-T6 细胞 24、48、72 h 后,细胞存活率随着药物剂量的降低而呈现增高的趋势,灭菌前后细胞存活率均大于 50%,灭菌前后的丹参样品溶液均无 HSC-T6 细胞毒性,结果见表 5。灭菌前后 24、48、72 h 内相同给药浓度下细胞存活率经 *t* 检验,均无显著性差异(*P*>0.05)。

表 5 灭菌前后不同给药浓度下 HSC-T6 细胞存活率

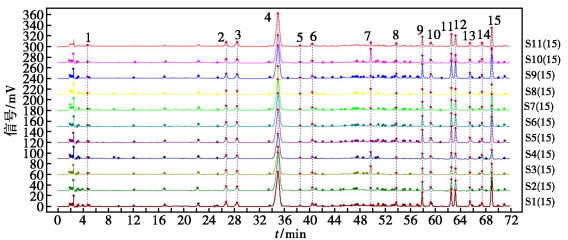
Tab.5 Survival rate of HSC-T6 cells at different concentrations before and after sterilization							
给药浓度/(μg·mL ⁻¹)	灭菌前/后	24 h($\bar{x} \pm S$)/%	<i>P</i>	48 h($\bar{x} \pm S$)/%	<i>P</i>	72 h($\bar{x} \pm S$)/%	<i>P</i>
2 000	灭菌前	74.3±3.3	0.958	60.6±2.8	0.300	58.6±0.8	0.063
	灭菌后	73.3±3.4		59.1±1.8		58.0±2.4	
1 000	灭菌前	81.5±2.7	0.861	82.7±6.1	0.529	75.9±1.1	0.187
	灭菌后	82.8±2.9		83.6±4.5		76.8±3.6	
500	灭菌前	87.9±2.3	0.972	85.6±1.7	0.636	87.1±2.1	0.403
	灭菌后	89.6±2.2		86.4±1.4		86.4±3.4	
250	灭菌前	92.1±2.2	0.787	91.4±1.1	0.447	91.5±1.7	0.833
	灭菌后	91.2±1.9		92.1±0.8		92.4±1.6	
125	灭菌前	98.0±1.5	0.807	96.4±0.6	0.164	96.2±1.5	0.781
	灭菌后	98.2±1.8		96.9±1.6		96.0±1.7	

2.5 指纹图谱分析

最佳灭菌工艺处理前后的 10 批丹参供试品溶液,按 1.2.5 方法测定,数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,以灭菌前 10 批丹参样品生成对照指纹图谱作为参照图谱,生成叠加 HPLC 指纹图谱对照指纹图谱。选取 15 个峰作为共有峰,其中 8 个共有峰与丹参 8 种对照品图谱保留时间和最大紫外吸收波长相一致,见图 2。灭菌前后 10 批图谱与灭菌前对照图谱的相似度均大于 0.9,丹参质量稳定。

2.6 丹参 15 个共有峰成分鉴别及结构确认

分别采用正离子和负离子模式,丹参样品和丹参 8 种对照品采用 1.2.5 条件进样分析。采用 LC-MS 法确认丹参样品中 15 个共有峰所对应的



- 1.丹参素;2.迷迭香酸;3.紫草酸;4.丹酚酸 B;5.丹酚酸 E;
- 6.紫草酸甲酯;7.丹参酸甲酯;8.丹酚酸 F;9.二氢丹参酮 I ;
- 10.1,2-去氢隐丹参酮;11.隐丹参酮;12.丹参酮 I ;
- 13.1,2-二氢丹参酮;14.去氢丹参新酮;15.丹参酮 II A;
- S1~S10:灭菌后图谱;S11:灭菌前对照图谱

图 2 灭菌前后丹参指纹谱图

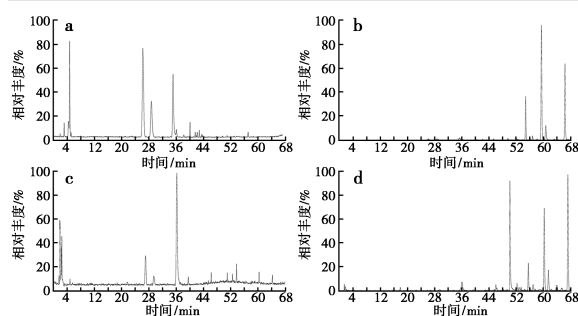
Fig.2 Fingerprint of *Salvia miltiorrhiza* before and after sterilization

化学结构,根据丹参化学成分裂解的离子信息以及加和行为等规律推断其化学成分结构并与 8 种对照品碎片离子信息进行比对,最终在负离子模式下确认 1~8 号共有峰为水溶性丹酚酸类化合物,正离子模式确认 9~15 号共有峰为丹参酮类化合物^[15-17],结果见表 6。质谱离子流图见图 3。

表 6 丹参 15 个共有峰质谱分析

Tab.6 Spectrometry analysis of 15 common peaks of *Salvia miltiorrhiza*

峰号	化合物	保留时间/min	分子式	相对分子质量	MS(<i>m/z</i>)
1	丹参素	4.84	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.2	197.0[M-H] ⁻
2	迷迭香酸	27.09	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360.3	359.1[M-H] ⁻
3	紫草酸	29.48	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	538.5	537.0[M-H] ⁻
4	丹酚酸 B	36.32	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.6	717.1[M-H] ⁻
5	丹酚酸 E	39.70	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.6	717.1[M-H] ⁻
6	紫草酸甲酯	46.44	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₂	552.5	551.0[M-H] ⁻
7	丹参酸甲酯	51.19	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338.4	337.1[M-H] ⁻
8	丹酚酸 F	53.90	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.3	313.0[M-H] ⁺
9	二氢丹参酮 I	56.08	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	278.3	279.0[M+H] ⁻
10	1,2-去氢隐丹参酮	58.10	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294.3	295.1[M+H] ⁺
11	隐丹参酮	60.74	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	296.4	297.1[M+H] ⁻
12	丹参酮 I	61.97	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	276.3	277.0[M+H] ⁺
13	1,2-二氢丹参酮	64.51	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	278.3	279.0[M+H] ⁺
14	去氢丹参新酮	66.05	C ₁₉ H ₂₀ O ₂	280.4	281.0[M-H] ⁻
15	丹参酮 II A	67.75	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294.3	295.1[M+H] ⁺



a. 丹参对照品负离子流图; b. 丹参对照品正离子流图;
c. 丹参样品负离子流图; d. 丹参样品正离子流图

图 3 质谱离子流图

Fig.3 Ion flow diagram of mass spectrum

2.7 统计与分析

2.7.1 *t* 检验分析

灭菌前后 10 批丹参中 8 种化合物含量、总含量及 DPPH·清除率分别经 *t* 检验分析,均无显著性差异($P>0.05$),结果见表 7。

表 7 *t* 检验分析表

Tab.7 Analysis table of *t* test

样本	处理方式	($\bar{x}\pm S$)/%	<i>P</i>
丹参素	灭菌前	0.351±0.008	0.181
	灭菌后	0.332±0.004	
迷迭香酸	灭菌前	0.126±0.011	0.374
	灭菌后	0.129±0.010	
紫草酸	灭菌前	0.176±0.212	0.709
	灭菌后	0.172±0.265	
丹酚酸 B	灭菌前	2.796±0.377	0.522
	灭菌后	2.844±0.324	
二氢丹参酮 I	灭菌前	0.134±0.517	0.694
	灭菌后	0.143±0.556	
隐丹参酮	灭菌前	0.121±0.474	0.648
	灭菌后	0.126±0.522	
丹参酮 I	灭菌前	0.139±0.060	0.441
	灭菌后	0.157±0.070	
丹参酮 II A	灭菌前	0.130±0.053	0.746
	灭菌后	0.135±0.057	
总含量	灭菌前	3.661±0.580	0.816
	灭菌后	3.742±0.551	
DPPH·清除率	灭菌前	80.69±1.833	0.922
	灭菌后	81.79±1.583	

2.7.2 聚类分析

将灭菌前后 10 批丹参 15 种化合物色谱峰面积数据采用 SPSS 软件标准化处理后,导入 OriginPro 2022 软件,以平均值为连接, Euclidean 距离为测度进行系统聚类分析,生成聚类分析热图,结果见图 4。10 个不同批次丹参样品根据不同成分的差异性分为 3 类,第 1、5、9 批丹参样本聚为一类,第 2、7、6 批丹参样本聚为一类,第 3、4、8、10 批丹参样本聚为一类,同一批次样品灭菌前后依然聚为一类,表明瞬时高温灭菌后丹参药材质量稳定。

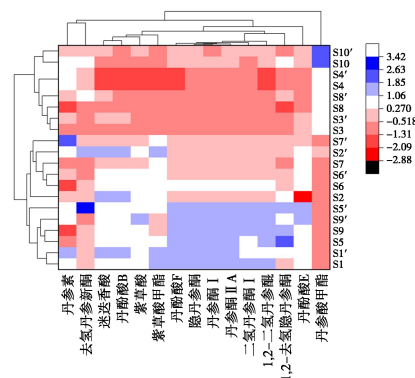


图 4 聚类分析热图

Fig.4 Heat map of cluster analysis

2.7.3 OPLS-DA 分析

为了进一步判别区分 10 个不同批次丹参的差异化标志物,采用 OPLS-DA 法化学计量学中经典的模式识别方法,通过寻找解释变量的线性子空间,使高度多维数据的自变量 X 与相应的因变量 Y 之间的协方差最大化,完成新的子空间基于减少的因素实现 Y 变量的预测^[18]。将灭菌前后 10 批丹参数据导入 SIMCA 软件,进行 OPLS-DA 分析,散点得分图和变量重要性投影 (VIP) 值见图 5、6,在得分散点图上呈现出明显的 3 组分类,与聚类分析结果一致。VIP>1 的成分贡献率大,可以作为区分不同批次丹参的指标性成分,紫草酸甲酯>丹酚酸 B>丹参酸甲酯>丹参酮 I>隐丹参酮>丹酚酸 F>丹参酮 II A>二氢丹参酮 I。

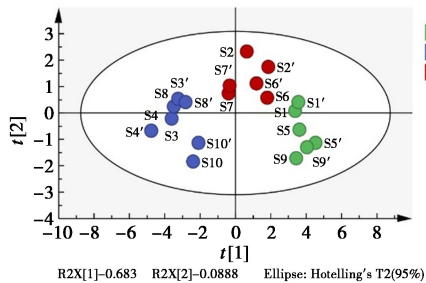


图 5 PLS-DA 得分图

Fig.5 PLS-DA Score chart

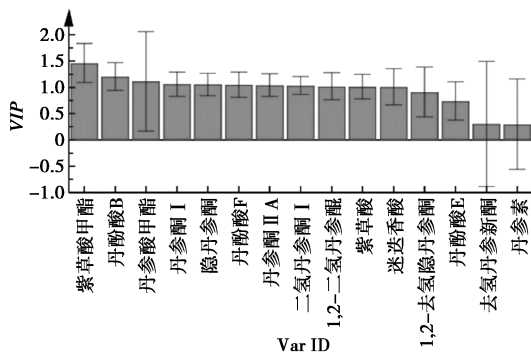


图 6 OPLS-DA 分析不同成分 VIP 值

Fig.6 OPLS-DA analyzed VIP values of different components

2.7.4 谱效关系分析

以 10 批指纹图谱中 15 个共有峰的峰面积为自变量 X , 与其对应的 DPPH·清除率为因变量 Y , 导入 SIMCA-P 14.1 软件中,作偏最小二乘回归分析 (PLS-DA), 计算标准化回归系数和变量重要性投影 VIP 值^[19]。当回归系数为正值时自变量和因变量呈正相关, 回归系数为负值时呈负相关, 丹参素、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 E、紫草酸甲酯、丹参酸甲酯、丹酚酸 F、去氢丹参新酮

与丹参抗氧化活性呈正相关, 如图 7 所示, 说明丹参中上述成分含量增加时, 丹参抗氧化活性增强。VIP 值由大到小的顺序为迷迭香酸>丹酚酸 B>紫草酸>丹酚酸 F>紫草酸甲酯>丹参酸甲酯>丹酚酸 E>丹参素>去氢丹参新酮, 其中迷迭香酸、丹酚酸 B、紫草酸、丹酚酸 F 这 4 种成分 VIP>1, 见图 8, 与抗氧化活性呈强正相关。PLS-DA 预测得到的 15 种化学成分抗氧化活性大小与 2.3.1 中丹参 8 种化合物单体 DPPH·抗氧化活性规律基本一致, 丹参中迷迭香酸、丹酚酸 B、紫草酸、丹酚酸 F 可作为衡量丹参 DPPH·抗氧化活性质量标志物。Saw 等^[20]和赵雪魏等^[21]用 NMR 分析几种含邻二酚羟基的儿茶素单体与 DPPH·反应后的瞬间产物, 检测到产生邻苯醌结构, 这表明儿茶素抗氧化机理是由于 B 环邻二酚羟基被氧化形成邻苯醌结构, 而丹参水溶性成分分子中均含有 1~4 对邻二酚羟基结构, 这是它们 DPPH·抗氧化活性强的结构基础; 丹参中脂溶性成分 DPPH·抗氧化活性不显著, 与其结构中邻苯醌不能被氧化供氢产生自由基有关。

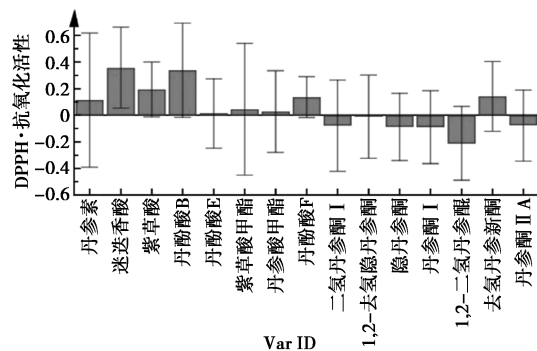


图 7 丹参 15 个共有峰偏最小二乘回归系数

Fig.7 15 peak-partial least squares regression coefficients of *Salvia miltiorrhiza*

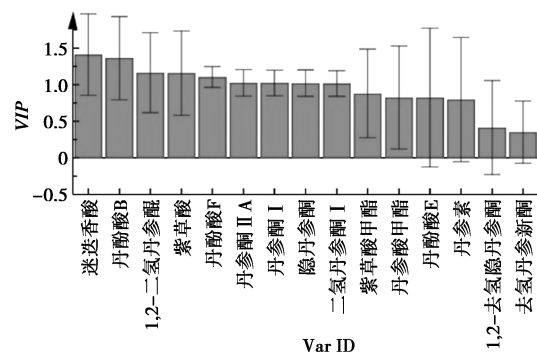


图 8 丹参 15 个共有峰变量重要性 (VIP) 值

Fig.8 Variable importance (VIP) values of 15 common peak of *Salvia miltiorrhiza*

3 结论

瞬时高温灭菌前后丹参微生物限度检查、8 种化合物含量、DPPH· 抗氧化活性检测、丹参指纹图谱相似度分析和 HSC-T6 细胞存活率分析结果显示瞬时高温灭菌对丹参质量及安全性无影响。紫草酸甲酯、丹酚酸 B、丹参酸甲酯、丹参酮 I、隐丹参酮、丹酚酸 F、丹参酮 II A、二氢丹参酮 I 为丹参质量差异标志物;迷迭香酸、丹酚酸 B、紫草酸、丹酚酸 F 为抗氧化活性的质量标志物。本研究为瞬时高温灭菌技术在丹参生产中的应用、质量控制及抗氧化活性物质基础的确定提供科学依据。

参考文献:

- [1] 单晓晓,洪帮振,刘洁,等.丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J].中国中药杂志,2021,46(21):5 496-5 511.
- [2] 冯科冉,李伟霞,王晓艳,等.丹参化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J].中草药,2022,53(2):609-618.
- [3] 万新焕,王瑜亮,周长征,等.丹参化学成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2020,51(3):788-798.
- [4] 贾巧,陈华,赵荣华,等.基于抗氧化活性的丹参药品质量评价研究[J].中成药,2015,37(3):667-670.
- [5] 张春梅,王振彬.HPLC 测定不同灭菌方法后丹参药材中丹参酮 II A 的含量变化[J].河北中医药学报,2005,(2):33-34.
- [6] 华方波,赵焕君,白俊楠,等.辐照灭菌对丹参中丹参酮 II A 含量的影响[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(6):55-56.
- [7] 武娜,张利红,万露,等.丹参微波灭菌工艺优化及评价[J].解放军药学报,2015,31(4):288-290.
- [8] 张婷,焦连庆,刘融融,等.基于多指标分析优化苦丁茶冬青瞬时高温灭菌工艺[J].食品工业科技,2023,44(8):205-211.
- [9] 栾依琳,焦连庆,权兴周,等.瞬时高温灭菌对甘草药材质量的影响[J/OL].吉林农业大学学报,2023,doi:10.13327/j.jjlau.2023.20029.
- [10] 陈子涵,杨建波,陈智伟,等.何首乌醇提物及单体体外肝细胞毒性研究[J].中国药物警戒,2022,19(7):728-732.
- [11] 中华人民共和国药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [12] 杨贵雅,薛紫鲸,张丹,等.基于指纹图谱和多成分含量测定的丹参药材皮部和木部化学成分比较研究[J].中草药,2019,50(21):5 328-5 335.
- [13] 陈仁强,刘楨,胡慧玲,等.紫花地丁总香豆素提取工艺优化及其抗氧化和抗肿瘤活性考察[J].中国药房,2022,33(20):2 471-2 476.
- [14] 赵灿,李志,马晓东.新型唑啉酮类衍生物的设计、合成与体外抗肿瘤活性评价[J].化学试剂,2023,45(12):112-117.
- [15] 董昕,徐立,姜子洋.丹参药材中水溶性及脂溶性成分的电喷雾离子阱质谱研究[J].中国药理学杂志,2010,45(14):1 048-1 054.
- [16] 陈琴华,熊琳.电喷雾离子阱质谱检测隐丹参酮的正离子裂解途径[J].现代中药研究与实践,2016,30(1):9-12.
- [17] 赵国欣,刘萌,李领川,等.超高效液相色谱-质谱联用同时测定丹参中 7 种成分含量[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(1):60-63.
- [18] 王巧,于永杰,付海燕,等.基于多指标含量测定结合化学计量学的不同产地丹参品质差异分析[J].分析测试学报,2023,42(4):389-401.
- [19] 彭丽颖,梁悦,施君君,等.丹参 HPLC 指纹图谱及总抗氧化活性谱效关系研究[J].中药药理与临床,2022,38(3):110-115.
- [20] SAW Y, SAKATA K. NMR analytical approach to clarify the antioxidative molecular mechanism of catechins using 1, 1-diphenyl-1, 2-piroylhydrazyl [J]. Agric. Food Chem., 1998, 46(1):111-114.
- [21] 赵雪巍,刘培玉,刘丹,等.黄酮类化合物的构效关系研究进展[J].中草药,2015,46(21):3 264-3 271.

基于气相色谱质谱研究肺癌呼气特征性挥发有机化合物

吕伟¹, 石雯闽¹, 尹怡², 王祥麒², 冯卫生¹, 张志娟^{*1,3}

(1.河南中医药大学 药学院,河南 郑州 450056;2.河南中医药大学第三附属医院 肿瘤科,河南 郑州 450056;

3.暨南大学 质谱仪器与大气环境研究所,广东 广州 510632)

摘要:对肺癌患者呼出气体中挥发性有机化合物(VOCs)进行定性定量检测,研究肺癌患者呼气 VOCs 浓度变化,筛查肺癌特异性呼气 VOCs。应用气相色谱质谱联用仪(GC-MS)检测 360 例受试者的呼气 VOCs 样品,包括 134 名健康志愿者、176 名肺癌患者和 50 名乳腺癌患者。每个受试者采集 3 个平行样以及 1 个室内环境样。对检测到的挥发性有机物(VOCs)进行定量分析,联合使用 Mann-Whitney U 检验和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)模型筛选出 8 种肺癌患者呼气特征性 VOCs,包括顺式-2-丁烯、苯、1,2-二氯丙烷、三氯乙烯、4-甲基-2-戊酮、3-甲基戊烷、正辛烷和萘。模型诊断的准确度、精度、灵敏度和特异性分别为 95.41%、95.15%、93.99%和 96.67%,F1 分数为 94.51%,诊断性能好。综上,以上 8 种 VOCs 可作为肺癌患者的呼气特征性 VOCs,为肺癌的早期呼气诊断提供新的数据支撑和方法。

关键词:气相色谱质谱联用仪;VOCs;特征性;肺癌;呼气

中图分类号:O657 文献标识码:A 文章编号:0258-3283(2024)06-0017-09

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0812

Application of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) on Characteristic Breath Volatile Organic Compounds of Lung Cancer LV Wei¹, SHI Wen-min¹, YIN Yi², WANG Xiang-qi², FENG Wei-sheng¹, ZHANG Zhi-juan^{*1,3}

(1.College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450056, China; 2.Department of Oncology, The Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450056, China; 3.Institute of Mass Spectrometer and Atmospheric Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The volatile organic compounds (VOCs) in the exhaled breath of lung cancer patients were analyzed, and the concentration changes of sampled VOCs were evaluated. Finally, the characteristic VOCs of lung cancer were screened out. A total of 360 subjects were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), including 134 healthy individuals, 176 lung cancer patients and 50 breast cancer patients. Three parallel samples and one indoor air sample were collected for each subject. Volatile organic compounds (VOCs) were quantitatively analyzed. Furthermore, 8 potential characteristic VOCs for lung cancer patients were screen out by using orthogonal partial least-squares discrimination analysis (OPLS-DA) model combined with Mann-Whitney test, including *cis*-2-butene, benzene, 1, 2-dichloropropane, trichloroethylene, 4-methyl-2-pentanone, 3-methylheptane, *n*-octane and naphthalene. In addition, the diagnostic accuracy, precision, sensitivity and specificity were 95.41%, 95.15%, 93.99%, and 96.67%, respectively, while the F1 ratio was 94.51%. In conclusion, these 8 VOCs can be taken as characteristic breath VOCs of lung cancer patients, providing new ideas and methods for early respiratory diagnosis of lung cancer.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry; VOCs; characteristic; lung cancer; breath

据 WHO 统计,仅 2020 年全球就有 220 万新发肺癌患者,约占所有新发癌症患者的 11.4%,肺癌新发死亡人数约 180 万,约占所有癌症患者的 18%^[1]。约 85% 的肺癌患者被确诊时已为晚期,其 5 年存活率仅为 3.5%^[2,3]。目前,常规的肺癌检测技术包括计算机断层扫描(CT)、胸部 X 射线(CXR)、痰细胞学检查、低剂量 CT (LDCT)和活检。然而,这些方法存在入侵性、假阳性高和辐射暴露风险等缺点^[4-6]。因此寻找一种快速、非

收稿日期:2023-12-15;网络首发日期:2024-03-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21878122);广州市科技新星资助项目(201710010053)。

作者简介:吕伟(1989-),女,河南郑州人,硕士生,主要研究方向为肺癌呼气早期诊断。

通讯作者:张志娟, E-mail: zhangyan0204@126.com。

引用本文:吕伟,石雯闽,尹怡,等.基于气相色谱质谱研究肺癌呼气特征性挥发有机化合物[J].化学试剂,2024,46(6):17-25。

侵入、无辐射且经济有效的早期肺癌检测技术迫在眉睫。

近年来,呼气诊断由于其无创性、样品易得、患者可接受程度高和灵敏度高等优点,在肺癌及肺部炎症患者领域的应用备受关注。气相色谱-质谱联用法(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)作为传统的挥发性有机物(Volatile organic compounds, VOCs)分析方法在呼气 VOCs 标志物筛查领域的应用也日益拓展。早在 1985 年, Gordon 等^[7]首次采用气相色谱-质谱法对肺癌患者呼气中 VOCs 进行了检测分析,引发了人们对呼气 VOCs 用于肺癌诊断的探索。谢少华等^[8]应用 GC-MS 研究了呼出气 VOCs 对 50 岁以下人群患良/恶性肺结节的预测价值,发现环戊烷、3-甲基戊烷和乙苯可以作为区分肺结节良/恶性的特征性 VOCs。Zou 等^[9]研究发现将机器算法和呼气分析相结合,置信样本区分肺癌患者和健康志愿者的准确率可达 93%。茹立华等^[10]应用 TD-GC-MS 探究 79 名肺癌患者和 101 名健康志愿者,检测到 10 种特征性 VOCs,其模型准确率为 96.25%。然而,肺癌呼气特征性 VOCs 的分析和筛查与样本量大小和实验队列设计等因素密切相关,先前的研究大多单纯地将健康对照和肺癌患者进行了比较^[9,11-13],缺乏肺癌与其他癌症特征性 VOCs 的筛选和对比,可能导致一些特征性 VOCs 出现假阳性的结果。

基于此,本研究将应用热脱附-气相色谱-质谱联用法(TD-GC-MS)对肺癌患者的呼气 VOCs 进行定性定量分析,并通过与乳腺癌患者和健康对照组呼气 VOCs 比较,运用统计学的方法研究肺癌患者呼气 VOCs 与乳腺癌患者及健康人群的呼气 VOCs 的差异性,筛查肺癌患者的呼气特征性 VOCs,运用机器学习模型决策树(DT)、逻辑回归(LR)、支持向量(SVM)和朴素贝叶斯(NB)验证这些特征性 VOCs 的准确性并探究其来源和代谢途径,为呼气诊断运用于肺癌提供新的思路和方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

BPG-9070A 型鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);QP2020 NX 型 GC-MS 分析仪(岛津企业管理有限公司);U-KORI-XR 型热脱附仪

(英国 Markes 国际有限公司);1 L Tedlar 袋(大连德霖有限公司)。

高纯氮气、高纯氦气(99.999%、河南迎众化工产品有限公司)。

1.2 研究对象与分组

本研究于 2021 年 11 月至 2023 年 7 月在河南中医药大学和河南中医药大学第三附属医院肿瘤科进行,共采集呼气样本 360 例,其中肺癌患者 176 例,乳腺癌患者 50 例,健康人群 134 例,其人口统计学特征如表 1 所示,受试者在采集样品前签署受试者信息调查表和知情同意书。肺癌患者入组标准:经病理学或支气管镜检查确诊为肺癌患者,年龄>18 岁,排除患有其他肿瘤、慢性呼吸道疾病,不能配合呼气采集或者在任何阶段要求终止实验的患者。乳腺癌患者入组标准:经穿刺或活检证实为乳腺癌患者,没有肺部转移,年龄>18 岁,排除标准如肺癌。健康对照组没有任何肺部和乳腺疾病。

表 1 参与者基本特征^注

Tab.1 Basic characteristics of participants

变量	健康对照 (n = 134)	肺癌组 (n = 176)	乳腺癌组 (n = 50)
年龄/岁	23.12±4.67	62.03±9.70	52.48±10.70
性别/%			
男	33.33	55.70	N/A
女	66.67	45.30	100.00
身高/m	1.67±0.08	1.66±0.08	1.61±0.04
体重/kg	61.50±12.76	65.55±14.40	52.48±10.70
体重指数/(kg·m ⁻²)	21.78±3.20	23.63±4.55	23.10±3.54
合并疾病			
高血压	N/A	15.64	14.00
2 型糖尿病	N/A	8.38	16.00
吸烟史/%			
吸烟	2.96	2.23	N/A
戒烟	2.22	36.31	N/A
从不吸烟	94.81	61.45	100.00

注:N/A;Not applicable。

1.3 呼气样品采集

呼出气体采集在固定的房间进行,为排除食物等外源性污染,受试者在采样前遵循以下原则:

(1)采样前 8 h 禁烟禁酒禁食且采样时空腹,不刷牙,不涂抹化妆品。

(2)采样开始前漱口,采样时平静呼气 15 min,排除因剧烈活动引起的异戊二烯升

高^[14],深呼吸 3 次后憋气 10 s(鼻吸口呼),最后通过一次性吹嘴将气体吹入 1 L Tedlar 袋中,如吹不满重复上述操作,直至吹满为止。

(3) 每个参与者采集 3 个平行样,为了排除环境的干扰,同时采集环境样作为背景气。

呼出气体采集完成后对样品编号,将样品保存在 4 ℃ 恒温保温箱避光保存,在 2 h 内运回实验室,24 h 内完成分析。

1.4 呼气检测

使用 GC-MS,所用色谱柱包括 DB-1(60.0 m×0.25 mm×1 μm) 和 Rt-Alumina BOND/Na₂SO₄(30.0 m×0.32 mm×5 μm),同时搭载中心切割系统,能将 C2 和 C3 物质更好的分离。采集的呼出气经热脱附预浓缩后进行检测。GC-MS 的分析条件如表 2 所示。

表 2 GC-MS 分析操作条件

Tab.2 Operating conditions of analysis GC-MS		
步骤	参数	数值
GC 分析	载气	氦气
	柱温箱升温程序	35 ℃ 维持 1 min
		5 ℃/min 升至 100 ℃
MS 分析	离子源	10 ℃/min 升至 190 ℃,维持 10 min
		EI(70 eV)
		200 ℃
MS 分析	接口温度	200 ℃
	离子源温度	200 ℃

1.5 数据分析

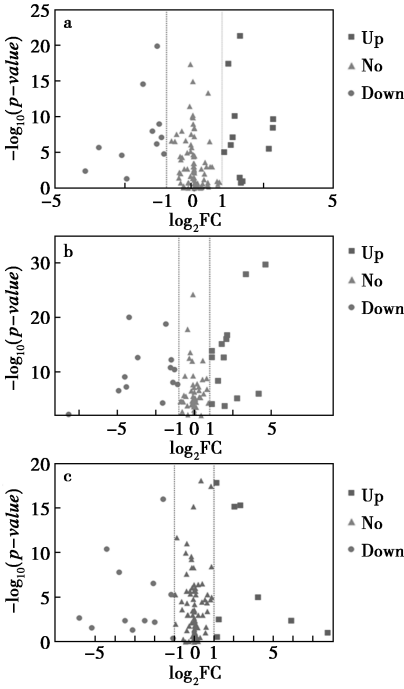
采用 GC-MS solution 对呼气样本中的 VOCs 进行定性和定量,对 360 个呼气样本进行 Mann-Whitney 检验(U 检验)以及正交偏最小二乘判别(OPLS-DA)分析,选定 $P<0.05$ 以及变量投影重要值(Variable influence in projection, VIP) ≥ 1.5 的 VOCs 为特征性 VOCs,将呼气样本中选定的特征性 VOCs 划分为 60% 的训练集和 40% 的验证集,构建不同的机器学习模型,分析其准确度、精准度、灵敏度和特异性,进一步验证特征性 VOCs 对肺癌的诊断性能。根据京都基因与基因组百科全书(KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) 数据库对代谢物进行定性评估,对 $P<0.05$ 的物质进行代谢途径 KEGG 富集分析,探究呼出气体潜在的代谢途径。

2 结果与讨论

2.1 呼出气体中特征性 VOCs

将采集到的肺癌患者、乳腺癌患者和健康对照组的呼出气体 VOCs 进行 GC-MS 分析,依据差

异倍数 $\log_2FC>1$ 且 $P<0.05$,将检测到的 VOCs 绘制火山图,如图 1 所示。从图中可以看出,部分 VOCs 在肺癌患者、乳腺癌和健康人群中分别呈现不同上调和下调趋势,说明 VOCs 在不同的癌症患者和健康人群中有一定的差异。



HC:健康志愿者;LC:肺癌患者;BC:乳腺癌患者
a.HC & LC;b.HC & BC;c.LC & BC

图 1 VOCs 在不同人群中表现的火山图

Fig.1 Volcano map of VOCs in different populations

2.1.1 健康对照组、肺癌患者和乳腺癌患者呼出气体中特征性 VOCs

OPLS-DA 是一种有监督的判别分析方法,在降维的同时考虑了分组信息,目前广泛用于特征选择及分类^[15]。本研究将测得的健康对照组、肺癌患者和乳腺癌患者的 VOCs 浓度信息建立 OPLS-DA 模型,如图 2 所示。从图 2a 可以看出,健康人群、肺癌患者和乳腺癌患者的呼气 VOCs 存在显著差异,组内聚集性良好,在 95% 的置信区间内组间差异明显。此外,如图 2b 所示,模型中 R^2 和 Q^2 分别为 0.880 和 0.930,表明模型拟合的主成分有良好的解释能力,同时预测的准确率高达 93%。为了防止 OPLS-DA 模型出现过拟合,本研究进行了 200 次交叉置换检验验证,发现 R^2 和 Q^2 均低于原始数据,如图 2c 所示,说明模型不存在过拟合且具有良好的稳定性和可靠性。因此基于 OPLS-DA 分类,健康人群、肺癌患者和乳腺癌患者可以进行区分。

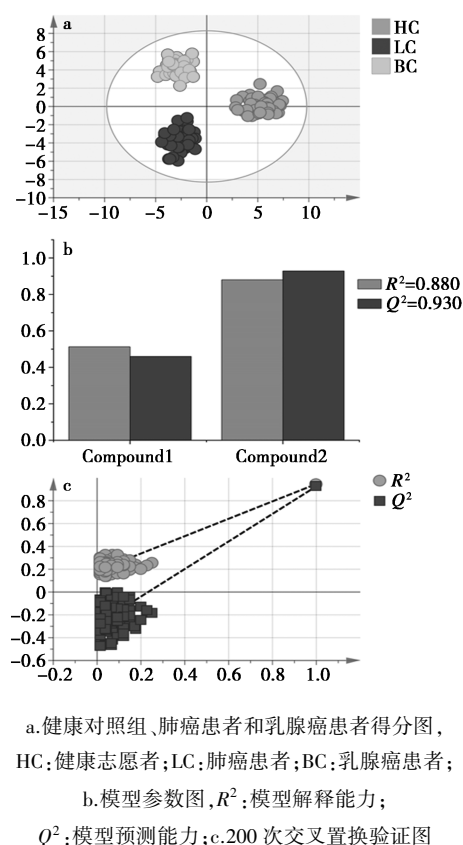


图2 健康参与者、肺癌患者和乳腺癌患者 OPLS-DA 模型图

Fig.2 OPLS-DA model for healthy participants, lung cancer patients, and breast cancer patients

2.1.2 肺癌患者呼出气体中特征性 VOCs

为进一步探究肺癌患者呼气中的特征性 VOCs,将测得的健康对照组和肺癌患者的 VOCs 浓度建立 OPLS-DA 模型,如图 3 所示。从图 3a 可以看出,肺癌患者和健康人群的呼气 VOCs 存在显著差异,组内聚集性良好,在 95%的置信区间内组间差异明显。此外,如图 3b 所示,模型中 R^2 和 Q^2 分别为 0.870 和 0.863,表明模型拟合的

主成分有良好的解释能力,同时预测的准确率达 86.3%。为了防止 OPLS-DA 模型出现过拟合,本研究进行了 200 次交叉置换检验验证,发现 R^2 和 Q^2 均低于原始数据,如图 3c 所示,说明模型不存在过拟合且具有良好的稳定性和可靠性。基于 OPLS-DA 分类,进一步的,将模型贡献较大的变量信息以 VIP 值来衡量。如图 3d 和表 3 所示,当 $VIP \geq 1.5$ 时,共筛选出 8 种存在显著差异的 VOCs ($P < 0.05$)。因此,顺式-2-丁烯、苯、1,2-二氯丙烷、三氯乙烯、4-甲基-2-戊酮、3-甲基戊烷、正辛烷和萘可作为肺癌的特征性 VOCs。特征性 VOCs 的浓度变化箱式图具体如图 4 所示,其中苯、萘、三氯乙烯和正辛烷的浓度在肺癌患者中表现为下降,顺式-2-丁烯、1,2-二氯丙烷、4-甲基-2-戊酮和 3-甲基戊烷的浓度在肺癌患者中表现为上升。

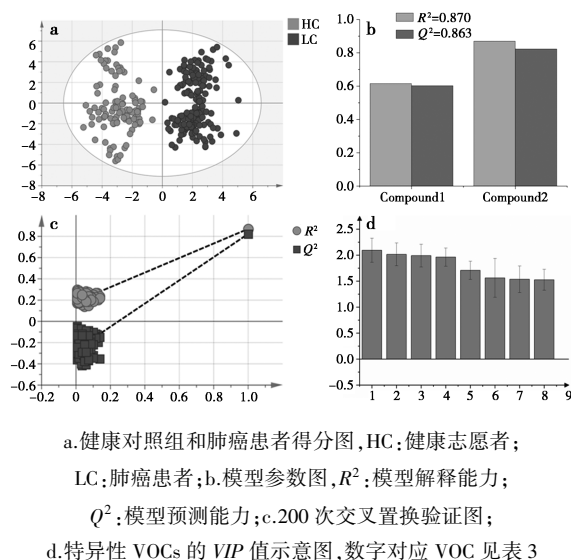


图3 健康志愿者和肺癌患者 OPLS-DA 模型图

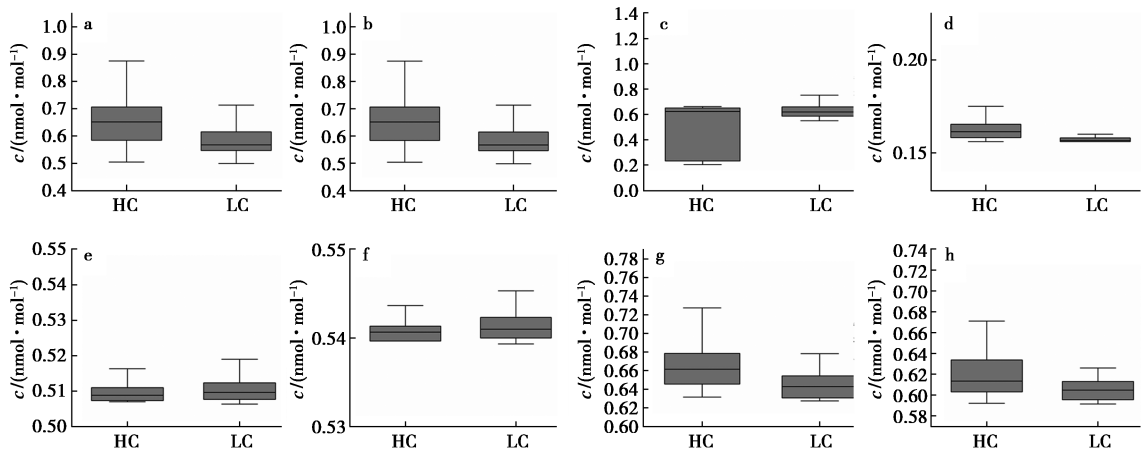
Fig.3 OPLS-DA model of healthy controls and lung cancer patients

表3 肺癌患者特征 VOCs 代谢信息表^注

Tab.3 Characteristic breath VOCs metabolic information of lung cancer patients

序号	VOCs	CAS	P 值	AUC	中位数/(nmol·mol ⁻¹)	平均值/(nmol·mol ⁻¹)	最大值/(nmol·mol ⁻¹)	趋势
1	顺式-2-丁烯	590-18-1	<0.001 ***	0.723	0.401	0.368	0.521	↑ ¹⁾
2	苯	71-43-2	<0.001 ***	0.741	0.567	0.587	0.829	↓ ²⁾
3	戊醛	110-62-3	<0.001 ***	0.780	0.592	0.416	1.025	↑ ¹⁾
4	三氯乙烯	75-09-2	<0.001 ***	0.802	0	0.434	0.167	↓ ¹⁾
5	4-甲基-2-戊酮	108-10-1	<0.001 ***	0.837	0.510	0.451	0.531	↑ ¹⁾
6	2,3,4-三甲基戊烷	589-81-1	<0.001 ***	0.811	0.541	0.480	0.569	↑ ¹⁾
7	正辛烷	111-65-9	<0.001 ***	0.763	0.666	0.645	0.708	↓ ¹⁾
8	萘	91-20-3	<0.001 ***	0.706	0.616	0.605	0.686	↓ ²⁾

注:***:具有显著统计学意义;1)“↑”为与健康志愿者比较浓度上升;2)“↓”与健康志愿者相比浓度下降。



a.顺式-2-丁烯;b.苯;c.1,2 二氯丙烷;d.三氯乙烯;e.4-甲基-2-戊酮;f.2,3,4-三甲基戊烷;g.正辛烷;h.萘

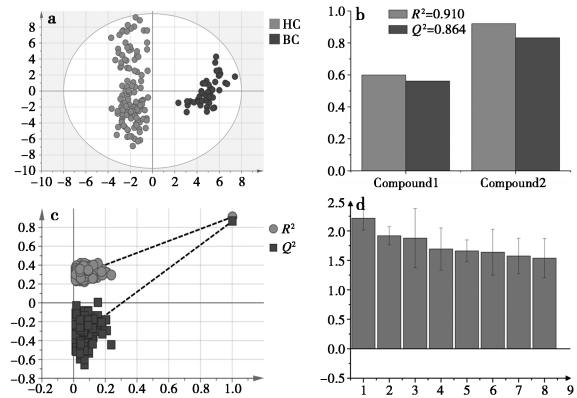
图 4 肺癌患者和健康对照组呼气中 8 种特征性 VOCs 的浓度差异

Fig.4 Differences in the concentration of eight characteristic breath VOCs of lung cancer patients and healthy control

2.1.3 乳腺癌患者呼出气体 VOCs 特征

从图 5a 可以看出,乳腺癌和健康人群呼气样本存在显著差异,在 95%的置信区间内组间差异明显,组内聚集性良好。此外,如图 5b 所示,模型中 R^2 和 Q^2 分为 0.910 和 0.864,表明模型拟合的主成分有良好的解释能力,同时预测的准确率高达 86.4%。图 5c 给出了 200 次交叉置换检验验证图,发现 R^2 和 Q^2 均低于原始数据,说明 OPLS-DA 模型不存在过拟合且具有良好的稳定性和可靠性。对于乳腺癌患者和健康对照组,基于 OPLS-DA 模型对贡献相对较大的变量信息以 VIP 值来衡量。如图 5d 和表 4 所示,当 $VIP \geq 1.5$ 时,共发现 8 种具有显著差异的 VOCs ($P < 0.05$)。依据建立的 OPLS-DA 模型,乙烯、正丁醛、1-己烯、三氯甲烷、苯、戊醛、4-甲基-2-戊酮和正辛烷可作为乳腺癌的特征性 VOCs,其中 4-甲基-2-戊酮、正辛烷和苯同时在肺癌患者和乳腺癌患者中被发现,这 3 种 VOCs 有可能是肺癌和乳腺癌共有的标志物,其中 4-甲基-2-戊酮在乳腺癌患者中同样

表现为浓度上升,而正辛烷和苯的浓度在乳腺癌患者中也表现为下降。



a.健康对照组和乳腺癌患者得分图,HC:健康志愿者;

BC:乳腺癌患者;b.模型参数图, R^2 :模型解释能力;

Q^2 :模型预测能力;c.200 次交叉置换验证图;

d.特征性 VOCs 的 VIP 值示意图,数字对应 VOC 如表 4 所示

图 5 健康参与者和乳腺癌患者 OPLS-DA 模型图

Fig.5 OPLS-DA model of healthy controls and breast cancer patients

表 4 乳腺癌患者特征 VOCs 代谢信息表^注

Tab.4 Characteristic breath VOCs metabolic information of breast cancer patients

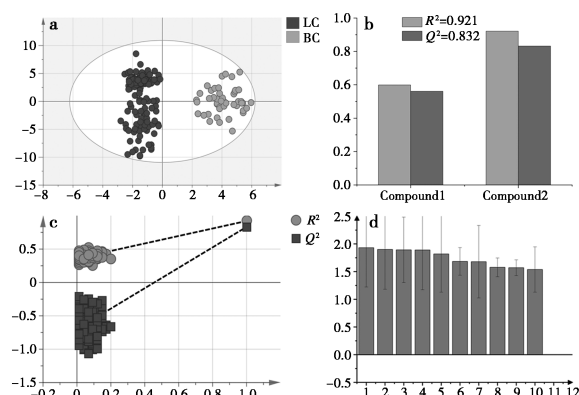
序号	VOCs	CAS	P 值	AUC	中位数/(nmol·mol ⁻¹)	平均值/(nmol·mol ⁻¹)	最大值/(nmol·mol ⁻¹)	趋势
1	乙烯	74-85-1	<0.001 ***	0.955	0.023	0.089	1.670	↓ ²⁾
2	正丁醛	123-72-8	<0.001 ***	0.856	0.603	0.478	0.806	↑ ¹⁾
3	1-己烯	592-41-6	<0.001 ***	0.948	0.579	0.774	3.320	↑ ¹⁾
4	三氯甲烷	67-66-3	<0.001 ***	0.869	1.778	1.752	3.238	↓ ²⁾
5	苯	71-43-2	<0.001 ***	0.865	0.544	0.548	0.669	↓ ²⁾
6	戊醛	110-62-3	<0.001 ***	0.955	0.630	0.598	0.765	↓ ²⁾
7	4-甲基-2-戊酮	108-10-1	<0.001 ***	0.859	0.510	0.494	0.517	↑ ¹⁾
8	正辛烷	111-65-9	<0.001 ***	0.995	0.630	0.630	0.641	↓ ²⁾

注;***:具有显著统计学意义;1)“↑”与健康志愿者比较浓度上升;2)“↓”与健康志愿者相比浓度下降。

2.1.4 与乳腺癌患者比较,肺癌患者呼出气体 VOCs 特征

为了探究不同疾病中呼气特征性 VOCs 的不同,将乳腺癌患者呼气 VOCs 作为疾病对照组,与肺癌患者的呼气 VOCs 进行比较,如图 6a 所示。从图中可以看出,乳腺癌患者和肺癌患者的呼气 VOCs 存在显著差异,在 95% 的置信区间内组间差异明显,组内聚集性良好。此外,如图 6b 所示,模型中 R^2 和 Q^2 为 0.921 和 0.832,表明模型拟合的主成分有良好的解释能力,同时预测的准确率高达 83.2%。此外,根据 200 次交叉置换检验(图 6c), R^2 和 Q^2 均低于原始数据,说明模型不存在过拟合且具有良好的稳定性和可靠性。当 VIP 值 ≥ 1.5 时,共筛选出 10 种存在显著性差异的 VOCs ($P < 0.05$),如图 6d 和表 5 所示。依据建立的 OPLS-DA 模型,顺式-2-丁烯、乙烯、丙烷、1-戊烯、1-己烯、2,3,4-三甲基戊烷、正辛烷、间对二甲苯和邻二甲苯在肺癌患者与乳腺癌患者中有较大差异。其中正辛烷同时在肺癌和乳腺癌患者中被发现,可能是两种癌症共同的特征性 VOCs,但

在肺癌和乳腺癌患者中的浓度差异不同,虽然在乳腺癌患者和肺癌患者中浓度均下降,但肺癌患者呼气中的浓度仍要高于乳腺癌患者。



a. 肺癌患者和乳腺癌患者得分图, LC: 肺癌患者; BC: 乳腺癌患者; b. 模型参数图, R^2 : 模型解释能力; Q^2 : 模型预测能力; c. 200 次交叉置换验证图; d. 异性 VOCs 的 VIP 值示意图, 数字对应 VOC 如表 5 所示

图 6 肺癌患者和乳腺癌患者 OPLS-DA 模型图

Fig.6 OPLS-DA model of lung cancer patients and breast cancer patients

表 5 肺癌患者与乳腺癌患者呼气中 VOCs 的特征^注

Tab.5 Characteristic breath VOCs between lung cancer patients and breast cancer patients

序号	VOCs	CAS	P 值	AUC	中位数/(nmol·mol ⁻¹)	平均值/(nmol·mol ⁻¹)	最大值/(nmol·mol ⁻¹)	趋势
1	顺式-2-丁烯	590-18-1	<0.001 ***	0.832	0.405	0.368	0.520	↑ ¹⁾
2	乙烯	74-85-1	<0.001 ***	0.812	0.167	1.630	7.066	↓ ²⁾
3	丙烷	74-98-6	<0.001 ***	0.882	1.475	0.771	1.111	↓ ²⁾
4	1-戊烯	109-67-1	<0.001 ***	0.770	0.576	0.420	1.585	↑ ¹⁾
5	1-己烯	592-41-6	<0.001 ***	0.856	0	0.227	3.080	↓ ²⁾
6	2,3,4-三甲基戊烷	565-75-3	<0.001 ***	0.822	0.460	0.440	0.468	↓ ²⁾
7	正辛烷	111-65-9	<0.001 ***	0.881	0.643	0.645	0.708	↑ ¹⁾
8	乙苯	100-41-4	<0.001 ***	0.918	1.307	1.330	1.955	↓ ²⁾
9	间对二甲苯	106-423/108-38-3	<0.001 ***	0.915	1.100	1.182	3.785	↓ ²⁾
10	邻二甲苯	95-47-6	<0.001 ***	0.911	0.823	0.865	2.231	↓ ²⁾

注: ***: 具有显著统计学意义; 1) “↑”与乳腺癌患者比较浓度上升; 2) “↓”与乳腺癌患者相比浓度下降。

2.2 肺癌特征 VOCs 的相关信息

为进一步了解 8 种特征性 VOCs 对肺癌的诊断能力, 计算肺癌患者筛选出的 8 种特征 VOCs 曲线下面积 (Area under the curve, AUC) 及其联合诊断能力, 具体信息如表 3 和图 7 所示。从表 3 可以看出, 每一种特征性 VOCs 的 P 值均小于 0.001, 在肺癌患者和健康人群中表现出显著的差异性, 其 AUC 均在 0.7~0.85 之间, 表现出适中的诊断价值。如图 7 所示, 2 种特征性 VOCs 联合应用时其 AUC 为 0.929, 随着特征 VOCs 的增加, AUC 随之变大, 当 8 种特征 VOCs 联合应用时其 AUC 高

达 0.981, 且 95% 置信区间 (CI) 为 0.952~0.994,

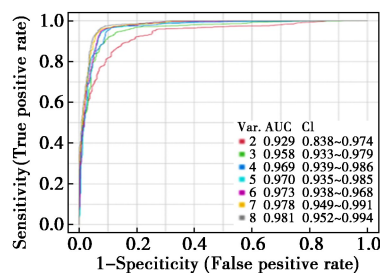


图 7 特征 VOCs 的联合诊断能力

Fig.7 Combined diagnostic capability of characteristic VOCs

表现出了良好的诊断价值。

2.3 机器学习模型的建立与评估

随着人工智能的发展,越来越多的机器学习算法在医药行业运用^[16,17],本研究基于肺癌患者和健康人群 310 个呼气样本的 OPLS-DA 模型选出的 8 种 VOCs 为自变量,运用 6 折交叉验证以 6:4 构建训练集和测试集(将训练集和测试集多次划分),建立 4 种常见的机器学习模型:决策树(DT)算法、逻辑回归(LR)算法、支持向量(SVM)算法和朴素贝叶斯(NB)算法。为防止模型出现过拟合,每种算法至少建模 10 次以上,发现每次结果相当,证明未出现过拟合。如表 6 所示,以 60% 的样本进行训练时,4 种机器学习模型的准确率、精准度、灵敏度和特异性均高于 89%,其中 SVM 的诊断能力最佳,其准确率达 96.28%,F1 分数为 96.08%。模型中的准确度、精准度、灵敏度(召回率)、特异性和 F1 分数是按照下面公式计算。

表 6 4 种机器学习模型对训练集的诊断效果

Tab.6 Diagnostic effects of four machine learning models on training sets (%)				
参数 (训练集)	DT	LR	SVM	NB
准确度	94.91±2.56	95.84±2.16	96.28±1.91	93.88±1.26
精准度	96.41±3.04	95.78±2.61	97.81±1.79	95.54±1.14
灵敏度	92.78±5.82	95.37±1.29	94.44±1.75	89.69±2.22
特异性	97.64±1.83	97.12±1.45	98.51±1.26	96.98±0.73
F1 分数	94.41±2.71	95.56±1.73	96.08±0.96	92.51±1.25

准确度(Accuracy) =

$$(TP + TN) / (TP + TN + FP + FN) \quad (1)$$

$$\text{精准度(Precision)} = TP / (TP + FP) \quad (2)$$

灵敏度(Sensitivity) =

$$\text{召回率(Recall)} = TP / (TN + FP) \quad (3)$$

$$\text{特异性(Specificity)} = TN / (TN + FP) \quad (4)$$

F1 分数(F1-score) =

$$[2 \times (\text{Precision} \times \text{Recall})] / (\text{Precision} + \text{Recall}) \quad (5)$$

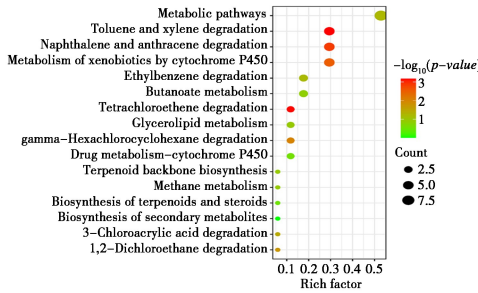
其中 TP、FP、TN 和 FN 分别为真阳性、假阳性、真阴性和假阴性。为验证已建立的机器学习模型,以剩余 40% 样本为测试集,对受试者是否为癌症患者进行验证,其结果如表 7 所示,建立的 4 种机器学习模型的准确度、精准度、灵敏度和特异性均高于 87%,且 SVM 模型的诊断能力最为突出,其准确度高达 95.41%,F1 分数为 94.51%,因此基于 8 种潜在肺癌标志物的 SVM 机器学习模型在实现肺癌的正确分类中表现出了巨大的潜力。

表 7 4 种机器学习模型对测试集的诊断效果

Tab.7 Diagnostic effects of four machine learning models on test sets (%)				
参数 (测试集)	DT	LR	SVM	NB
准确度	91.72±3.89	93.03±2.45	95.41±1.17	92.62±2.56
精准度	92.64±4.09	91.56±6.87	95.15±3.09	94.73±3.12
灵敏度	87.41±7.76	92.69±2.79	93.99±2.61	87.71±1.77
特异性	94.80±3.25	93.95±4.50	96.67±1.62	96.43±1.85
F1 分数	89.79±5.09	91.94±3.10	94.51±1.65	91.01±3.01

2.4 特征 VOCs 的代谢途径

为进一步探究特征 VOCs 的来源与代谢途径,将肺癌患者呼气中具有显著差异的 VOCs ($P < 0.05$) 导入最新的差异代谢物 KEGG 数据库进行通路分析,发现 15 条代谢通路,如图 8 和表 8 所示。其中 $P < 0.05$ 且矫正后的 P 值 FDR (False discovery rate) 小于 0.05 的通路有 4 条,如甲苯和二甲苯的降解、四氯乙烯的降解、萘和蒽的降解、细胞色素 p450 对外源性药物的代谢作。



P 值越小,该通路富集越显著

图 8 肺癌患者呼气中具有显著差异 VOCs 的 KEGG 富集气泡图

Fig.8 KEGG enriched bubbles with significant differences in VOCs in exhaled breath of lung cancer patients

表 8 肺癌患者呼出气体中特征 VOCs 的代谢途径信息

Tab.8 Metabolic pathway information of characteristic breath VOCs from lung cancer patients					
KEGG 编号	代谢途径	P 值	FDR	化合物编号	化合物
map00622	甲苯和二甲苯的降解	<0.000 1	0.001 4	C00261 C07212	苯甲醛 邻二甲苯
map00625	四氯乙烯的降解	<0.000 1	0.001 4	C06789	四氯乙烯
map00626	萘和蒽的降解	0.001 0	0.001 9	C00829	萘
	细胞色素 p450			C00829	萘
map00980	对外源性药物的代谢作用	0.003 0	0.003 0	C11088 C06790	1,2-二溴乙烷 三氯乙烯

本研究中发现直链烷烃类化合物辛烷在肺癌

患者中浓度下降,支链烷烃类化合物 2,3,4-三甲基戊烷在肺癌患者中的浓度升高,它们的产生主要是由于多聚不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)的过氧化作用。脂质过氧化是机体损伤的主要原因,可能是癌症、炎症疾病、衰老的主要原因^[18-20]。

研究表明戊醛可以用于区分肺癌患者和健康人群,且在肺癌患者体内浓度升高^[19],醛主要是细胞色素 p450 对过氧化氢的还原生成, p450 是脂质过氧化的次级代谢物,因此肺癌患者体内肿瘤组织氧化活性增强会导致醛含量升高。4-甲基-2-戊酮作为肺癌的标志物^[20],在肺癌患者中浓度升高已经被证实,在体内没有代谢的碳氢化合物会在几分钟内释放到呼吸中^[21]。酮类主要通过细胞色素 p450 对脂质过氧化的 β -裂解反应产生,在恶病质状态(如癌症等疾病)下,蛋白质代谢会增加,导致酮体水平升高^[22]。

在本研究中发现了细胞色素 p450 对外源性药物的代谢作用,细胞色素 p450 在内源性和外源性物质尤其是药物的代谢中发挥重要作用。越来越多的流行病学、诊断和临床报告表明 p450 在癌症的形成、预防和转移中发挥重要作用^[23]。其代谢途径主要涉及的化合物有萘和三氯乙烯,两者均被选为潜在肺癌标志物,目前虽然没有证据能够证明萘和三氯乙烯与肺癌的关,但是二者均被国际癌症研究机构(IARC)评定为可能致癌物,且三氯乙烯在小鼠毒性试验中能够引起肺纤维化^[24]。萘主要来源于汽车尾气和香烟中^[24],存在一定的毒性作用,有研究发现其在肺癌和健康人群中存在显著差异^[25]。同时还发现了四氯乙烯的降解途径,四氯乙烯与三氯乙烯结构相似,表现出相似的毒性作用^[26]。与 Zou 等^[27]的研究一致,同样发现了甲苯和二甲苯的降解,这类代谢途径主要涉及芳香类化合物,本研究发现了苯、苯甲醛和邻二甲苯,虽然目前没有发现任何文献报道这一途径和肺癌发病率的关系,但是苯^[18,28]、甲苯^[9,18,29]、二甲苯^[18]、苯甲醛^[12]确实是肺癌的危险因素,它们也在呼出气体中被检测,被报道作为肺癌的潜在标志物。但这类物质通常被认为是外源性污染物,Koureas 等^[18]通过对肺癌患者、良性肺部疾病患者和健康志愿者呼气中的 VOCs 进行靶向分析,发现与健康对照组相比,乙苯、苯乙烯、甲苯、二甲苯在肺癌患者的呼气中浓度水平显著升高,其作为肺癌标志物受到了质疑,因此需要

进一步研究。

3 结论

本研究基于 TD-GC-MS 对 176 名肺癌患者,50 名乳腺癌患者和 134 名健康人群的呼出气体进行研究。通过 OPLS-DA 模型发现有 10 种 VOCs 可以区分肺癌和乳腺癌,有 8 种 VOCs 可以区分肺癌患者健康人群,其中有 3 种 VOCs,即 4-甲基-2-戊酮、正辛烷和苯同时出现在肺癌和乳腺癌患者中,可能是两种癌症共同的特征性 VOCs,有 5 种 VOCs 为肺癌独有的化合物包括:顺式-2-丁烯、戊醛、三氯乙烯、2,3,4-三甲基戊烷和萘。此外,基于肺癌患者呼气中发现的 8 种特征性 VOCs 建立了 SVM 的机器学习模型,其准确度、精准度、灵敏度和特异性分别达到 95.41%、95.15%、93.99%和 96.67%。本研究建立了一种呼气 VOCs 用于无创诊断肺癌的方法,同时联合代谢数据库,解释了这些 VOCs 可能的来源和代谢途径,为呼气用于肺癌的诊断提供了一些新的思路和方法。在未来的研究工作中,我们将进一步细化肺癌分期,增加样本量,提高肺癌呼气特异性 VOCs 筛查的准确性。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J. Clin.*, 2021, **71**(3): 209-249.
- [2] LI W, DAI W, LIU M, et al. VOC biomarkers identification and predictive model construction for lung cancer based on exhaled breath analysis: Research protocol for an exploratory study [J]. *BMJ Open*, 2019, **9**(8): e028 448.
- [3] CAO M, CHEN W. Epidemiology of lung cancer in China [J]. *Thoracic. Cancer*, 2019, **10**(1): 3-7.
- [4] MCWILLIAMS A, SHAIPANICH T, LAM S. Fluorescence and navigational bronchoscopy [J]. *Thoracic Surgery Clinics*, 2013, **23**(2): 153-161.
- [5] FOLEY R W, NASSOUR V, OLIVER H C, et al. Chest X-ray in suspected lung cancer is harmful [J]. *Eur. Radiol.*, 2021, **31**(8): 6 269-6 274.
- [6] LAWAL O, AHMED W M, NIJSEN T M E, et al. Exhaled breath analysis: A review of 'breath-taking' methods for off-line analysis [J]. *Metabolomics*, 2017, **13**(10): 1-16.
- [7] GORDON S M, SZIDON J P, KROTOSZYNSKI B K, et

- al. Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer [J]. *Clinic. Chem.*, 1985, **31**(8): 1 278-1 282.
- [8] 谢少华, 戴维, 刘明心, 等. 呼出气中挥发性有机化合物对 <50 岁人群肺结节良恶性的预测价值 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2020, **27**(6): 675-680.
- [9] ZOU Y, WANG Y, JIANG Z, et al. Breath profile as composite biomarkers for lung cancer diagnosis [J]. *Lung Cancer*, 2021, **154**: 206-213.
- [10] 茹立华, 吕伟, 王祥麒, 等. 基于呼气中特异性 VOCs 筛查的肺癌早期诊断与模型评估 [J]. 分析测试学报, 2023, **42**(3): 275-282.
- [11] SMIRNOVA E, MALLOW C, MUSCHELLI J, et al. Predictive performance of selected breath volatile organic carbon compounds in stage 1 lung cancer [J]. *Transl. Lung Cancer Res.*, 2022, **11**(6): 1 009-1 018.
- [12] TSOU P H, LIN Z L, PAN Y C, et al. Exploring volatile organic compounds in breath for high-accuracy prediction of lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, **13**(6): 1-14.
- [13] WANG P, HUANG Q, MENG S, et al. Identification of lung cancer breath biomarkers based on perioperative breathomics testing: A prospective observational study [J]. *EclinicalMedicine*, 2022, **47**: 101 384.
- [14] KING J, KUPFERHALER A, UNTERKOFER K, et al. Isoprene and acetone concentration profiles during exercise on an ergometer [J]. *J. Breath Res.*, 2009, **3**(2): 027 006.
- [15] 苏媛媛, 姜雪, 仓义鹏, 等. 紫外-可见光谱传感对高温大曲白酒真实性的准确鉴别 [J]. 化学试剂, 2023, **45**(10): 8-13.
- [16] 胡子康, 刘庭恺, 饶艳敏, 等. 近红外光谱结合化学计量学的掺伪杜仲判别 [J]. 化学试剂, 2023, **45**(10): 1-7.
- [17] 杜潇楠, 周慧宇, 王玉成, 等. 人工智能在药物肝脏毒性预测中的应用 [J]. 化学试剂, 2021, **43**(5): 640-648.
- [18] KOUREAS M, KIRGOU P, AMOUTZIAS G, et al. Target analysis of volatile organic compounds in exhaled breath for lung cancer discrimination from other pulmonary diseases and healthy persons [J]. *Metabolites*, 2020, **10**(8): 1-18.
- [19] FUCHS P, LOESEKEN C, SCHUBERT J K, et al. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer [J]. *Int. J. Cancer*, 2010, **126**(11): 2 663-2 670.
- [20] WANG M, SHENG J, WU Q, et al. Confounding effect of benign pulmonary diseases in selecting volatile organic compounds as markers of lung cancer [J]. *J. Breath. Res.*, 2018, **12**(4): 046 013.
- [21] KING J, MOCHALSKI P, KUPFERHALER A, et al. Dynamic profiles of volatile organic compounds in exhaled breath as determined by a coupled PTR-MS/GC-MS study [J]. *Physiol. Meas.*, 2010, **31**(9): 1 169-1 184.
- [22] HAKIM M, BROZA Y Y, BARASH O, et al. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways [J]. *Chem. Rev.*, 2012, **112**(11): 5 949-5 966.
- [23] ALZAHIRANI A M, RAJENDRAN P. The multifarious link between cytochrome p450s and cancer [J]. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2020, **1**: 3 028 387.
- [24] HABIBAGAH A, ALDERMAN N, KUBWABO C. A review of the analysis of biomarkers of exposure to tobacco and vaping products [J]. *Anal. Methods*, 2020, **12**(35): 4 276-4 302.
- [25] JANSSENS E, MEERBEECK J P, LAMOTE K. Volatile organic compounds in human matrices as lung cancer biomarkers: A systematic review [J]. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2020, **153**: 103 037.
- [26] LUO Y S, FURUYA S, SOLDATOV V Y, et al. Metabolism and toxicity of trichloroethylene and tetrachloroethylene in cytochrome p450 2E1 knockout and humanized transgenic mice [J]. *Toxicol. Sci.*, 2018, **164**(2): 489-500.
- [27] ZOU Y, HU Y, JIANG Z, et al. Exhaled metabolic markers and relevant dysregulated pathways of lung cancer: A pilot study [J]. *Ann. Med.*, 2022, **54**(1): 790-802.
- [28] CHEN X, MUHAMMAD K G, MADEEHA C, et al. Calculated indices of volatile organic compounds (VOCs) in exhalation for lung cancer screening and early detection [J]. *Lung Cancer*, 2021, **154**: 197-205.
- [29] SAKUMURA Y, KOYAMA Y, TOKUTAKE H, et al. Diagnosis by volatile organic compounds in exhaled breath from lung cancer patients using support vector machine algorithm [J]. *Sensors (Basel)*, 2017, **17**(2): 1-12.

功能材料

基于羧酸基-酚羟基配体 Pr 配合物的结构、荧光性质以及
辅助配体的影响

罗仕超, 彭庆鹏, 张洪涛, 刘楚湖, 江尚坤, 王莹, 关磊*

(辽宁石油化工大学 石油化工学院, 辽宁 抚顺 113001)

摘要:采用 3,3'-偶氮双(6-羟基苯甲酸)二钠($\text{Na}_2\text{H}_2\text{L}$)为配体,通过水热法与 Pr^{3+} 反应得到两个配合物 $[\text{Pr}(\text{H}_2\text{L})_{0.5}(\text{L})_{0.5}(\text{H}_2\text{O})_2]_n$ (1) 和 $\text{Pr}(\text{HL})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2) ($\text{phen}=1,10$ -邻菲罗啉)。配合物 1 中, H_2L^{2-} 阴离子作为四齿配体, 2 个羧酸基分别以 $\mu_2\text{-}\eta^1\text{:}\eta^1$ 的方式与 Pr^{3+} 配位, 形成二维层状结构, 并且 L^{4-} 阴离子作为桥连配体, 利用羧酸基和酚羟基分别以 $\mu_2\text{-}\eta^2\text{:}\eta^1$ 和桥连模式将二维层中 3 个相邻的 Pr^{3+} 连接, 将结构拓展成三维网络结构, 其 Schläfli 符号为 $\{4^2 \cdot 8^4\} \{4^6 \cdot 6^6 \cdot 8^3\} \{4^7 \cdot 6^3\}_2$ 。引入 phen 分子, 配合物 2 变为单核结构, phen 与 Pr^{3+} 螯合配位, HL^{3-} 作为单齿配体与 Pr^{3+} 配位。配合物 1 和 2 分别在 638 和 778 nm, 652 和 781 nm 处有 Pr^{3+} 的特征荧光发射峰, 颜色落在色度图的橙色区域内, 是 $^1\text{S}_0 \rightarrow ^1\text{I}_6$ 和 $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_4$ 能级跃迁所致。配合物 2 的荧光强度高于配合物 1, 且主峰红移 14 nm, 归因于 phen 的共轭体系以及其与 Pr^{3+} 配位作用。

关键词:镨离子; 配位聚合物; 三维结构; 荧光; 辅助配体

中图分类号: O614.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)06-0026-07

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0041

Structures, Fluorescence Properties and Influence of Auxiliary Ligand on Pr Complexes Based on Carboxylate-Phenol Ligand LUO Shi-chao, PENG Qing-peng, ZHANG Hong-tao, LIU Chu-hu, JIANG Shang-kun, WANG Ying, GUAN Lei* (School of Petrochemical Engineering, Liaoning Petrochemical University, Fushun 113001, China)

Abstract: Two complexes $[\text{Pr}(\text{H}_2\text{L})_{0.5}(\text{L})_{0.5}(\text{H}_2\text{O})_2]_n$ (1) and $\text{Pr}(\text{HL})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2) ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{L}=3,3'$ -azobis(6-hydroxybenzoic acid) disodium, phen=1,10-phenanthroline) were synthesized by hydrothermal reaction with Pr^{3+} using $\text{Na}_2\text{H}_2\text{L}$ as ligand. In complex 1, the H_2L^{2-} anions act as tetradentate ligands, which bind to Pr^{3+} ions through two carboxylate groups in $\mu_2\text{-}\eta^1\text{:}\eta^1$ coordination mode, forming a two-dimensional layered structure. Moreover, the L^{4-} anions serve as bridging ligands, which connect the three adjacent Pr^{3+} ions in two-dimensional layers via the carboxylate and phenol groups in $\mu_2\text{-}\eta^2\text{:}\eta^1$ and bridging fashions, respectively, expanding into a three-dimensional network structure with the Schläfli symbol of $\{4^2 \cdot 8^4\} \{4^6 \cdot 6^6 \cdot 8^3\} \{4^7 \cdot 6^3\}_2$. The structure of complex 2 transforms into a mononuclear one by the introduction of phen molecules, where phen molecules chelate with Pr^{3+} , while HL^{3-} anions act as monodentate ligands, coordinating with Pr^{3+} . Complexes 1 and 2 exhibited the characteristic emissions of Pr^{3+} at 638 and 778 nm, 652 and 781 nm, which fall within the orange region of the CIE chromaticity diagram, corresponding to $^1\text{S}_0 \rightarrow ^1\text{I}_6$ and $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_4$ energy transitions, respectively. The fluorescence intensity of complex 2 was higher than complex 1, and the main peak had red-shift of 14 nm, which was attributed to the conjugated system of phen and its coordination with Pr^{3+} .

Key words: praseodymium ion; coordination polymer; three-dimensional structure; fluorescence; auxiliary ligand

收稿日期: 2024-01-16; 网络首发日期: 2024-03-22

基金项目: 辽宁省教育厅基本科研项目的 (LJKMZ20220738); 辽宁石油化工大学创新创业训练计划项目 (S202310148010)。

作者简介: 罗仕超 (2000-), 男, 贵州黔东南布依族苗族自治州人, 本科生, 主要研究方向为功能配位聚合物合成与性质。

通讯作者: 关磊, E-mail: syncoord@163.com。

引用本文: 罗仕超, 彭庆鹏, 张洪涛, 等. 基于羧酸基-酚羟基配体 Pr 配合物的结构、荧光性质以及辅助配体的影响 [J]. 化学试剂, 2024, 46(6): 26-32。

近年来,发光配合物引起了研究者的广泛关注,因其荧光发射可调控、强度高、寿命长等优点以及在众多领域具有潜在的应用价值,比如荧光材料、传感与检测、医学成像、探测与记录等,其设计与合成已经成为材料化学与晶体工程领域的研究热点之一^[1-6]。对于发光配合物,其发光来源主要有金属离子、有机配体和客体分子等。目前,发光配合物的研究主要集中在过渡金属离子和稀土金属离子上,尤其以稀土金属离子为主^[7,8]。由于稀土离子核外电子及轨道的特点,一般来说稀土离子荧光效率与配体有直接联系。一些配体能够利用“天线效应”敏化稀土离子,使其荧光效率显著提高;另一些配体则不能显著提高稀土离子的荧光效率^[9]。目前,具有荧光性能的稀土配合物的构筑以及荧光性质研究都是据此展开的^[10]。对于配体是如何影响稀土配合物的荧光性能,尤其是对于配体吸收紫外-可见光的能力是如何影响稀土配合物的荧光性能的问题一直是本领域研究的热点之一^[11]。

稀土配合物的结构主要受中心金属离子的配位构型和配体的配位方式两个主要因素影响。众所周知,构筑稀土配合物所用配体多为芳香羧酸基配体。其配位方式多样,形成的配位键比较稳定,包括 $\mu_1-\eta^1$ 、 $\mu_1-\eta^2$ 和 $\mu_2-\eta^2$ 等^[12-14]。如含有多个羧酸基团时,羧酸基所在位置不同,受空间位阻的影响,其配位方式亦有所不同,可构筑结构多样的配合物。此外,羧酸基与稀土金属离子配位可形成不同的次级结构单元,有效的促进结构整体框架的延伸,提高目标配合物结构的稳定性。另外,在芳环羧酸基配体上添加供电子基,如羟基、胺基等官能团,不仅可以增加其配位点以及配位方式,合成结构更稳定、新颖的稀土配合物^[15,16]。同时,还可以促进配体到稀土金属离子的能量转移,敏化稀土金属离子,促使其特征荧光发射。但是,研究稀土配合物的发光性质以及能量转移问题仍面临较大的挑战,除最基本的影响因素外,配体的共轭体系、客体分子、配合物的刚度、分子间的弱相互作用等的影响也不容小觑^[17]。

本文通过水热法,利用 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{L}$ 为配体与 Pr^{3+} 反应合成得到了两个 Pr 配合物 $[\text{Pr}(\text{H}_2\text{L})_{0.5}(\text{L})_{0.5}(\text{H}_2\text{O})_2]_n$ 和 $\text{Pr}(\text{HL})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。通过辅助配体 phen 的引入,将具有三维结构的 Pr 配位聚合物转变成单核结构。对其组

成、结构以及热稳定性进行了表征。此外,还考察了结构与 phen 分子对荧光发射性质的影响。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Apex-II CCD 型单晶 X 射线衍射仪(德国 Bruker 公司);750 型 FT-IR 光谱仪(4 000~400 cm^{-1} , KBr 压片,德国 Magna 公司);2400 型元素分析仪、TGA 7 型热重分析仪(25~900 $^{\circ}\text{C}$, N_2 气氛,美国 Perkin-Elmer 公司);F-4700 型荧光光谱仪(日本 Hitachi 公司)。

实验所用药品和溶剂均购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;所用试剂均为分析纯。

1.2 配合物 1 的合成

将 0.035 g (0.1 mmol) $\text{Na}_2\text{H}_2\text{L}$ 和 0.044 g (0.1 mmol) $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解在 15 mL 去离子水中,在室温下搅拌 2 h。然后,将溶液封装在聚四氟乙烯内衬的高压反应釜(20 mL)中。在 120 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 3 d 后,缓慢冷却至室温,得到绿色块状晶体。将晶体颗粒过滤,用去离子水和乙醇清洗后置于干燥器中,产率为 54%。元素分析, $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_8\text{Pr}$, 实测值(计算值),%: C 35.23 (35.15); H 2.78 (2.72); N 5.88 (5.86)。IR (KBr), ν , cm^{-1} : 3 319 (OH), 1 645、1 620、1 455 ($\text{C}=\text{O}$), 1 571 ($\text{C}=\text{C}$), 1 393、1 357 ($\text{N}=\text{N}$), 1 252、1 167、1 130 ($\text{C}-\text{O}$), 860、805、701 ($\text{C}-\text{H}$)。

1.3 配合物 2 的合成

将 0.035 g (0.1 mmol) $\text{Na}_2\text{H}_2\text{L}$ 、0.044 g (0.1 mmol) $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 0.020 g (0.1 mmol) phen 溶解在 15 mL 去离子水中,在室温下搅拌 2 h。然后,将溶液封装在聚四氟乙烯内衬的高压反应釜(20 mL)中。在 120 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 3 d 后,缓慢冷却至室温,得到绿色块状晶体。将晶体颗粒过滤,用去离子水和乙醇清洗后置于干燥器中,产率为 55%。元素分析, $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{Pr}$, 实测值(计算值),%: C 41.88 (41.80); H 4.00 (3.89); N 7.57 (7.50)。IR (KBr), ν , cm^{-1} : 3 370 (OH), 1 620、1 516、1 422、1 479 ($\text{C}=\text{O}$), 1 587 ($\text{C}=\text{C}$), 1 377、1 338 ($\text{N}=\text{N}$), 1 299、1 248、1 185、1 138 ($\text{C}-\text{O}$), 918、836、789、728、679 ($\text{C}-\text{H}$)。

1.4 测定配合物晶体结构

在 296 K 下,配合物 1 和 2 单晶结构通过

Bruker Apex-II CCD 单晶 X-射线衍射仪进行测定。使用单色化的 Mo-K α 射线,以 φ - ω 扫描方式采集数据,并进行吸收校正。利用直接法,SHELX 软件包进行结构解析和精修^[18,19]。CCDC No.: 2323853,2324221。配合物 1 和 2 的晶体数据和结构精修数据均列于表 1,部分键长和键角列于表 2。

表 1 配合物 1 和 2 的晶体数据和结构精修数据

Tab.1 Crystal data and structural refinement data for complexes 1 and 2

	配合物 1	配合物 2
Chemical formula	C ₁₄ H ₁₃ N ₂ O ₈ Pr	C ₂₆ H ₂₉ N ₄ O ₁₃ Pr
M_r	478.17	746.44
Crystal system, space group	Monoclinic, $C2/c$	Triclinic, $P-1$
$a, b, c/\text{\AA}$	20.634(12), 7.334(4), 25.789(12)	8.987(2), 10.001(2), 17.415(4)
$\alpha, \beta, \gamma/(\circ)$	105.354(15)	76.567(6), 87.094(7), 70.595(6)
$V/\text{\AA}^3$	3 763(3)	1 435.5(5)
Z	8	2
Radiation type	Mo-K α	Mo-K α
$\mu/(\text{mm}^{-1})$	2.63	1.77
No. of measured, independent and observed [$I > 2\sigma(I)$] reflections	8 943, 4 382, 3 672	12 626, 6 441, 6 175
R_{int}	0.05	0.039
$(\sin \theta/\lambda)_{\text{max}}/(\text{\AA}^{-1})$	0.663	0.651
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.076, 0.290, 1.25	0.039, 0.117, 1.04
No. of reflections	4382	6441
No. of parameters	226	404
No. of restraints	2	2
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}/(\text{e}\cdot\text{\AA}^{-3})$	5.73, -4.11	0.78, -0.79

表 2 配合物 1 和 2 的部分键长和键角^注

Tab.2 Selected bond lengths and angles for complexes 1 and 2

配合物 1			
化学键	键长/nm	化学键	键长/nm
Pr1—O1	2.528(6)	Pr1—O3 ⁱ	2.611(7)
Pr1—O2 ⁱ	2.496(6)	Pr1—O4	2.482(6)
Pr1—O2	2.404(6)	Pr1—O6	2.517(9)
Pr1—O1 ⁱⁱ	2.562(6)	Pr1—O7	2.555(7)
Pr1—O004 ⁱ	2.523(7)		

续表

配合物 1			
化学键	键角/ $(\circ)$	化学键	键角/ $(\circ)$
O2—Pr1—O4	71.0(2)	O2 ⁱ —Pr1—O7	67.0(2)
O2—Pr1—O2 ⁱ	126.17(15)	O4—Pr1—O1	90.4(2)
O2—Pr1—O004 ⁱ	73.4(2)	O004 ⁱ —Pr1—O1	82.0(2)
O4—Pr1—O6	70.5(3)	O4—Pr1—O1 ⁱⁱ	88.2(2)
O6—Pr1—O2 ⁱ	107.6(3)	O004 ⁱ —Pr1—O1 ⁱⁱ	72.0(2)
O2 ⁱ —Pr1—O004 ⁱ	74.3(2)	O2—Pr1—O3 ⁱ	149.6(3)
O6—Pr1—O7	74.4(3)	O6—Pr1—O1 ⁱⁱ	75.8(3)
O2—Pr1—O1	67.8(2)	O7—Pr1—O1 ⁱⁱ	146.9(2)
O2 ⁱ —Pr1—O1	66.0(2)	O4—Pr1—O3 ⁱ	136.2(3)
O2—Pr1—O1 ⁱⁱ	66.8(2)	O004 ⁱ —Pr1—O3 ⁱ	77.3(3)
O2 ⁱ —Pr1—O1 ⁱⁱ	137.2(2)	O4—Pr1—O7	68.5(2)
O1—Pr1—O1 ⁱⁱ	132.33(12)	O004 ⁱ —Pr1—O7	139.9(2)
O2—Pr1—O6	126.2(3)	O6—Pr1—O1	146.6(3)
O4—Pr1—O2 ⁱ	134.0(2)	O7—Pr1—O1	73.2(3)
O4—Pr1—O004 ⁱ	143.8(2)	O2 ⁱ —Pr1—O3 ⁱ	50.3(2)
O6—Pr1—O004 ⁱ	129.3(3)	O1—Pr1—O3 ⁱ	116.0(2)
O1 ⁱⁱ —Pr1—O3 ⁱ	96.6(2)	O6—Pr1—O3 ⁱ	68.7(3)
O2—Pr1—O7	122.3(2)	O7—Pr1—O3 ⁱ	85.8(3)
配合物 2			
化学键	键长/nm	化学键	键长/nm
Pr1—O4	2.756(3)	Pr1—N3	2.914(3)
Pr1—O9	2.906(3)	Pr1—O8	2.893(3)
Pr1—O11 ⁱ	2.977(3)	Pr1—O11	2.861(3)
Pr1—O7	2.745(3)	Pr1—N4	2.906(3)
Pr1—O10	2.729(3)		
化学键	键角/ $(\circ)$	化学键	键角/ $(\circ)$
O4—Pr1—O9	130.24(8)	O10—Pr1—O11 ⁱ	124.24(8)
O4—Pr1—O11 ⁱ	68.48(7)	O10—Pr1—O7	128.03(10)
O4—Pr1—O11	72.36(8)	O10—Pr1—N3	70.26(9)
O4—Pr1—N3	75.76(8)	O10—Pr1—O8	68.79(9)
O4—Pr1—O8	133.19(8)	O10—Pr1—N4	106.69(8)
O4—Pr1—N4	68.51(8)	N3—Pr1—O11 ⁱ	133.41(8)
O9—Pr1—O11 ⁱ	63.75(7)	O7—Pr1—O11 ⁱ	67.28(8)
O9—Pr1—N3	131.29(8)	N4—Pr1—N3	56.39(9)
O9—Pr1—N4	158.77(8)	O7—Pr1—O11	134.20(8)
O11—Pr1—O9	76.95(8)	N4—Pr1—O11 ⁱ	128.70(8)
O11—Pr1—O11 ⁱ	66.92(8)	O7—Pr1—O9	82.74(8)
O11—Pr1—N3	74.58(8)	O8—Pr1—N4	67.34(8)
O7—Pr1—N3	143.72(9)	O8—Pr1—N3	92.24(8)
O7—Pr1—O8	71.78(9)	O7—Pr1—O4	91.51(9)
O7—Pr1—N4	87.34(9)	O8—Pr1—O11 ⁱ	134.08(7)
O10—Pr1—O4	140.40(9)	O11—Pr1—N4	122.60(8)
O10—Pr1—O9	66.23(8)	O8—Pr1—O9	91.68(8)
O10—Pr1—O11	79.42(9)	O11—Pr1—O8	148.14(7)

注: Symmetry codes for complex 1: (ⁱ) $-x+1/2, y+1/2, -z+1/2$; (ⁱⁱ) $-x+1/2, y-1/2, -z+1/2$; Symmetry code for complex 2: (ⁱ) $-x+1, -y+1, -z+1$ 。

2 结果与讨论

2.1 配合物 1 晶体结构

单晶 X-射线衍射结果表明,配合物 1 属于单斜晶系, $C2/c$ 空间群(表 1)。1 个不对称结构单元包含 1 个 Pr^{3+} 、0.5 个 H_2L^{2-} 、0.5 个 L^{4-} 和 2 个配位水分子(图 1a)。 Pr^{3+} 是九配位的,分别与 2 个 L^{4-} 配体中的 3 个羧酸基氧原子($\text{O}2$ 、 $\text{O}2^{\text{i}}$ 和 $\text{O}3$)、2 个酚羟基氧原子($\text{O}1$ 和 $\text{O}1^{\text{ii}}$)、2 个 H_2L^{2-} 中的 2 个酚羟基氧原子($\text{O}004$ 和 $\text{O}4$)以及 2 个配位水分子的氧原子($\text{O}6$ 和 $\text{O}7$)配位,呈扭曲的三帽三棱柱配位构型(图 1b)。 $\text{Pr}-\text{O}$ 键长在 $2.404(6) \sim 2.611(7) \text{ \AA}$ 之间, $\text{O}-\text{Pr}-\text{O}$ 键角在 $50.3(2)^\circ \sim 149.6(3)^\circ$ 之间(表 2),这些数值与文献[20,21]报道的其他 Pr 配合物的数值相似。 H_2L^{2-} 配体为四齿配体,2 个羧酸基均以 $\mu_2-\eta^1:\eta^1$ 的方式连接 2 个 Pr^{3+} ,其中,2 个酚羟基均是质子化的,不参与配位(图 1c); L^{4-} 配体为六齿配体,羧酸基均以 $\mu_2-\eta^2:\eta^1$ 的方式连接 2 个 Pr^{3+} ,酚羟基氧原子均桥连相邻的 2 个 Pr^{3+} (图 1d)。 H_2L^{2-} 配体的 2 个羧酸基分别桥连相邻的 2 个 Pr^{3+} ,形成了一个二维层状结构,并且, L^{4-} 配体作为桥连配体将二维层中相邻的 3 个 Pr^{3+} 相互连接,将结构拓展成一个三维网络结构(图 1e)。另外,配合

物 1 的三维结构之间还存在许多氢键,比如酚羟基和羧酸基之间的氢键($\text{O}7-\text{H}7\text{B}\cdots\text{O}004$)、酚羟基和配位水分子之间的氢键($\text{O}5-\text{H}5\cdots\text{O}7$)以及配位水分子和羧酸基之间的氢键($\text{O}7-\text{H}7\text{B}\cdots\text{O}004$)(表 3),这些氢键使配合物的晶体结构更加稳定。文献报道的类似结构的双羧酸基配体自组装构筑的配位聚合物中,配体只采用一种配位方式,与过渡金属离子配位形成一维结构。Mu 等^[22]采用常温挥发法,利用 4,4'-二苯醚二甲酸(H_2oba)以及 1,10-邻菲罗啉(phen)为配体,与 Cd^{2+} 反应得到了 1 个配位聚合物 $[\text{Cd}_2(\text{oba})_2(\text{phen})_2]_n$ 。 Cd^{2+} 和 Cd^{2+} 都与 3 个 oba^{2-} 的 5 个羧酸基氧原子、1 个 phen 的 2 个氮原子配位。在 oba^{2-} 配体中,2 个羧酸基分别采用 $\mu_1-\eta^2$ 和 $\mu_2-\eta^2:\eta^1$ 方式桥连 2 个 Cd^{2+} ,形成 $[\text{Cd}_2(\text{CO}_2)_2]$ 次级结构单元。相邻的次级结构单元通过 oba^{2-} 连接,形成一维双链结构。

从拓扑角度分析, H_2L^{2-} 配体与 4 个 Pr^{3+} 配位,可视为 4-连接节点; L^{4-} 配体与 6 个 Pr^{3+} 配位,可视为 6-连接节点;每个 Pr^{3+} 周围有 5 个配体与其配位,可视为 5-连接节点,因此,该配位聚合物具有 4,5,6-连接网络。拓扑结构的 Schläfli 符号为 $\{4^2 \cdot 8^4\} \{4^6 \cdot 6^6 \cdot 8^3\} \{4^7 \cdot 6^3\}_2$ (图 2)。

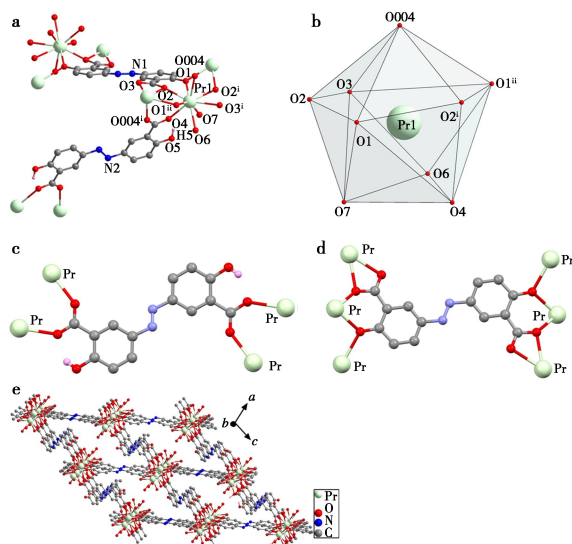


图 1 (a) 配合物 1 的分子结构;(b) Pr^{3+} 的配位构型;
(c) H_2L^{2-} 配体的配位方式;(d) L^{4-} 配体的配位方式;
(e) 三维网络结构

Fig.1 (a) Molecular structure of complex 1;
(b) coordination configuration of Pr^{3+} ; (c) coordination mode of H_2L^{2-} ligand; (d) coordination mode of L^{4-} ligand; (e) three dimensional network structure

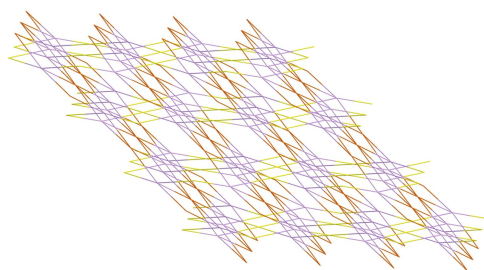


图 2 配合物 1 的拓扑结构

Fig.2 Topological structure of complex 1

表 3 配合物 1 和 2 的氢键键长和键角^注

Tab.3 Hydrogen bond lengths and angles of complex 1 and 2

D—H...A	$d(\text{D}-\text{H})$ Å	$d(\text{H}\cdots\text{A})$ Å	$d(\text{D}\cdots\text{A})$ Å	$\angle(\text{DHA})$ (°)
配合物 1				
$\text{O}5-\text{H}5\cdots\text{O}7$	0.820	2.517	3.120	131.30
$\text{O}5-\text{H}5\cdots\text{O}4$	0.820	1.877	2.549	138.41
$\text{O}7-\text{H}7\text{B}\cdots\text{O}004$	0.960	2.008	2.962	172.62
配合物 2				
$\text{O}9-\text{H}9\text{A}\cdots\text{O}4^{\text{i}}$	0.870	1.820	2.685(4)	174.2
$\text{O}11-\text{H}11\text{A}\cdots\text{O}13^{\text{ii}}$	0.870	1.920	2.781(4)	170.7
$\text{O}11-\text{H}11\text{B}\cdots\text{O}12$	0.870	2.080	2.824(4)	142.7
$\text{O}12-\text{H}12\text{A}\cdots\text{O}13$	0.870	1.970	2.834(4)	171.7

续表

D—H...A	$d(\text{D—H})/\text{\AA}$	$d(\text{H...A})/\text{\AA}$	$d(\text{D...A})/\text{\AA}$	$\angle(\text{DHA})/^\circ$
配合物 2				
O12—H12B...O8 ⁱⁱⁱ	0.870	2.000	2.862(4)	170.5
O13—H13A...O5 ^{iv}	0.870	1.880	2.740(4)	171.4
O13—H13B...O3	0.870	1.910	2.760(4)	164.7
O7—H7A...O12 ⁱ	0.870	2.080	2.779(4)	136.5
O7—H7B...O2 ^v	0.870	1.990	2.771(4)	149.6
O10—H10A...O3 ⁱⁱ	0.870	1.900	2.772(4)	174.4
O10—H10B...O3 ^{vi}	0.870	1.920	2.780(4)	167.7
O6—H6...O5	0.840	1.800	2.523(4)	142.8
O8—H8B...O9 ^{vii}	0.870	2.010	2.800(4)	150.6

注: Symmetry codes for complex 2: (i) $-x+1, -y+1, -z+1$; (ii) $-x+1, -y, -z+1$; (iii) $x-1, y, z$; (iv) $x, y-1, z$; (v) $x+1, y+1, z$; (vi) $x+1, y, z$; (vii) $-x+2, -y+1, -z+1$ 。

2.2 配合物 2 晶体结构

配合物 2 属于三斜晶系, $P-1$ 空间群(表 1)。1 个非对称结构单元含有 1 个 Pr^{3+} , 1 个 HL^{3-} 配体, 1 个 phen 配体, 5 个配位水分子和 2 个游离水分子(图 3a)。 Pr^{3+} 是八配位的, 分别与 HL^{3-} 配体的 1 个羧基氧原子(O4), 1 个 phen 配体的 2 个氮原子(N3 和 N4), 5 个配位水分子的氧原子(O7、O8、O9、O10 和 O11)配位, 呈十二面体配位构型(图 3b)。 Pr—O 键长在 2.729(3)~2.977(3) $\text{\AA}$ 之间, Pr—N 键长在 2.906(3)~2.914(3) $\text{\AA}$ 之间, O—Pr—O 键角在 63.75(7)°~148.14(7)°之间(表 2), 与其他 Pr 配合物中报道的键长、键角相似^[20-22]。 HL^{3-} 配体只有一种配位模式, 其中 1 个酚羟基(O6)是质子化的, 另 1 个酚羟基(O1)是去质子化的, 没有参与配位, 1 个羧基氧原子(O4)与 Pr^{3+} 配位, 采用单齿配位方式。phen 分子作为封端配体与 Pr^{3+} 螯合配位。 Pr^{3+} 其他的配位点被水分子占据。配合物 2 中的配位水、游离水、酚羟基氧原子与羧基氧原子之间形成氢键(O6—H6...O5、O9—H9A...O4ⁱ、O13—H13A...O5^{iv}、O11—H11A...O13ⁱⁱ、O7—H7A...O12ⁱ、O10—H10A...O3ⁱⁱ、O12—H12A...O13、O11—H11B...O12 和 O13—H13B...O3、O10—H10B...O3^{vi}、O12—H12B...O8ⁱⁱⁱ、O7—H7B...O2^v 和 O8—H8B...O9^{vii})(表 3), 这些氢键增加了配合物 2 的结构稳定。

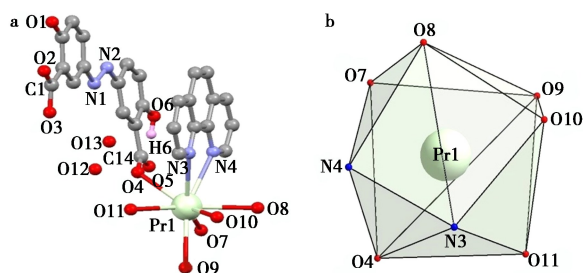


图 3 (a) 配合物 2 的分子结构; (b) Pr^{3+} 的配位构型

Fig.3 (a) Molecular structure of complex 2;

(b) coordination configuration of Pr^{3+}

配合物 1 和 2 的热重曲线如图 4 所示。配合物 1 的第一个失重台阶在 25~124 $^\circ\text{C}$ 之间, 失重率为 6.4%, 对应失去 2 个配位水分子(理论值 7.5%); 第二个失重台阶在 124~367 $^\circ\text{C}$ 之间, 失重率为 33.6%, 对应失去 0.5 个 L^4 配体(理论值 33.7%); 第三个失重台阶在 367~900 $^\circ\text{C}$ 之间, 是 H_2L^2 配体的部分热解所致; 当升温至 900 $^\circ\text{C}$ 时, 失重曲线仍呈下降趋势, 最终残余物可能是 Pr_2O_3 。配合物 2 的第一个失重台阶在 25~156 $^\circ\text{C}$ 之间, 失重率为 3.0%, 对应失去游离水分子(理论值 4.8%)。第二个失重台阶在 270~380 $^\circ\text{C}$ 之间, 失重率为 25.6%, 对应失去一个 phen 配体(理论值 24.1%)。温度继续升高, HL^{3-} 配体分子开始分解, 直至 900 $^\circ\text{C}$ 热重曲线仍有下降趋势, 配体没有完全分解, 最终剩余物质可能是 Pr_2O_3 ^[23]。

2.3 热重分析

配合物 1 和 2 的热重曲线如图 4 所示。配合物 1 的第一个失重台阶在 25~124 $^\circ\text{C}$ 之间, 失重率为 6.4%, 对应失去 2 个配位水分子(理论值 7.5%); 第二个失重台阶在 124~367 $^\circ\text{C}$ 之间, 失重率为 33.6%, 对应失去 0.5 个 L^4 配体(理论值 33.7%); 第三个失重台阶在 367~900 $^\circ\text{C}$ 之间, 是 H_2L^2 配体的部分热解所致; 当升温至 900 $^\circ\text{C}$ 时, 失重曲线仍呈下降趋势, 最终残余物可能是 Pr_2O_3 。配合物 2 的第一个失重台阶在 25~156 $^\circ\text{C}$ 之间, 失重率为 3.0%, 对应失去游离水分子(理论值 4.8%)。第二个失重台阶在 270~380 $^\circ\text{C}$ 之间, 失重率为 25.6%, 对应失去一个 phen 配体(理论值 24.1%)。温度继续升高, HL^{3-} 配体分子开始分解, 直至 900 $^\circ\text{C}$ 热重曲线仍有下降趋势, 配体没有完全分解, 最终剩余物质可能是 Pr_2O_3 ^[23]。

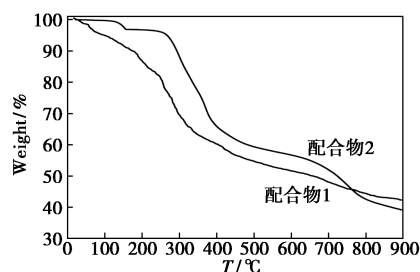


图 4 配合物 1 和 2 的热重曲线

Fig.4 TGA curves of complexes 1 and 2

2.4 荧光性质

稀土元素具有特殊的电子层结构, 使它们具有一般元素无法拥有的光谱性质, 因此, 大部分稀土元素在荧光领域受到了研究者的青睐^[24]。

配合物 1 和 2 的荧光发射光谱如图 5a 所示。在 350 nm 的激发波长下, 其分别在 638 和 778 nm、652 和 781 nm 的荧光发射峰为 Pr^{3+} 的特征荧光发射峰, 颜色落在色度图的橙色区域内(图 5b), 可归因于 Pr^{3+} 的 $^1\text{S}_0 \rightarrow ^1\text{I}_6$ 和 $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_4$ 能级跃迁^[21]。图中未观察到配体的发射峰, 表明配合物 1 和 2 在激发过程中存在配体到金属离子的能量转移。配合物 2 的荧光发射强度高于配合物

1,且主峰红移了 14 nm。由于稀土金属离子 f-f 跃迁禁阻,单一稀土金属离子的发光相对较弱。如果与有机配体配位,配体将能量有效传递给稀土金属离子,可以提高其特征发射^[25,26]。配体结构和取代基不同,决定了其能级、能量吸收及传递效率、振动弛豫等也不尽相同,往往可以导致稀土配合物吸收波长发生改变,荧光强度增强^[27]。 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{L}$ 配体中的羟基是供电子基团,因此,有利于配体向稀土金属离子的能量转移。此外,辅助配体 phen 的加入对配合物的发光性质的影响也不容忽视。一方面,其较强的配位能力,较高的共轭程度,较好的刚性有利于能量吸收和传递,增加稀土金属离子的能量来源;另一方面,其可以取代水分子占据中心离子的配位点,从而减小水分子高频振动的能量损失,进而提高发光效率^[28]。

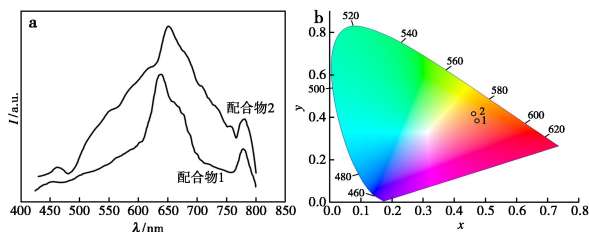


图 5 (a) 配合物 1 和 2 的荧光发射光谱;
(b) CIE 色度图

Fig.5 Fluorescence emission spectra (a) and CIE chromaticity diagram (b) of complexes 1 and 2

3 结论

以 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{L}$ 为配体,利用水热法与 Pr^{3+} 反应得到 2 个配合物。配合物 1 中, H_2L^{2-} 作为四齿桥连配体,利用 2 个羧酸基分别桥连相邻的 2 个 Pr^{3+} ,形成 1 个二维层状结构。 L^{4-} 作为六齿桥连配体,利用 2 个羧酸基和酚羟基桥连二维层中相邻的 3 个 Pr^{3+} ,将其拓展成 1 个三维网络结构, Schläfli 符号为 $\{4^2 \cdot 8^4\} \{4^6 \cdot 6^6 \cdot 8^3\} \{4^7 \cdot 6^3\}_2$ 。配合物 2 中, HL^{3-} 配体利用 1 个羧酸基与 Pr^{3+} 单齿配位, phen 分子作为封端配体与 Pr^{3+} 螯合配位,占据了其 2 个配位点,将结构过渡到单核结构。配合物 1 和 2 显示出 Pr^{3+} 的特征荧光发射峰,分别在 638 和 778 nm、652 和 781 nm 处呈橙色荧光,归属于 $^1\text{S}_0 \rightarrow ^1\text{I}_6$ 和 $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_4$ 能级跃迁。phen 分子的引入,增加了 Pr^{3+} 的特征荧光发射峰强度,主峰红移了 14 nm,可归因于 phen 分子的共轭体系以及与 Pr^{3+} 的配位相互作用。

参考文献:

- [1] YAN M, ZHU P Z, YANG S Y, et al. A newly-constructed hydrolytically stable $\text{Co}(\text{II})$ coordination polymer showing dual responsive fluorescence sensing of pH and Cu^{2+} [J]. *CrystEngComm*, 2021, **23**(24): 4 370-4 381.
- [2] 徐侨, 金京京, 张信凤. 基于封闭链释放型磁性 DNA 分子机器的化学发光传感体系 [J]. 分析试验室, 2022, **41**(12): 1 551-1 555.
- [3] 张涨展. Eu-2,5-二溴对苯二甲酸金属有机框架的合成及其对铈酰离子的荧光识别 [J]. 化学试剂, 2023, **45**(9): 70-75.
- [4] 刘向, 杜宪超, 顾慧莹, 等. 聚集诱导发光分子在毒性物质检测中的应用 [J]. 分析试验室, 2022, **41**(8): 984-992.
- [5] HASEGAWA Y, SHOJI S, KITAGAWA Y. Luminescent $\text{Eu}(\text{III})$ -based coordination polymers for photonic materials [J]. *Chem. Lett.*, 2022, **51**(2): 185-196.
- [6] KIMURA S, UEJIMA M, OTA W, et al. An open-shell, luminescent, two-dimensional coordination polymer with a honeycomb lattice and triangular organic radical [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**(11): 4 329-4 338.
- [7] ZHOU J, YU W T, TANG S S, et al. Tuning the bonding dimensions for coordination polymers based on rare earth metal ions [J]. *CrystEngComm*, 2022, **24**: 7 500-7 504.
- [8] ZHANG S H, ZHANG S Y, LI J R, et al. Rational synthesis of an ultra-stable $\text{Zn}(\text{II})$ coordination polymer based on a new tripodal pyrazole ligand for the highly sensitive and selective detection of Fe^{3+} and $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ in aqueous media [J]. *Dalton Trans.*, 2020, **49**(32): 11 201-11 208.
- [9] RAN J W, ZHAO X G, HU X Y, et al. 3D $\text{Tb}(\text{III})$ and $\text{Eu}(\text{III})$ coordination polymers with mixed dicarboxylate ligands: Synthesis, structure and luminescence properties [J]. *Polyhedron*, 2021, **194**: 114 910.
- [10] MUNIZ C N, PATEL H, FAST D B, et al. Rare earth niobate coordination polymers [J]. *J. Solid State Chem.*, 2018, **259**: 48-56.
- [11] SMITH J A, SINGH-WILMOT M A, CARTER K P, et al. Eight rare earth metal organic frameworks and coordination polymers from 2-nitroterephthalate: Syntheses, structures, solid-state luminescence and an unprecedented topology [J]. *New J. Chem.*, 2016, **40**: 7 338-7 349.
- [12] DILIP K M, SAHELI G, KEN-ICHI O, et al. Proton conductivity and sorption study in three sulfonic group functionalized mixed ligand coordination polymers and the impact of structural dynamicity on their property [J]. *Inorg. Chem.*, 2019, **58**(19): 12 943-12 953.
- [13] MONTSE B, INÉS R S, ROSARIO M P C, et al. Layered

- lanthanide sulfophosphonates and their proton conduction properties in membrane electrode assemblies [J]. *Chem. Mater.*, 2019, **31**(23): 9 625-9 634.
- [14] ZHANG Z T, SHI J, HE Y, et al. Self-assembly and crystal structure of a barium sulfonate chrysin coordination polymer [J]. *Inorg. Chem. Commun.*, 2006, **9**(6): 579-581.
- [15] D'VRIES R F, GOMEZ G E, MONDRAGON L P, et al. 1D lanthanide coordination polymers based on lanthanides and 4'-hydroxy-4-biphenylcarboxylic acid: Synthesis, structures and luminescence properties [J]. *J. Solid State Chem.*, 2019, **274**: 322-328.
- [16] LI X F, WU Y Y, LUN H J, et al. Four isostructural lanthanide coordination polymers based on rare coordinated citric acid: Syntheses, structures, magnetisms and luminescence [J]. *Syn. Metals*, 2017, **232**: 103-110.
- [17] LIU X Z, CHEN H T, FAN L M, et al. Syntheses, crystal structures, and luminescence properties of four coordination polymers based on 1,3,5-tris (imidazol-1-yl) benzene [J]. *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2017, **643**(2): 192-197.
- [18] SHELDRICK G M. Crystal structure refinement with SHELXL [J]. *Acta Crystallogr.*, 2015, **C71**: 3-8.
- [19] SHELDRICK G M. SHELXTL integrated space-group and crystal-structure determination [J]. *Acta Crystallogr.*, 2015, **A71**: 3-8.
- [20] KHARITONOV A D, TROFIMOVA O Y T, MESHCHERYAKOVA I N M, et al. 2D-metal-organic coordination polymers of lanthanides (La (III), Pr (III) and Nd (III)) with redox-active dioxolene bridging ligands [J]. *CrystEngComm*, 2020, **22**(28): 4 675-4 679.
- [21] YAN B, WANG W J, SONG Y H. Double fluorescence conversion in ultraviolet and visible region for some praseodymium complexes of aromatic carboxylates [J]. *J. Fluorescence*, 2006, **16**: 495-500.
- [22] MU X G, ZHANG Y H, WANG L N, et al. A family of coordination polymers derived from a flexible dicarboxylic acid and auxiliary N-donor ligands: Solvothermal synthesis, crystal structure and dye adsorption properties [J]. *Tran. Metal. Chem.*, 2021, **46**(3): 219-230.
- [23] WANG G L, TIAN Y M, CAO D X, et al. One-dimensional salen-type chain-like lanthanide (III) coordination polymers: Syntheses, crystal structures, and fluorescence properties [J]. *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2011, **637**: 583-588.
- [24] 王莹, 任浩, 关磊. 稀土发光纳米材料的制备与应用研究进展 [J]. 辽宁石油化工大学学报, 2016, **36**(4): 8-12.
- [25] MA L, EVANS O R, FOXMAN B M, et al. Luminescent lanthanide coordination polymers [J]. *Inorg. Chem.*, 1999, **38**(25): 5 837-5 840.
- [26] CHEN N, WANG C J, GUO M W, et al. The construction of a 3D Pr (III) coordination polymer based on 2-methylimidazole-4,5-dicarboxylate and oxalate ligands [J]. *Inorg. Nano-metal Chem.*, 2012, **42**(7): 981-986.
- [27] YAN L, ZHANG J L, HU H M, et al. Structural diversity and near-infrared luminescence of lanthanide coordination polymers with different flexibility and coordination orientation based on bipyridyl carboxylate and dicarboxylate ligands [J]. *J. Solid State Chem.*, 2020, **292**: 121 654.
- [28] CHUASAARD T, PANYARAT K, RODLAMUL P, et al. Structural variation and preference in lanthanide-pyridine-2,6-dicarboxylate coordination polymers [J]. *Cryst. Growth Des.*, 2017, **17**(3): 1 045-1 054.

用于 H_2PO_4^- 检测的比率型荧光探针合成及性能研究

郭昌晟, 陈君霞, 刘忆茹, 卢钰盛, 董智云, 席福贵*

(忻州师范学院 化学系, 山西 忻州 034000)

摘要:设计合成了一种基于吡啶-苯并咪唑鎓的大环受体 ABIM, 可作为 H_2PO_4^- 的荧光比率传感器。借助荧光光谱研究了受体 ABIM 对 H_2PO_4^- 的选择性识别, 在大环受体 ABIM 的乙腈溶液中加入 H_2PO_4^- 后, 在 426 nm 处荧光发射明显“关闭”, 506 nm 处荧光发射明显“打开”, 溶液荧光颜色由蓝色变为蓝绿色, 新的荧光发射峰可能是由于 H_2PO_4^- 诱导两个受体中的吡啶环之间形成 Excimer 产生的。ABIM 与 H_2PO_4^- 以 1:1 的化学计量比结合, 结合常数为 $(7.13 \pm 0.48) \times 10^6$ L/mol, 检出限为 2.38×10^{-7} mol/L, 最佳响应时间为 2 min。回收实验表明, ABIM 可应用于样品中 H_2PO_4^- 的检测。

关键词:吡啶; 苯并咪唑鎓; H_2PO_4^- ; 大环; 比率型荧光探针;

中图分类号: O65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)06-0033-06

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0062

Synthesis and Properties of Ratiometric Fluorescent Sensor for H_2PO_4^- GUO Chang-sheng, CHEN Jun-xia, LIU Yi-ru, LU Yu-sheng, DONG Zhi-yun, XI Fu-gui* (Department of Chemistry, Xinzhou Teachers University, Xinzhou 034000, China)

Abstract: An acridine-benzimidazolium based macrocyclic fluorescent sensor ABIM were designed and synthesized, which can be used as ratiometric fluorescent sensor for H_2PO_4^- . The selectivity of sensor ABIM with H_2PO_4^- was investigated by fluorescence spectroscopy. A clear “turn-off” of fluorescence emission at 426 nm and an apparent “turn-on” of fluorescence emission at 506 nm were observed upon addition of H_2PO_4^- , giving rise to change in the fluorescence color from blue to blue-green. The new fluorescence emission may be attributed to the H_2PO_4^- induced assembly of sensor ABIM forming the excimer conformation between two acridine rings. The results showed that the binding ratio for sensor ABIM to H_2PO_4^- was 1:1. The binding constant was calculated to be $(7.13 \pm 0.48) \times 10^6$ L/mol, the detection limit was 2.38×10^{-7} mol/L and the optimal response time was 2 minutes. The results also showed that sensor ABIM could be used to detection of H_2PO_4^- in the samples.

Key words: acridine; benzimidazolium; H_2PO_4^- ; macrocyclic; ratiometric fluorescent sensor

磷酸二氢根(H_2PO_4^-)是体内重要的酸碱平衡物质, 参与 DNA 构建、能量存储和信息转录等过程^[1-3], 因此 H_2PO_4^- 的识别和检测受到了广泛的关注^[4,5]。目前, 已报道的可用于识别 H_2PO_4^- 的荧光探针主要通过荧光“开启”(Turn on)^[6-8], 荧光“关闭”(Turn off)^[9-11], 荧光比率传感^[12-14]等方

式进行。相比而言, 荧光比率传感通过计算两个发射波长的荧光强度比值, 具有自校准功能, 可以有效消除单波长发射检测中环境因素, 如探针浓度、温度、溶剂极性、激发强度等的干扰^[15], 从而提高探针检测的灵敏度。此外, 阴离子配合后明显的荧光颜色变化将对阴离子的比色传感和生物成像具有实际意义^[16,17]。大环受体因其具有良好的稳定组织结构, 在键合客体的过程中可表现出特定的选择性^[18-21]。因此, 以吡啶-苯并咪

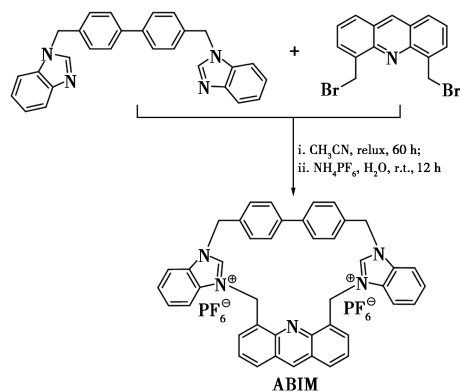


图 1 ABIM 的合成路线

Fig.1 Synthetic route of ABIM

收稿日期: 2024-01-28; 网络首发日期: 2024-04-03

基金项目: 山西省高等学校大学生创新创业训练计划项目 (2022001); 国家自然科学基金资助项目 (21701137)。

作者简介: 郭昌晟 (2002-), 男, 山西太原人, 本科生, 主要研究方向为荧光探针。

通讯作者: 席福贵, E-mail: xifugui@163.com。

引用本文: 郭昌晟, 陈君霞, 刘忆茹, 等. 用于 H_2PO_4^- 检测的比率型荧光探针合成及性能研究 [J]. 化学试剂, 2024, 46(6): 33-38。

唑和 4,4'-二(氯甲基)联苯为原料设计合成了大环受体 ABIM (图 1), 通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、FT-IR、ESI-MS、元素分析进行了表征, 并通过荧光光谱等研究了该受体分子对阴离子的识别性能。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Bruker 400 MHz 型核磁共振仪(德国布鲁克公司); IR Affinity-1s 型傅里叶变换红外光谱仪、LCMS-8030 型液相色谱质谱联用仪(日本岛津公司); Vario EL Cube 型元素分析仪(德国元素分析系统有限公司); Hitachi F-4600 型荧光光谱仪(日本日立公司)。

吡啶、4,4'-二(氯甲基)联苯(化学纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 溴甲氧基甲醚(化学纯, 上海阿达玛斯试剂有限公司); 苯并咪唑、六氟磷酸铵、阴离子 PO_4^{3-} 、 HPO_4^{2-} 采用钠盐(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 阴离子 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 AcO^- 、 ClO_4^- 、 HSO_4^- 、 H_2PO_4^- 采用四丁基铵盐(分析纯, 北京伊诺凯试剂有限公司); 4,5-二(溴甲基)吡啶参考文献[22]的方法制备; 4,4'-二(苯并咪唑-1-甲基)-联苯参考文献[23]的方法制备。

1.2 实验方法

1.2.1 大环受体 ABIM 的合成

在配有回流冷凝管和搅拌器的 500 mL 三口烧瓶中加入 200 mL 乙腈, 加热至 80 $^{\circ}\text{C}$, 缓慢等速同时滴加溶于 0.55 g (1.5 mmol) 乙腈的 4,5-二(溴甲基)吡啶和溶于 80 mL 乙腈的 0.62 g (3.0 mmol) 4,4'-二(苯并咪唑-1-甲基)-联苯, 40 h 滴完, 加热回流 60 h, 冷却至室温, 析出淡黄色固体, 抽滤, 少量无水乙醚洗涤 (15 mL $\times$ 3), 真空干燥后将所得固体置于两口瓶, 加入 0.25 g (1.5 mmol) NH_4PF_6 、30 mL 去离子水, 室温下搅拌 24 h, 过滤, 去离子水洗涤 (25 mL $\times$ 3), 真空干燥得 0.47 g 吡啶-咪唑鎓大环受体 ABIM, 产率 60%。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 10.39 (s, 2H, BimC₂-H); 9.39 (s, 2H, Ar-H); 8.33 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar-H); 7.99 ~ 8.11 (m, 3H, Ar-H); 7.83 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-H); 7.72 (t, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-H); 7.60 (d, 4H, J = 8.0 Hz, Ar-H); 7.48 ~ 7.58 (m, 8H, Ar-H); 6.54 (s, 4H, $-\text{CH}_2\times 2$); 5.80 (s, 4H, $-\text{CH}_2\times 2$)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz), δ : 146.9, 141.5, 139.2, 136.6, 135.4,

132.1, 131.5, 130.2, 129.8, 128.7, 127.6, 127.4, 127.3, 127.1, 126.8, 121.1, 114.0, 113.5, 49.2, 46.6。 IR (KBr), ν , cm^{-1} : 3 403, 3 273, 3 120, 2 980, 1 641, 1 582, 1 416, 1 199, 1 138, 836, 745, 642, 551。元素分析: $\text{C}_{43}\text{H}_{33}\text{F}_{12}\text{N}_5\text{P}_2$, 实测值(计算值), %: C 56.80 (56.77); H 3.59 (3.66); N 7.72 (7.70)。ESI-MS, m/z (%): 309.80 ([ABIM- PF_6] $^{2+}$, 100)。

1.2.2 荧光光谱测试方法

取 2 mL 吡啶-咪唑鎓大环受体 ABIM 的乙腈溶液 (5.0×10^{-6} mol/L) 置于比色皿中, 通过微量注射器逐次加入含有阴离子的乙腈溶液 (5.0×10^{-4} mol/L), 在发射波长 362 nm 照射下, 记录滴定过程中相应的荧光发射光谱。

利用荧光滴定数据计算检出限, 根据检出限公式 $\text{LOD} = 3\sigma/k$ (σ 为测定 11 次空白值的标准偏差, k 为拟合直线的斜率)^[24], 计算吡啶-咪唑鎓大环受体 ABIM 对阴离子 H_2PO_4^- 的检出限。

吡啶-咪唑鎓大环受体 ABIM 与 H_2PO_4^- 的结合常数根据荧光滴定数据, 用非线性最小二乘曲线拟合方法确定的^[25]。

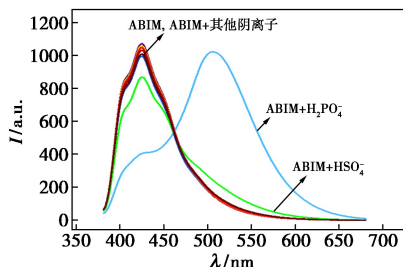
采用连续变量法 (Job's plot) 测定吡啶-咪唑鎓大环受体 ABIM 与阴离子之间的化学计量比^[26]。在此方法中, 制备相同浓度的受体和阴离子的乙腈溶液, 按不同比例混合, 保持混合物的总体积为 3 mL, 总浓度为 5.0×10^{-6} mol/L, 记录荧光发射光谱。

2 结果与讨论

2.1 吡啶-咪唑鎓大环受体 ABIM 对各种阴离子识别性能的研究

借助荧光光谱研究吡啶-咪唑鎓大环受体 ABIM 对各种阴离子的识别性能。在 ABIM 的 CH_3CN 溶液 (6.0×10^{-6} mol/L) 中, 分别加入含有阴离子 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 AcO^- 、 ClO_4^- 、 HSO_4^- 、 H_2PO_4^- 、 PO_4^{3-} 、 HPO_4^{2-} 的乙腈溶液 (6.0×10^{-4} mol/L), 使混合溶液中阴离子的浓度为受体 ABIM 浓度的 2 倍, 即 $c(\text{阴离子})/c(\text{ABIM}) = 2$, 在发射波长 362 nm 照射下, 测试混合溶液的发射光谱。如图 2 所示, ABIM 的荧光发射峰位于 426 nm, 对应于蓝色荧光, 加入 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 AcO^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 PO_4^{3-} 、 HPO_4^{2-} 后, ABIM 的荧光发射峰强度没有明显变化。加入 F^- 、 HSO_4^- 后, ABIM 的

荧光发射峰强度分别减弱了 7% 和 19%, 而加入 H_2PO_4^- 后, ABIM 的荧光发射峰发生了明显的红移, 由 426 nm 红移至 506 nm, 红移了 80 nm, 可见, 大环受体 ABIM 对阴离子 H_2PO_4^- 表现出较高的选择性。



激发波长 E_x 为 362 nm, 狭缝宽度为 5 nm

图 2 ABIM 的 CH_3CN 溶液 ($5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 中加入不同阴离子后的荧光光谱变化图

Fig.2 Fluorescence spectra of ABIM in CH_3CN

($5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) upon addition of various anions

通过荧光滴定光谱进一步研究了大环受体 ABIM 对阴离子 H_2PO_4^- 的响应效果。在 ABIM 的 CH_3CN 溶液 ($5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 中逐次加入阴离子 H_2PO_4^- , 使 $c(\text{阴离子})/c(\text{ABIM})$ 依次为 0、0.1、0.2、...、0.9、1.0。如图 3 所示, 随着 H_2PO_4^- 的不断加入, ABIM 位于 426 nm 处的荧光发射明显“关闭”(Turn off), 506 nm 处的荧光发射明显“开启”(Turn on), 并且发射峰强度先减弱, 后增强。如图 3 中的内插图所示, 在 365 nm 紫外灯照射下, ABIM 的 CH_3CN 溶液中加入 H_2PO_4^- 后, 溶液的荧光颜色由蓝色变为蓝绿色。由图 4 可知, 在 $0 \sim 6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 范围内, 荧光强度比值 F_{506}/F_{426} 与 H_2PO_4^- 浓度成线性关系 ($R^2 = 0.9929$), ABIM 对 H_2PO_4^- 的检出限为 $2.38 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。荧光强

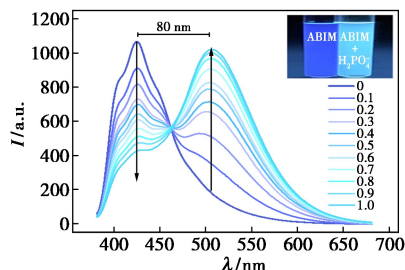


图 3 ABIM 的 CH_3CN 溶液 ($5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 中加入不同浓度 H_2PO_4^- 后的荧光光谱变化图

Fig.3 Change in fluorescence intensity of ABIM in CH_3CN ($5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) after the addition of H_2PO_4^- with different concentrations

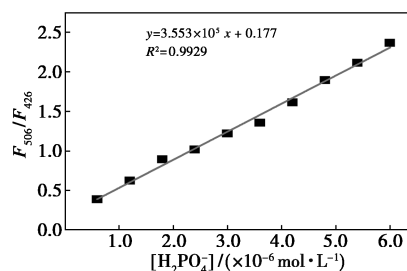


图 4 荧光强度比值 F_{506}/F_{426} 与 H_2PO_4^- 浓度的线性响应曲线

Fig.4 Linear relationship between the fluorescence intensity ratio F_{506}/F_{426} and H_2PO_4^- concentrations

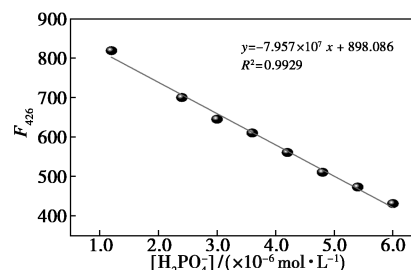


图 5 荧光强度 F_{426} 与 H_2PO_4^- 浓度的线性响应曲线

Fig.5 Linear relationship between the fluorescence intensity F_{426} and H_2PO_4^- concentrations

度 F_{426} 随 H_2PO_4^- 浓度线性增加 ($R^2 = 0.9929$), 也可用于 H_2PO_4^- 的定量检测 (图 5), 检出限为 $2.80 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, 由此可见, 荧光比率法的检出限比单波长的检出限更低、更灵敏。

在 CH_3CN 溶液中, 测试了大环受体 ABIM 识别 H_2PO_4^- 的响应时间。如图 6 所示, 在 ABIM 的 CH_3CN 溶液中, 加入 H_2PO_4^- , 使 $c(\text{H}_2\text{PO}_4^-)/c(\text{ABIM}) = 2$, 在 2 min 内荧光强度比值 F_{506}/F_{426} 显著增加, 表明 ABIM 与 H_2PO_4^- 的配合可以在 2 min 内完成。因此, 将 2 min 作为所有荧光检测识别 H_2PO_4^- 的最佳响应时间。

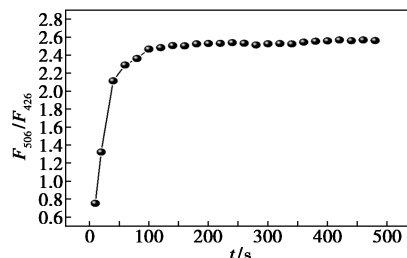


图 6 时间对荧光强度比值 F_{506}/F_{426} 的影响

Fig.6 Effect of time on the fluorescence intensity ratio

F_{506}/F_{426}

图 7 显示了 H_2PO_4^- 和其他阴离子对 ABIM 的荧光强度比值 F_{506}/F_{426} 的影响, 可以看出, 竞争

性阴离子 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 HSO_4^- 、 AcO^- 、 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 未引起明显的干扰。在这些阴离子存在下,加入 H_2PO_4^- 后,荧光强度比值 F_{506}/F_{426} 仍大于 2,表明 ABIM 对 H_2PO_4^- 具有较好的选择性,可作为 H_2PO_4^- 的比率型荧光探针。

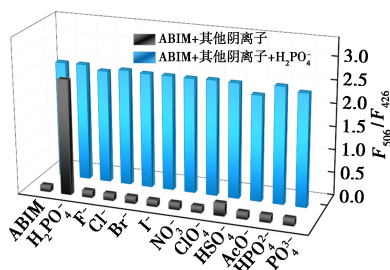


图 7 ABIM 的乙腈溶液中加入其他阴离子以及加入其他阴离子和 H_2PO_4^- 后的荧光强度比值 F_{506}/F_{426} 变化图

Fig.7 Fluorescence intensity ratio F_{506}/F_{426} of ABIM in CH_3CN upon individual addition of various anions and followed by further addition of H_2PO_4^-

2.2 大环受体 ABIM 识别 H_2PO_4^- 的机理

为了研究大环受体 ABIM 与 H_2PO_4^- 的结合模式,采用最小二乘法非线性拟合计算得到吡啶-咪唑鎓大环受体 ABIM 和 H_2PO_4^- 的结合常数 K 为 $(7.13 \pm 0.48) \times 10^6 \text{ L/mol}$,相关系数 $R^2 = 0.9853$,

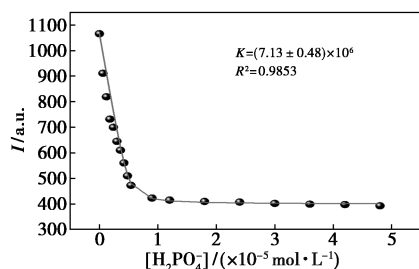


图 8 ABIM 和 H_2PO_4^- 在 426 nm 处的荧光滴定的非线性拟合曲线

Fig.8 Non-linear curve fitting of fluorescent titrations of ABIM and H_2PO_4^- at 426 nm

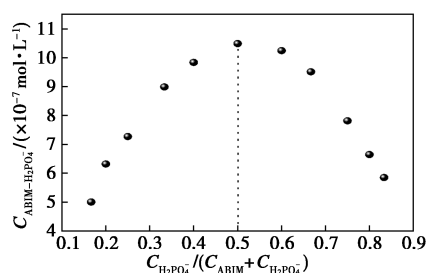


图 9 ABIM- H_2PO_4^- 的 Job's 工作曲线

Fig.9 Job's plot for ABIM- H_2PO_4^-

表明 ABIM 和 H_2PO_4^- 的化学计量比为 1:1 (图 8)^[27]。图 9 中的 Job's 工作曲线再次证实 ABIM 和 H_2PO_4^- 的结合比为 1:1^[28]。

结合荧光光谱变化,推测大环受体 ABIM 和 H_2PO_4^- 可能的相互作用模型如图 10 所示。由于 H_2PO_4^- 中 2 个部分带电氧原子的定向性质,因此 H_2PO_4^- 阴离子位于受体 ABIM 的空腔上方,与大环 ABIM 中 2 个向上指向的苯并咪唑鎓的 C_2-H 形成离子型氢键,化学计量为 1:1,对应于光致电子转移(PET)过程导致的荧光猝灭^[29]。然而,随着 H_2PO_4^- 浓度的增高,会诱导受体分子之间发生自组装,荧光基团吡啶之间的 $\pi-\pi$ 堆积作用增强,产生 Excimer 效应,从而出现明显的激基缔合物的发射峰并增加,对应于荧光发射峰红移并不断增强^[30]。

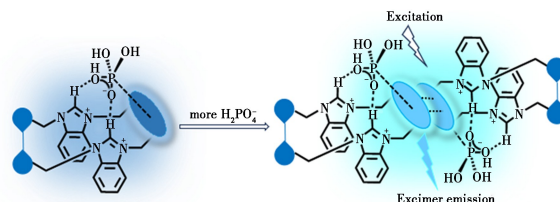


图 10 ABIM 和 H_2PO_4^- 可能的相互作用模型
Fig.10 Possible interaction model for ABIM with H_2PO_4^-

2.3 样品中 H_2PO_4^- 的测定

移取 3 mL 大环受体 ABIM 的乙腈溶液 ($5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$),分别加入 3 μL 浓度为 7.5×10^{-3} 、 5.0×10^{-3} 和 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的四丁基磷酸二氢铵的乙腈溶液,使混合溶液中 H_2PO_4^- 的浓度分别为 7.5×10^{-6} 、 5.0×10^{-6} 和 $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$,2 min 后测试荧光发射光谱,结果见表 1,该法测量 H_2PO_4^- 的精确度较好,回收率分别为 99.8%、104.0% 和 100.5%,可用于样品中 H_2PO_4^- 的检测。

表 1 大环受体 ABIM 的乙腈溶液中 H_2PO_4^- 检测结果

Tab.1 Determination of H_2PO_4^- in CH_3CN using macrocyclic receptor ABIM

样品加入量/ ($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	检测量/ ($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/ %	Recovery/ %
7.5	7.486 ± 0.066	0.78	99.8
5.0	5.201 ± 0.035	0.69	104.0
2.5	2.513 ± 0.048	1.06	100.5

3 结论

本文合成了一种基于吡啶-咪唑鎓大环受体

ABIM,并通过 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 、FT-IR、ESI-MS、元素分析进行了表征,该大环受体 ABIM 可作为阴离子 H_2PO_4^- 的比率型荧光探针。加入 H_2PO_4^- 时,大环受体 ABIM 的荧光发射峰出现了明显的红移,产生 Excimer 效应,紫外灯照射下,可观察到溶液由蓝色变为蓝绿色。ABIM 与 H_2PO_4^- 的化学计量比为 1:1,结合常数为 $(7.13 \pm 0.48) \times 10^6 \text{ L/mol}$,检出限为 $2.38 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$,最佳响应时间为 2 min。该研究结果为设计开发 H_2PO_4^- 的比率型荧光探针提供了有益的参考。

参考文献:

- [1] FURMAN P A, FYFE J A, CLAIR M H S, et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**(21): 8 333-8 337.
- [2] HAMACHI I, OJIDA A, MITOOKA Y. Molecular recognition and fluorescence sensing of monophosphorylated peptides in aqueous solution by bis (zinc (II)-dipicolylamine)-based artificial receptors [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**(8): 2 454-2 463.
- [3] 董智云, 韩喜龙, 王迎进, 等. 吡啶-苯并咪唑鎓环番化合物在检测 H_2PO_4^- 中的应用 [J]. *化学试剂*, 2021, **43**(5): 692-697.
- [4] 韩冬梨, 格根塔娜, 杜艳青, 等. 识别磷酸二氢根离子荧光探针的研究进展 [J]. *化学研究与应用*, 2020, **32**(6): 905-917.
- [5] LA Y T, YAN Y J, LI X, et al. A novel Salamo-Salen-Salamo hybrid $\text{Mg}(\text{II})$ complex fluorescent chemosensor for highly effective monitoring H_2PO_4^- in Zebrafish and plants [J]. *J. Mol. Struct.*, 2024, **1 295**: 136 641.
- [6] SINGH G, TAMA N A, JASHAN D K, et al. Click-generated triazole-based silanes potent chemosensor for dihydrogen phosphate [J]. *ChemistrySelect*, 2023, **8**(22): e202 300 532.
- [7] LI X, HU Z F, GAN L L, et al. Paradoxical fluorescein-naphthalene salamo-salen-salamo $\text{Zn}(\text{II})$ complex as a H_2PO_4^- targeted chemosensor and its application in water samples [J]. *J. Mol. Struct.*, 2023, **1 278**: 134 968.
- [8] ZHANG Y H, HUANG H W, LI Z M, et al. A ferrocene-pyrene dyad for multiple channel sensing of F^- and H_2PO_4^- [J]. *Appl. Organomet. Chem.*, 2023, **37**(2): e6 945.
- [9] YANG S, HUANG Y C, LU A D, et al. A highly selective and sensitive sequential recognition probe Zn^{2+} and H_2PO_4^- based on chiral thiourea schiff base [J]. *Molecules*, 2023, **28**(10): 4 166.
- [10] 温雨柔, 王浩洋, 赵翔, 等. 咪唑基化学传感器识别各种阴离子研究进展 [J]. *化学试剂*, 2023, **45**(3): 74-84.
- [11] 董智云, 刘洋, 王迎进, 等. 基于萘酰亚胺-苯并咪唑的荧光传感器对 H_2PO_4^- 的高选择性识别 [J]. *应用化学*, 2020, **37**(7): 839-846.
- [12] ZHU C M, LIU L J, ZHOU Y, et al. An acylhydrazone derivative bearing solution and solid-state fluorescence with large stokes shift, and sensing abilities toward $\text{OAc}^-/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ [J]. *Res. Chem. Intermediat.*, 2023, **49**(7): 3 245-3 262.
- [13] 李亚平, 张晓霞, 邱成强, 等. 一种对 MnO_4^- 和 H_2PO_4^- 具有选择性识别的基于 Cd^{II} 配位聚合物的双功能荧光传感 [J]. *无机化学学报*, 2022, **38**(10): 1 948-1 958.
- [14] DU K, NIU S Z, CHEN X Z, et al. A novel highly selective ratiometric fluorescent sensor for relay recognition of Zn^{2+} and H_2PO_4^- [J]. *Tetrahedron Lett.*, 2018, **59**(4): 356-360.
- [15] QI Y L, LI Y Z, TAN M J, et al. Recent advances in organic near-infrared ratiometric small-molecule fluorescent probes [J]. *Coordin. Chem. Rev.*, 2023, **486**: 215 130.
- [16] 张春香, 张向阳, 申有名, 等. 基于快速响应的红色 ONOO^- 荧光探针及其细胞成像 [J]. *化学试剂*, 2023, **45**(4): 1-7.
- [17] XU K, GAO L W, LIANG Y Y, et al. A ratiometric near-infrared fluorescent probe with a large Stokes shift for rapid and sensitive detection of hydrogen sulfide in food samples and imaging in biological system [J]. *J. Food Compos. Anal.*, 2024, **127**: 106 005.
- [18] JIANG C R, SONG Z R, YU L L, et al. Fluorescent probes based on macrocyclic hosts: Construction, mechanism and analytical applications [J]. *Trend. Anal. Chem.*, 2020, **133**: 116 086.
- [19] XIONG S L, KISHORE M V N, ZHOU W, et al. Recent advances in selective recognition of fluoride with macrocyclic receptors [J]. *Coordin. Chem. Rev.*, 2022, **461**: 214 480.
- [20] ZHANG H N, SONG J Z, WANG S X, et al. Recent progress in macrocyclic chemosensors for lead, cadmium and mercury heavy metal ions [J]. *Dyes Pigments*, 2023, **216**: 111 380.
- [21] PAUL B, MUKHERJEE A, BHUYAN D, et al. Construction of unsymmetrical bis-urea macrocyclic host for neutral molecule and chloride-ion binding [J]. *J. Heterocyclic*

- Chem.*, 2021, **58**(10): 2 033-2 038.
- [22] CHIRON J, GALY J P. Reactivity of the acridine ring: One-pot regioselective single and double bromo methylation of acridine and some derivatives [J]. *Synlett*, 2003, **15**: 2 349-2 350.
- [23] 曹大鹏, 姚小强, 郑和根. 二维层状锌配合物 $[\text{Zn}(\text{bim})(\text{glu})]_n$ 的合成、晶体结构及荧光性质 [J]. *无机化学学报*, 2011, **27**(5): 903-906.
- [24] GOSWAMI S, DAS A K, MANNA A, et al. Nanomolar detection of hypochlorite by a rhodamine-based chiral hydrazide in absolute aqueous media: Application in tap water analysis with live-cell imaging [J]. *Anal. Chem.*, 2014, **86**(13): 6 315-6 322.
- [25] VALEUR B, POUGET J, BOURSON J. Tuning of photo-induced energy transfer in a bichromophoric coumarin supermolecule by cation binding [J]. *J. Phys. Chem.*, 1992, **96**(16): 6 545-6 549.
- [26] HERBERT J M, WOODGATE P D, DENNY W A. Potential antitumor agents. 53. Synthesis, DNA binding properties, and biological activity of perimidines designed as minimal dna-intercalating agents [J]. *J. Med. Chem.*, 1987, **30**(11): 2 081-2 086.
- [27] 董智云, 王拾梅, 赵三虎, 等. 含脲-喹啉受体分子的合成及其对醋酸根离子的特性荧光识别 [J]. *化学试剂*, 2019, **41**(12): 1 245-1 249.
- [28] GUO C X, SUN S T, HE Q, et al. Pyrene-linked formylated bis (dipyrromethane): A fluorescent probe for dihydrogen phosphate [J]. *Org. Lett.*, 2018, **20**(17): 5 414-5 417.
- [29] ZHOU J, YUAN Y F, ZHUO J B, et al. Synthesis and characterization of cyclophane: The highly selective recognition of Fe^{3+} in aqueous solution and H_2PO_4^- in acetonitrile solution [J]. *Tetrahedron Lett.*, 2018, **59**(11): 1 059-1 064.
- [30] ZHANG D W, JIANG X Z, YANG H Q, et al. Acridine-based macrocyclic fluorescent sensors: Selfassembly behavior characterized by crystal structures and a tunable bathochromic-shift in emission induced by H_2PO_4^- via adjusting the ring size and rigidity [J]. *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**: 3 375-3 381.

电化化和新能源

碳酸钙还原低热耦合与二氧化碳绿色原位转化

王正义¹, 唐美², 张冰姿³, 蔡正宇⁴, 何国强^{*1}(1.中国计量大学 材料与化学学院, 浙江 杭州 310018; 2.广西大学 物理科学与工程技术学院, 广西 南宁 530004;
3.杭州职业技术学院 生态健康学院, 浙江 杭州 310018; 4.三亚学院 盛宝金融科技商学院, 海南 三亚 572022)

摘要: 碳酸钙 (CaCO_3) 是水泥和钢铁生产等行业常见的矿产资源。然而, 其高温分解产生的能源损失和二氧化碳 (CO_2) 排放是亟需解决的问题。因此, 提出了利用甲烷 (CH_4)、氢气 (H_2)、碳 (C) 和乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 与亚微米级 CaCO_3 的耦合反应以降低分解温度并实现 CO_2 原位转化, 在此基础上进行了热力学和耦合产物的分析, 同时在经济层面上展开了对比。研究表明, CH_4 对 CaCO_3 分解温度的降低最显著, H_2 次之; C 被用作还原剂时副产物最少; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 与 CaCO_3 的耦合反应中 H_2 和一氧化碳 (CO) 的产率最高。通过还原剂耦合不仅可以在较低温度下再生氧化钙 (CaO), 还可将 CO_2 原位转化为高值产物, 如 H_2 和 CO , 从而减少 CO_2 排放。

关键词: CaCO_3 分解; 耦合反应; 低热还原; CO_2 原位转化; CO_2 排放

中图分类号: TQ115 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)06-0039-07

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0851

Low-thermal Coupling of CaCO_3 Reduction and Green In-situ Conversion of CO_2 WANG Zheng-yi¹, TANG Mei², ZHANG Bing-zi³, CAI Zheng-yu⁴, HE Guo-qiang^{*1} (1.School of Materials and Chemistry, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2.School of Physical Science and Technology, Guangxi University, Nanning 330100, China; 3.Ecology and Health Institute, Hangzhou Vocational & Technical College, Hangzhou 310018, China; 4.Saxo Fintech Business School, University of Sanya, Sanya 572022, China)

Abstract: Calcium carbonate (CaCO_3) is a common mineral resource in industries such as cement and steel production. However, the energy loss and CO_2 emissions associated with its high-temperature decomposition are of urgent concern. In this study, a coupling reaction between submicron CaCO_3 and CH_4 , H_2 , C , and $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ was proposed to reduce the decomposition temperature and facilitate in-situ CO_2 conversion. Thermodynamic analysis and characterization of the coupling products were conducted, along with an economic evaluation. The results demonstrated that CH_4 had the most significant effect on reducing the decomposition temperature of CaCO_3 , followed by H_2 . When C was utilized as the reducing agent, the by-products were the least. In the coupling reaction of $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ with CaCO_3 , higher productivity of H_2 and CO was observed. The utilization of these reducing agents not only enabled the regeneration of CaO at lower temperatures but also facilitated the conversion of CO_2 into valuable products such as H_2 and CO , leading to a reduction in CO_2 emissions.

Key words: CaCO_3 decomposition; coupling reaction; low-thermal reduction; in-situ conversion of CO_2 ; CO_2 emissions

碳酸钙 (CaCO_3)、碳酸镁 (MgCO_3) 等碳酸盐在水泥和钢铁生产等行业中是必不可少的溶剂、稳定剂和原材料^[1-4]。这些碳酸盐在高温下热分解, 生成相应的金属氧化物, 用于各种中下游工业中。然而, 这个过程会导致能量损耗和大量二氧化碳 (CO_2) 原位排放, 为环境保护带来严峻的挑战。 CO_2 是温室气体排放的最大贡献者, 占全球排放量的 70% 以上^[5-7]。据估计, 到 2035 年 CO_2 浓度的上涨可导致全球平均温度升高 2 °C^[1,8]。尽管碳捕集、利用和储存 (CCUS) 技术被认为是

实现碳减排和碳中和目标的有效手段之一, 但高昂的成本和额外的能源需求阻碍了其广泛的应用, 碳捕集作为首要步骤的重要性显而易见^[9-13]。

收稿日期: 2023-12-31; 网络首发日期: 2024-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51502044)。

作者简介: 王正义 (1999-), 男, 山东潍坊人, 硕士生, 主要研究方向为交通碳中和。

通讯作者: 何国强, E-mail: youmehe@cjl.u.edu.cn。

引用本文: 王正义, 唐美, 张冰姿, 等. 碳酸钙还原低热耦合与二氧化碳绿色原位转化[J]. 化学试剂, 2024, 46(6): 39-45。

研究表明,捕集的 CO_2 可以用作有经济价值的碳氢化合物和醇类有机化合物的原料,从而间接降低与碳捕集过程相关的成本。例如,可以在 $120\sim 170\text{ }^\circ\text{C}$ 的温度范围内,利用 CO_2 合成高价值的羧酸^[14];Song 等^[15] 利用太阳能在常压下实现了 CO_2 一步合成烷烃和烯烃;乔华建等^[16] 使用 Cu-Ag 双金属电催化还原 CO_2 生成 C_2H_4 ,选择性提高 121%。目前已有相关学者针对碳捕集和碳利用的整合进行研究^[17-20],但低的 CO_2 转化率阻碍了该方向的发展。

CaCO_3 在高温下可以作为稳定和持续的 CO_2 供给源。然而,在不同条件下 CO_2 的产量、产物组成和原料烧结程度均存在显著差异。降低 CaCO_3 的分解温度可以直观地减少能源损耗和成本。目前,通过调整粒径大小、添加惰性载体等方法降低温度局限性明显^[21-23],无法达到预期效果。一些研究人员发现,碳酸盐在还原气氛中煅烧时,不仅可以降低分解温度,而且可同时将 CO_2 原位转化为高值产物,如一氧化碳(CO)^[24,25]。这是由于还原物与碳酸盐发生反应后降低了碳酸盐分解所需的活化能,从而降低了分解温度。因此,在碳捕集过程中引入还原剂可以解决高能耗的问题,并通过 CO_2 原位转化来替代 CO_2 的储存和运输以减少成本。

氢气(H_2)具有强还原性,可显著降低碳酸盐的分解温度,同时实现 CO_2 的原位转化^[26]。随着太阳能和潮汐能等可再生能源的发展,价格低廉且可实现零碳排放的绿氢已经成为科学家关注的焦点^[27]。甲烷(CH_4)在高温下相比 H_2 具有更高的安全性。甲烷的干重整(DRM)在 CO_2 利用方面表现出较为突出的潜力,通过改变反应平衡实现高 CO_2 转化率,并生产高纯度的 CO ^[28,29]。乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)和碳(C)分别是还原性较强的液态和固态材料,具有稳定性、实用经济性和广泛性。

到目前为止,关于还原剂与 CaCO_3 发生耦合反应的相关研究或文献较少,没有详细明确的研究。因此,本文利用甲烷(CH_4)、氢气(H_2)、碳(C)和乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)作为气态、固态、液态 3 种不同形态的还原剂与亚微米级 CaCO_3 进行耦合反应以降低 CaCO_3 分解温度并实现 CO_2 原位转化,从热力学角度进行分析,讨论并比较不同还原剂作用下的产物组成、 CO_2 原位转化率和 CaCO_3 的转化率等,提供 4 种还原剂在经济成本上的区别以供进一步应用。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

YP-2002 型电子天平(上海精密仪器仪表有限公司);GC-128 型气相色谱仪(上海仪电分析仪器有限公司);ACU20FD-M 型高精度质量流量控制器(北京精量科技有限公司);DHG-9023A 型台式鼓风干燥箱(上海左乐仪器有限公司);STA449F3 型热重分析仪(德国 NETZSCH 公司)。

CH_4 ($\geq 98\text{ mol}\%$)、 H_2 ($\geq 99\text{ mol}\%$)、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (分析纯)、 CO_2 ($\geq 99\text{ mol}\%$)、 N_2 ($\geq 99\text{ mol}\%$)(武汉纽瑞德特种气体有限公司); C (分析纯,上海巷田纳米材料有限公司);亚微米级 CaCO_3 (分析纯,宁波贝伽尔新材料有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 CaCO_3 与还原剂的预处理

实验前, CaCO_3 和 C 需在 $120\text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥 1 h。 CaCO_3 与 C 耦合反应前需进行两次充分研磨以保证二者充分接触。 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 沸点较低(常压下为 $78.3\text{ }^\circ\text{C}$),泵入反应管前预加热为气态。 CH_4 和 H_2 无需预处理。

1.2.2 CaCO_3 与还原剂的耦合实验

采用固定床反应器-气相色谱仪/热重分析仪系统对 CaCO_3 与还原剂的耦合反应进行分析。常压条件下,称取一定质量的 CaCO_3 置于反应管中,在 $200\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下通入还原剂或其他气体(CaCO_3 和 C 的混合物于常温下置于反应管中),以 $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升至 $1\text{ }000\text{ }^\circ\text{C}$ 。过程中用质量流量控制器控制不同还原剂保持相同且稳定的进气量。气相色谱仪和热重分析仪实时监测分析并记录,气体产物利用热导检测(TCD),固体产物根据重力变化进行分析。

CaO 实际平衡产率:

$$\alpha = (Y_{\text{actual}}/Y_{\text{theoretical}}) \times 100\% \quad (\text{I})$$

CaCO_3 转化率:

$$X_{\text{CaCO}_3} = (n_{\text{CO}_2}/n_{\text{CaCO}_3}) \times 100\% \quad (\text{II})$$

式中, α 为 CaO 的实际平衡产率; Y_{actual} 和 $Y_{\text{theoretical}}$ 分别为 CaO 的实际产率和理论产率; X_{CaCO_3} 为 CaCO_3 的转化率; n_{CO_2} 和 n_{CaCO_3} 分别为解吸 CO_2 的物质的量和 CaCO_3 初始物质的量。

2 结果与讨论

亚微米 CaCO_3 与 CH_4 、 H_2 、 C 和 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 的耦合反应是一个复杂的体系,其中会发生一些副反应。例如, H_2 和 CaCO_3 的耦合涉及反向水煤气变

换和反向 CH_4 蒸汽重整等反应。这些不同的反应记录在表 1 中,可以从热力学的角度评估耦合反应的可行性。 CH_4 、 H_2 、 C 和 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 与 CaCO_3 之间的反应热力学在文献[30-32]中已有部分记录。图 1 为亚微米 CaCO_3 与不同形式还原剂之间的耦合反应的示意过程。气态还原剂(如 CH_4

和 H_2) 与 CaCO_3 有较大的接触面积,可在高温下产生 CO 、 H_2 、 H_2O 和 CH_4 等。固态还原剂 C 与 CaCO_3 接触面积相对较小,只能将 CO_2 原位转化为一定量的高纯度 CO 。 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 是一种液态还原剂,在进行耦合反应时需注意其自分解为乙烯和乙醚等杂质(反应 14)^[33]。

表 1 CaCO_3 与还原剂耦合的主要反应

Tab.1 Main reactions in the coupling of CaCO_3 and reducing agent

反应名称	主/副反应		$\Delta H_{298.15}^0 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G_{298.15}^0 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
CaO 吸附	$\text{CaO} + \text{CO}_2 = \text{CaCO}_3$	(1)	-179.2	-131.4
CaCO_3 分解	$\text{CaCO}_3 = \text{CaO} + \text{CO}_2$	(2)	179.2	131.4
CaCO_3 耦合反应	$\text{CaCO}_3 + \text{CH}_4 = \text{CaO} + 2\text{CO} + 2\text{H}_2$	(3)	426.3	301.9
	$\text{CaCO}_3 + \text{H}_2 = \text{CaO} + \text{CO} + \text{H}_2\text{O}$	(4)	220.4	160.0
	$\text{CaCO}_3 + 4\text{H}_2 = \text{CaO} + \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	(5)	14.5	18.1
	$\text{CaCO}_3 + \text{C} = \text{CaO} + 2\text{CO}$	(6)	351.7	251.4
	$\text{CaCO}_3 + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = \text{CaO} + 3\text{CO} + 3\text{H}_2$	(7)	518.8	289.0
逆水煤气反应	$\text{CO}_2 + \text{H}_2 = \text{CO} + \text{H}_2\text{O}$	(8)	41.2	28.6
反向 CH_4 蒸汽重整	$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 = \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	(9)	-164.7	-113.3
CH_4 干重整	$\text{CH}_4 + \text{CO}_2 = 2\text{CO} + 2\text{H}_2$	(10)	247.1	170.5
甲烷化反应	$\text{CO} + 3\text{H}_2 = \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	(11)	-205.9	-141.9
CH_4 裂解	$\text{CH}_4 = \text{C} + 2\text{H}_2$	(12)	-74.6	25.6
C 歧化反应	$\text{C} + \text{CO}_2 = 2\text{CO}$	(13)	172.5	120.0
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 裂解	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = \text{C}_2\text{H}_4 + \text{H}_2\text{O}$	(14)	88.2	14.6
	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CH}_4 + \text{C} + \text{CO} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	(15)		
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 产生合成气	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CO}_2 = 3\text{CO} + 3\text{H}_2$	(16)	339.6	157.6

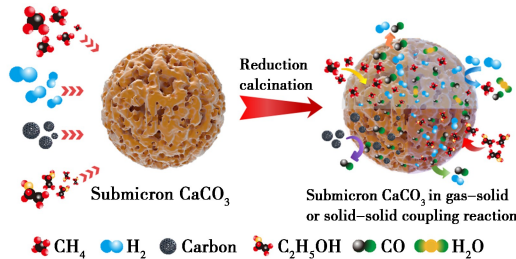


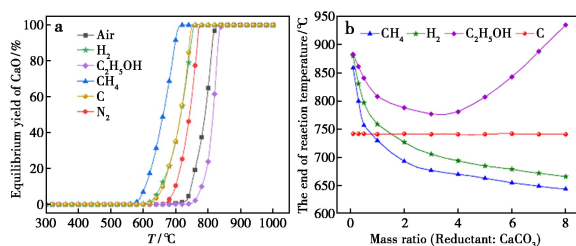
图 1 不同还原剂与亚微米级 CaCO_3 耦合反应示意图

Fig.1 Schematic diagram of coupling reaction of different reducing agents with submicron CaCO_3

图 2a 为 300~1 000 $^{\circ}\text{C}$ 范围内 CaO 的实际平衡产率。亚微米 CaCO_3 在空气中的分解温度为 670 $^{\circ}\text{C}$, 结束温度为 825 $^{\circ}\text{C}$, 而在 N_2 气氛中分解温度和结束温度分别降低了 40、83 $^{\circ}\text{C}$ 。这种差异是由于常温空气中 CO_2 的限制效应, 从而需要更高的温度促进放热反应。此外, 空气中水蒸气等因素也可能会影响该过程^[34,35]。总之, 减少 CaCO_3 分解过程中 CO_2 的浓度对于推动反应正向进行是有利的, 这些方法包括物理分离 CO_2 、 CO_2 还原或转化为碳氢化合物等。Reller 等^[36]发

现, H_2 气氛中 CaCO_3 可以在低至 500 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下分解, 远低于常温空气中的分解温度。Shi 等^[37]实验证实, 在一定压力条件下 CaCO_3 和 H_2 可以产生 CO 和 CH_4 。在本研究中, 引入 H_2 还原剂通过耦合反应有效降低了 CO_2 的浓度, 从而推动 CaCO_3 反应正向进行, 降低了分解温度。 CH_4 作为 CaCO_3 分解过程中的另一种有前景的还原剂, 耦合反应起始温度为 550 $^{\circ}\text{C}$, 相比 H_2 的分解温度降低了 46 $^{\circ}\text{C}$ 。这是因为 CH_4 裂解生成的 H_2 也促进了 CaCO_3 的分解(反应 12)。而 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 耦合反应的温度性能相对较差(697 $^{\circ}\text{C}$ 的起始温度和 840 $^{\circ}\text{C}$ 的结束温度)。在 300~550 $^{\circ}\text{C}$ 的耦合反应的初始阶段, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 裂解生成 H_2 、 CH_4 、 CO_2 、 CO 、 C 和 H_2O 等物质(反应 15), 产生的 CO_2 阻碍了耦合反应的进行(反应 7), 而产生的 C 导致了碳沉积, 降低了反应的接触面积^[38]。图 2b 展示了不同还原剂与 CaCO_3 物质的量比对耦合反应结束温度的影响。在 CH_4 和 H_2 的耦合反应中, 较高的物质的量比有利于反应的进行。 C 的物质的量比对耦合反应的影响不明显。随着 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

物质的量比的增加,耦合反应的结束温度最初会降低,特别是少量 C_2H_5OH 时,在 $300 \sim 500\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内完全裂解,如上所述,产生的 CO_2 和 C 会抑制 $CaCO_3$ 的分解。随着 C_2H_5OH 物质的量比增加,与 $CaCO_3$ 耦合反应时发生不完全裂解,产生的 H_2 和 CH_4 也参与 $CaCO_3$ 的分解,从而显现出较低的结束温度。然而,过量的 C_2H_5OH 会导致大量 CO_2 和 C 的产生,负面影响显著,使得最终温度快速上升。

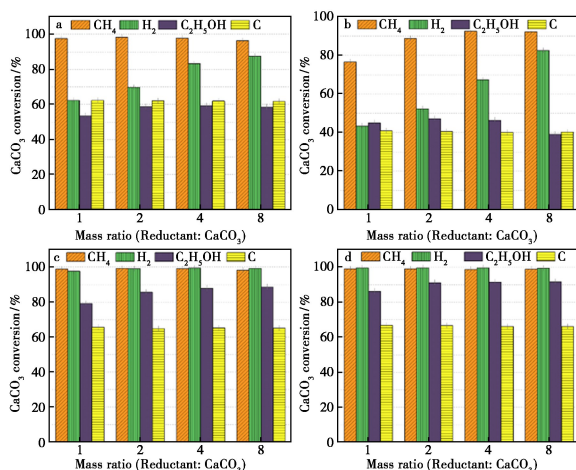


a. 煅烧温度对 CaO 实际平衡产率的影响; b. 不同还原剂与 $CaCO_3$ 物质的量比对 100% CaO 平衡产率时结束温度的影响

图 2 不同还原剂作用下 $CaCO_3$ 的分解情况

Fig.2 Decomposition of $CaCO_3$ under different reducing agents

$CaCO_3$ 的转化率是定义反应效果的关键参数。图 3 为不同还原剂物质的量比在 700 、 750 、 800 和 $850\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 $CaCO_3$ 转化率。在 CH_4 、 H_2 和 C_2H_5OH 的耦合反应中,随着温度的升高, $CaCO_3$ 的转化率显著增加。当 CH_4 物质的量比足够高时(如 $n(CH_4):n(CaCO_3) = 8:1$)会导致碳沉积



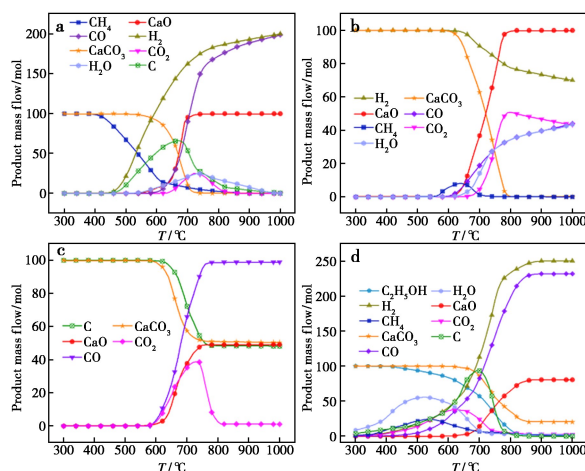
a. $700\text{ }^{\circ}\text{C}$; b. $750\text{ }^{\circ}\text{C}$; c. $800\text{ }^{\circ}\text{C}$; d. $850\text{ }^{\circ}\text{C}$

图 3 不同温度下还原剂与 $CaCO_3$ 的物质的量比对 $CaCO_3$ 转化率的影响

Fig.3 Effects of different mass ratios of reducing agent to $CaCO_3$ on the conversion of $CaCO_3$ at different temperatures

(反应 12), $CaCO_3$ 转化率略微降低(图 3a~3c)。然而,在 $700 \sim 750\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上,碳沉积逐渐减弱直至消失(反应 13),如图 3d 所示。 C_2H_5OH 参与的耦合反应也表现出类似现象。 C 作为还原剂时受到物质的量比的影响不明显,进一步印证图 2b 的结论。

图 4 为还原剂和 $CaCO_3$ 的耦合反应体系在 $300 \sim 1\,000\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内反应产物的构成。图 4a 为 CH_4 和 $CaCO_3$ 的反应产物。 CH_4 促进了 CO_2 原位转化为 H_2 和 CO , 同时实现 CaO 再生(反应 3)。与其他还原剂相比, CH_4 参与耦合反应的分解温度最低。初始的 H_2 产自 CH_4 的裂解反应(反应 12)^[31,39], 也会参与到耦合反应中。在相对较低的温度($450 \sim 700\text{ }^{\circ}\text{C}$)发生碳沉积, 导致反应速率迅速降低。在实际应用中, 应减轻或预防碳沉积的发生, 如在 CH_4 气氛中通入一定比例的 H_2 ^[24]。图 4b 为在 H_2 影响下耦合反应的产物组成。根据反应 5 和 9, CH_4 在约 $540\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生成, 该结果与 Lux 等^[40] 的研究一致。随着温度的升高, CH_4 产量逐渐减少, 剩余的 CH_4 与 CO_2 几乎完全反应(反应 10)。 $CaCO_3$ 的直接分解(反应 2)和另一个耦合反应(反应 4)占主导地位, 使 CO 和 CO_2 的产量增加。即使在 $CaCO_3$ 完全分解后, CO 和 H_2O 的含量仍然增加(反应 8), 直到 CO_2 或 H_2 被完全消耗。在实际应用中, 引入 Ni 和 Fe 等



a. CH_4 与 $CaCO_3$ 的反应产物; b. H_2 与 $CaCO_3$ 的反应产物;

c. C 与 $CaCO_3$ 的反应产物; d. C_2H_5OH 与 $CaCO_3$ 的反应产物

图 4 不同还原剂下反应温度对耦合反应产物的影响(标准大气压,还原剂与 $CaCO_3$ 的物质的量比为 $1:1$)

Fig.4 Effect of reaction temperature on the coupling reaction products under different reducing agents (at standard atmosphere with an agent-to- $CaCO_3$ mass ratio of $1:1$)

催化剂可以增强 CO_2 的转化^[32]。涉及 C 和 CaCO_3 的耦合反应产物相对纯净,如图 4c 所示。在 $600\sim 740\text{ }^\circ\text{C}$ 温度范围内, CaCO_3 的直接分解和耦合反应(反应 6)占主导地位, $750\text{ }^\circ\text{C}$ 后剩余的 C 与 CO_2 反应生成 CO(反应 13)。图 4d 描述了 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 参与耦合反应时的产物组成。由于低温($300\sim 550\text{ }^\circ\text{C}$) $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 的裂解,耦合反应的产物较为复杂。在整个 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 耦合反应过程中,初始产物如 H_2 、 CH_4 和 CO_2 不仅影响 CaCO_3 的分解(反应 3~5),彼此之间也发生部分反应(反应 8~12)。随着温度的升高,碳沉积减弱,这与之前的结果一致。在实际应用中,有必要稳定控制 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 的裂解和产物纯度。其中所需要的催化剂是未来的研究方向之一。此外,由于 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 的裂解导致 H_2 和 CO 的收率超过理论值,优化裂解和耦合反应的整合以增强 H_2 和 CO 的产量是未来探索的方向。

以上所述的数据和讨论表明, CaCO_3 的反应产物随不同的还原剂而异。整个反应网络可以总结如图 5 所示。这个反应网络不仅实现了反应物和产物的同时利用, 还实现了 CO_2 的原位转化, 同时降低了 CaO 再生所需的温度。实际应用中, 除了考虑耦合反应后产物组成、纯度等, 还需要综合原料成本、二次能量损耗等因素进行全面考虑。表 2 给出了各还原剂的成本和耦合反应中的反应耗能。由此可见, 从成本和反应耗能方面分析, C 为最优还原剂, 而 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 的反应能耗约为 C 的 3.4 倍, 成本约为 5.6 倍, 但 C 参与的耦合反应中 CaCO_3 的转化率较低, 且仅产生高纯度的 CO ; CH_4 在耦合反应中的耗能比 H_2 高出约 17%, 但成本低 50%。因此, 还原剂的选择需要根据最终需求进行综合考虑。此外, 表 2 中给出的反应耗能未考虑外部设备产生的额外能耗。由于工业上仍大量采用传统能源煅烧 CaCO_3 , 这将产生远高

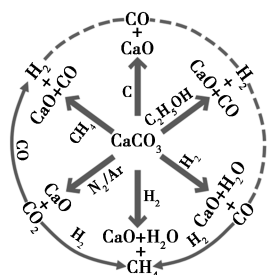


图5 不同还原剂与 CaCO_3 的反应网络

Fig.5 Reaction network of CaCO_3 under different reducing agents

表 2 不同还原剂耦合反应耗能及成本^注

Tab.2 Energy consumption and cost of coupling reaction of different reducing agents

还原剂名称	反应耗能/kW ¹⁾	成本/(元·t ⁻¹)
CH ₄	4 611. 19	1 750
H ₂	3 925. 20	3 500
C	2 686. 52	1 200
C ₂ H ₅ OH	9 205. 79	6 750

注:1)只考虑反应内的能耗,不考虑外部设备使用的能耗;不考虑压强等因素对反应的影响,使用表1中的焓值计算。

于耦合反应自身所需的能耗和热损失。展望工业脱碳的长期性,使用绿色电力和加工设备将是未来具有潜力的一个研究方向。

3 结论

本研究采用了 CH_4 、 H_2 、 C 和 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 这 4 种不同的还原剂与亚微米 CaCO_3 进行耦合反应,并进行了不同角度的分析,包括反应温度、不同物质的量比下 CaCO_3 转化率以及使用不同还原剂时产生的产物等因素,以降低 CaCO_3 分解温度的同时促进 CO_2 的原位转化。4 种还原剂在不同程度上对 CaCO_3 分解起正向作用, CH_4 降低分解温度最显著, H_2 次之,使用 C 耦合的副产物最少, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 作为还原剂时副反应较多,在实际应用中应根据需求进行调整。 CH_4 和 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 都会导致不良的碳沉积。总之,还原剂与 CaCO_3 之间的耦合反应不仅降低了分解温度,还促进了 CO_2 原位转化为高值产物,如 H_2 和 CO 。此外,对不同还原剂参与耦合反应中的耗能和经济成本进行了比较,为实现绿色循环利用和碳中和提供了参考。

参考文献:

- [1] GIARDINI A A, SALOTTI C A, LAKNER J F. Synthesis of graphite and hydrocarbons by reaction between calcite and hydrogen[J]. *Science*, 1968, **159**(3 812): 317-319.
- [2] HAY R, KASHWANI G, CELIK K. Carbonation, strength development, and characterization of calcined limestone as a potential construction material[J]. *Cement Concrete Res.*, 2021, **139**: 106 263.
- [3] PAPALAS T, ANTZARAS A N, LEMONIDOU A A. Evaluation of calcium-based sorbents derived from natural ores and industrial wastes for high-temperature CO₂ capture[J]. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2020, **59**(21): 9 926-9 938.
- [4] KAMKENG A D, WANG M, HU J, et al. Transformation

- technologies for CO₂ utilisation: Current status, challenges and future prospects [J]. *Chem. Eng. J.*, 2021, **409**: 128-138.
- [5] FATIMA S S, BORHAN A, AYOUB M, et al. Development and progress of functionalized silica-based adsorbents for CO₂ capture [J]. *J. Mol. Liq.*, 2021, **338**: 116-131.
- [6] ZENG W, MIWA T, MORIKAWA T. Prediction of vehicle CO₂ emission and its application to eco-routing navigation [J]. *Transport. Res. C-Emer.*, 2016, **68**: 194-214.
- [7] GARRIDO E, GONZALEZ C, ORCOS R. ISO 14001 and CO₂ emissions: An analysis of the contingent role of country features [J]. *Bus. Strateg. Environ.*, 2020, **29**(2): 698-710.
- [8] KRÖDEL M, LANDUYT A, ABDALA P M, et al. Mechanistic understanding of CaO-based sorbents for high-temperature CO₂ capture: Advanced characterization and prospects [J]. *ChemSusChem*, 2020, **13**(23): 6 259-6 272.
- [9] LEONARD M D, MICHAELIDES E E, MICHAELIDES D N. Energy storage needs for the substitution of fossil fuel power plants with renewables [J]. *Renew. Energy*, 2020, **145**: 951-962.
- [10] WIINIKKA H, VIKSTRÖM T, WENNEBRO J, et al. Pulverized sponge iron, a zero-carbon and clean substitute for fossil coal in energy applications [J]. *Energy. Fuel*, 2018, **32**(9): 9 982-9 989.
- [11] KONG H, SUN Y, LI Z, et al. The development path of direct coal liquefaction system under carbon neutrality target: Coupling green hydrogen or CCUS technology [J]. *Appl. Energy*, 2023, **347**: 121-151.
- [12] KONG Y K, RUAN S, KURUMISAWA K. Recycling of calcined carbonated cement pastes as cementitious materials: Proposed CCUS technology for calcium looping [J]. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2022, **10**(5): 108-124.
- [13] DING H, ZHANG Y, DONG Y, et al. High-pressure supersonic carbon dioxide (CO₂) separation benefiting carbon capture, utilisation and storage (CCUS) technology [J]. *Appl. Energy*, 2023, **339**: 120-135.
- [14] ZHANG Y, WANG Y, QIAN Q, et al. Synthesis of carboxylic acids via the hydrocarboxylation of alcohols with CO₂ and H₂ [J]. *Green Chem.*, 2022, **24**(5): 1 973-1 977.
- [15] SONG R, LI Z, GUO J, et al. Solar hydrocarbons: Single-step, atmospheric-pressure synthesis of C₂ ~ C₄ alkanes and alkenes from CO₂ [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023, **135**: e202 304 470.
- [16] 乔华建, 李天治, 安赛, 等. 银修饰铜纳米阵列用于电催化还原 CO₂ [J]. *化学试剂*, 2023, **45**(4): 113-119.
- [17] DOU B, WU K, ZHANG H, et al. Sorption-enhanced chemical looping steam reforming of glycerol with CO₂ in-situ capture and utilization [J]. *Chem. Eng. J.*, 2023, **452**: 139-150.
- [18] LAWSON S, BAAMARAN K, NEWPORT K, et al. Adsorption-enhanced bifunctional catalysts for in situ CO₂ capture and utilization in propylene production: A proof-of-concept study [J]. *ACS Catal.*, 2022, **12**(22): 14 264-14 279.
- [19] CHAKRABORTY S, RAMESH K, JAYATO N, et al. Green synthesis of MeOH derivatives through in situ catalytic transformations of captured CO₂ in a membrane integrated photo-microreactor system: A state-of-art review for carbon capture and utilization [J]. *Renew. Sust. Energy. Rev.*, 2023, **182**: 113-147.
- [20] REICHERT J, MAERTEN S, MELTZER K, et al. Shifting the equilibrium of methanol synthesis from CO₂ by in situ absorption using ionic liquid media [J]. *Sustain. Energy Fuels*, 2019, **3**(12): 3 399-3 405.
- [21] RAY S, BHATTACHARYA T K, SINGH V K, et al. Non-isothermal decomposition kinetics of nano-scale CaCO₃ as a function of particle size variation [J]. *Ceram. Int.*, 2021, **47**(1): 858-864.
- [22] YANG J, HAN Y, LUO J, et al. Synthesis and characterization of amorphous magnesium carbonate nanoparticles [J]. *Mater. Chem. Phys.*, 2019, **224**: 301-307.
- [23] ABEYWARDENA M R, ELKADUWE R, KARUNARATHNE D, et al. Surfactant assisted synthesis of precipitated calcium carbonate nanoparticles using dolomite: Effect of pH on morphology and particle size [J]. *Adv. Powder Technol.*, 2020, **31**(1): 269-278.
- [24] JIANG P, LI L, ZHAO G, et al. Reductive calcination of calcium carbonate in hydrogen and methane: A thermodynamic analysis on different reaction routes and evaluation of carbon dioxide mitigation potential [J]. *Chem. Eng. Sci.*, 2023, **276**: 118-133.
- [25] 尹倩, 宋慧婷, 徐明, 等. 碳酸盐炼制共热耦合甲烷重整制高附加值化学品发展展望 [J]. *物理化学学报*, 2023, **39**(3): 7-15.
- [26] ATILHAN S, PARK S, EI-HALWAGI M M, et al. Green hydrogen as an alternative fuel for the shipping industry [J]. *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 2021, **31**: 100-110.
- [27] KARAYEL G K, JAVANI N, DINCER I. A comprehensive assessment of energy storage options for green hydrogen [J]. *Energy Convers.*, 2023, **291**: 117-131.
- [28] AFZAL S, SENGUPTA D, SARKAR A, et al. Optimiza-

- tion approach to the reduction of CO₂ emissions for syngas production involving dry reforming[J]. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2018, **6**(6): 7 532-7 544.
- [29] SUN S, ZHANG Y, LI C, et al. Upgrading CO₂ from simulated power plant flue gas via integrated CO₂ capture and dry reforming of methane using Ni-CaO[J]. *Sep. Purif.*, 2023, **308**: 122 956.
- [30] ORTIZ A L, SÁMANO R P, ZARAGOZA M M, et al. Thermodynamic analysis and process simulation for the H₂ production by dry reforming of ethanol with CaCO₃ [J]. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 2015, **40**(48): 17 172-17 179.
- [31] ZHU W, FENG B Q, ZHANG S, et al. Selective methanation of carbonate@ carbon composite formed by the reaction of carbon dioxide with alkali metals[J]. *Int. J. Energ. Res.*, 2021, **45**(2): 3 385-3 396.
- [32] BELETE T T, SANDEN M C M, GLEESON M A. Effects of transition metal dopants on the calcination of CaCO₃ under Ar, H₂O and H₂ [J]. *J. CO₂ Util.*, 2019, **31**: 152-166.
- [33] ZHANG J, HU S, DING Y, et al. Nickel based catalyst supported by carbon aerogel prepared from waste pomelo peel to crack ethanol for hydrogen production: Catalytic performance and mechanism [J]. *Fuel*, 2023, **346**: 128 278.
- [34] LI C, ZHANG C, GUO X. Sintering mechanism of CaO during carbonation reaction in the presence of water vapor[J]. *P. Combust. Inst.*, 2023, **39**(4): 4 467-4 476.
- [35] BAI R, LI N, LIU Q S, et al. Effect of steam on carbonation of CaO in Ca-looping[J]. *Molecules*, 2023, **28**(13): 4 910.
- [36] RELLER A, PADESTES C, HUG P. Formation of organic carbon compounds from metal carbonates [J]. *Nature*, 1987, **329**(6 139): 527-529.
- [37] SHI S, YU J, PAN Y, et al. Hydrogenation of calcium carbonate to carbon monoxide and methane [J]. *Fuel*, 2023, **354**: 129 385.
- [38] REN Y, MA Y Y, MO W L, et al. Research progress of carbon deposition on Ni-based catalyst for CO₂-CH₄ reforming[J]. *Catalysts*, 2023, **13**(4): 647.
- [39] RAY K, SENGUPTA S, DEO G. Reforming and cracking of CH₄ over Al₂O₃ supported Ni, Ni-Fe and Ni-Co catalysts[J]. *Fuel Process. Technol.*, 2017, **156**: 195-203.
- [40] LUX S, BALDAUF-SOMMERBAUER G, SIEBENHOFER M. Hydrogenation of inorganic metal carbonates; A review on its potential for carbon dioxide utilization and emission reduction [J]. *ChemSusChem*, 2018, **11**(19): 3 357-3 375.

氮掺杂的绿色碳点开关型荧光传感器灵敏检测组氨酸

蔡留莹^a, 康鹏^a, 董微^{*b}

(沈阳医学院 a.公共卫生学院; b.化学教研室, 辽宁 沈阳 110034)

摘要:以柠檬酸为碳源, 尿素提供氮源, N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 为溶剂, 采用水热法一步合成水溶性好的氮掺杂绿色荧光碳点 (N-CDs)。为增强 N-CDs 的荧光强度, 选用 1,6-己二胺作为表面修饰剂, 制备的 N-CDs 荧光量子产率达 16.8%。该 N-CDs 形貌近似球形, 平均粒径约为 30 nm。同时本实验基于荧光猝灭法构建 N-CDs/Bio“开-关”型荧光传感器, 利用传感器荧光强度的变化灵敏检测组氨酸 (His)。传感器荧光强度变化 (ΔF) 与 His 浓度在 1.73~25.85 mmol/L 范围内呈现良好线性关系, 线性方程为 $\Delta F = 6.133 \times [\text{His}] + 4.531$, 相关系数 $R^2 = 0.9984$, 检测限为 0.3669 mmol/L。进一步检测实际人血清样本中的 His, 回收率为 96.3%~100.1%。传感器检测方法简便、灵敏度高, 是优异的 His 荧光检测传感器。

关键词:绿色荧光碳点; 组氨酸; 水热法; 开关; 荧光传感器

中图分类号: O657 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)06-0046-07

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0820

Detection of Histidine by Switch Sensitive Sensor Based on N-Doped Green Fluorescent CDs CAI Liu-ying^a, KANG Peng^a, DONG Wei^{*b} (a. School of Public Health, b. Chemistry Teaching and Research Office, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

Abstract: We used citric acid as the carbon source, urea as the nitrogen source, and N,N-dimethylformamide (DMF) as the solvent to successfully prepare a green fluorescent CDs by the hydrothermal method. Simultaneously, 1,6-hexanediamine was used as a modifier to significantly enhance the photoluminescence intensity of N-CDs and the fluorescence quantum yield can reach 16.8%. The N-CDs is approximate spherical morphology, and the average particles size of about 30 nm. At the same time, a N-CDs/Bio fluorescence sensor like “Switch” was constructed based on the fluorescence quenching method. The change in fluorescence intensity of sensor was used to detect histidine (His). The sensor has a good linear relationship in the range of 1.73~25.85 mmol/L. The linear equation $\Delta F = 6.133 \times [\text{His}] + 4.531$, the correlation coefficient $R^2 = 0.9984$, and the detection limit was 0.3669 mmol/L. Further detection of His in serum, the recovery rate was 96.3%~100.1%, the detection of sensor was simple and sensitive. This is an excellent His detection fluorescent probe.

Key words: green fluorescent CDs; histidine; hydrothermal method; switch; fluorescence sensor

作为一种新型的碳基荧光零维纳米材料, 碳点 (Carbon dots, CDs) 以其优异的稳定性、易于表面功能化、荧光量子效率高、低毒性、良好的生物相容性^[1]而被广泛应用于光学传感^[2]、生物成像^[3,4]、医学诊断等诸多领域^[5], 尤其是基于 CDs 的荧光纳米传感器系统已被用于检测金属离子^[6,7]、阴离子^[8]和生物分子^[9,10]。

近年来, CDs 合成有了许多新的进展。通过掺杂不同种类的聚合物、无机物、有机物或生物质对碳量子点表面修饰, 可以实现表面钝化和化学改性^[11]。研究发现在反应中掺杂 N 元素可以提高量子产率。贾晶等^[12]在制备 CDs 时, 以对苯二胺作为氮源, 提高量子产率。另外, 加入改性剂修饰 CDs 基团不仅可以增加 CDs 的稳定性, 而且可以提高量子产率^[13,14]。修饰后的碳点材料因为表面独特的基团和性质, 可以与目标分析物之间发生不同的传感机理, 导致荧光强度的变化, 以实

现对目标物的定性或定量检测。通过不同的荧光传感机制, 近年来学者基于碳点构建了“开-关”型荧光传感器。Ning 等^[15]以 4,5-二氟-1,2-苯乙二胺和柠檬酸为原料, 采用一步水热法制备了红色碳点 (R-CDs), 以 550 nm 波长激发, 该碳点在发射波长 619 nm 处的荧光被 Cu^{2+} 静态猝灭, 随后被谷胱甘肽恢复, 由于氟 (F) 和氮 (N) 元素的掺杂, 使得 R-CDs 具有优异的光学和荧光开关特性, 从而建立了同步检测 Cu^{2+} 和谷胱甘肽的荧光“开-

收稿日期: 2023-12-19; 网络首发日期: 2024-03-22

作者简介: 蔡留莹 (1997-), 女, 江苏镇江人, 硕士, 初级护师, 主要研究方向为荧光碳纳米材料的开发及环境污染物应用。

通讯作者: 董微, E-mail: dongwei5873@126.com。

引用本文: 蔡留莹, 康鹏, 董微. 氮掺杂的绿色碳点开关型荧光传感器灵敏检测组氨酸 [J]. 化学试剂, 2024, 46(6): 46-52。

关”法。Ahmed 等^[16]以柠檬酸和蛋氨酸为前体,通过一步水热法合成了氮(N)、硫(S)共掺杂的碳点(N,S-CDs),该碳点对汞离子(Hg^{2+})具有高效的选择性识别,此外,在最低检测限(LOD)为 6.4 nmol/L 条件下添加鸟嘌呤,以可逆的方式恢复 N,S-CDs 的荧光,因此基于 N,S-CDs 构建了可以同时检测 Hg^{2+} 和鸟嘌呤的荧光“开-关”法。

为了提高“开-关”型碳点传感器在生物体内的应用,我们发现生物素(Bio)可以有效的猝灭所制备的 N-CDs 荧光。生物素是一种维持人体自然生长和正常人体机能所必须的维生素,但无法通过自身代谢合成,外源性的生物素补充主要来源于花椰菜、蛋黄、肝脏和生物素类保健品等^[17]。因此选择 Bio 作为 N-CDs 的荧光猝灭剂构建 N-CDs/Bio 传感器,而加入组氨酸又可以使 N-CDs 的荧光恢复。组氨酸(His)作为一种神经递质或神经调节剂,在哺乳动物中枢神经系统中发挥重要作用^[18],并且在组织生长和修复中发挥关键作用,还参与组胺的生物合成^[19]。组氨酸浓度异常与许多人类疾病有关,如帕金森病^[20]、癫痫和中毒^[21]。因此,快速有效地检测 His 在临床医学中具有重要意义。近年来,研究者通过比色法^[22]、荧光光谱法^[23,24],以及荧光传感器的构建检测 His^[25]。然而,这些方法构建的大多数 His 传感器存在选择性低、生物毒性高,或价格昂贵、耗时长,需要使用复杂的仪器,因此难以满足生物医学检测的要求。

本文采用水热法,以柠檬酸为碳源,尿素作为掺杂氮源, N, N-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂, 1,6-己二胺为修饰剂,制备的绿色荧光 N-CDs 量子产率可达 16.8%。并且制备工艺简单,原料分布广泛,价格低廉。该 N-CDs 水溶性好、荧光稳定性高、毒性低,在 365 nm 紫外灯照射下可发出强绿色荧光,可用作细胞标记探针。由 N-CDs 为基础构建的 N-CDs/Bio 可以作为 His 定量检测的荧光传感器。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

JEM-2100 型透射电子显微镜(日本电子公司);Nicolet Avatar330 型傅里叶变换红外光谱仪(美国热电公司);Cary 5000 型紫外-可见分光光度计、Cary Eclipse300 型荧光光谱仪(美国 Varian 公司)。

柠檬酸(CA)、尿素、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、1,6-己二胺(1,6-Hexanediamine)、生物素(Bio)、组氨酸(His)(国药集团化学试剂有限公司);所用试剂均为分析纯;实验用水均为高纯水。

1.2 N-CDs 合成

准确称取 540 mg 柠檬酸和 400 mg 尿素溶于 25 mL DMF 中,混合均匀后,移至聚四氟乙烯反应釜内衬,在干燥箱中以 180 °C 加热 3 h,冷却后取出,再加入 840 mg 1,6-己二胺,以 180 °C 加热 12 h。冷却至室温,过滤、离心除去不溶性物质和大分子杂质,经透析纯化后冻干得到 N-CDs 固体粉末,后续实验将固体粉末再次分散到去离子水中制得碳点标准液。

1.3 CDs 细胞标记

将细胞密度为 40%~50%的小鼠白血病巨噬细胞 RAW264.7 接种于含 DMEM 高糖培养基和 10%胎牛血清的 12 孔板中(每孔约含 1 mL 细胞悬液和 2.5×10^4 个细胞),在 37 °C、5% CO_2 条件下孵育 24 h,用磷酸盐缓冲液(PBS 10 mmol/L, pH 7.5)冲洗细胞两次。向 12 孔板中加入适当浓度的 CDs 溶液,孵育 2~3 h,经 PBS 缓冲液冲洗后,用细条滤纸浸渍干燥孔。最后,用荧光倒置显微镜观察并采集图像。

1.4 N-CDs/Bio 传感器制备并检测 His

室温下,取 N-CDs 固体加水溶解至浓度为 11.2 mg/L,制得碳点标准液。将 5 mL N-CDs 溶液和 5 mL(0.125 mol/mL)Bio 溶液混合,以 37 °C 恒温搅拌 10 min。取 2.5 mL 上述混合溶液和 1 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)混匀并测定荧光光谱,即制得 N-CDs/Bio 荧光传感器。向传感器加入设定浓度为 2.37 mmol/L 的 His 溶液,反应数分钟后测定反应溶液的荧光光谱。

1.5 采集和分析人血清样品

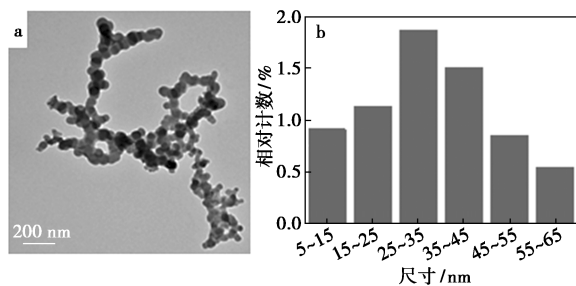
血液样品取自医院。检测前,将血液样品以 4 000 r/min 离心 5 min。取 0.5 mL 上层血清稀释 10 倍备用。测定 N-CDs/Bio 传感器的荧光光谱,然后加入到已处理的血清样品中混匀,再将不同浓度的 His 标准液加入到上述混合溶液中反应,记录反应后溶液的荧光光谱。

2 结果与讨论

2.1 N-CDs 的材料表征及光学表征

图 1a 和 1b 是 N-CDs 的 TEM 图和粒径分布状况,可见制备的 N-CDs 外观为单分散球形且分

布均匀,平均粒径约为 30 nm。



a. TEM 图; b. 粒径分布图

图 1 N-CDs 的 TEM 图和粒径分布图

Fig.1 TEM image and particle size distribution of N-CDs

图 2 是 N-CDs 的 FT-IR 光谱图。由图可知,在 3 279 和 3 440 cm^{-1} 处较宽的吸收峰归属于 N—H 的伸缩振动峰,以 2 934 cm^{-1} 为中心的吸收峰归属于 C—H 的伸缩振动峰,1 664 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 C=O 的伸缩振动峰,1 387 cm^{-1} 处对应的吸收峰应归属于 C—H 的伸缩振动峰,1 241 cm^{-1} 处较小的吸收峰应归属于 C—N 的伸缩振动峰,1 166 cm^{-1} 处小的吸收峰应归属于 C=O 的伸缩振动峰。

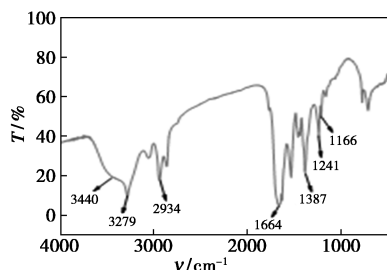
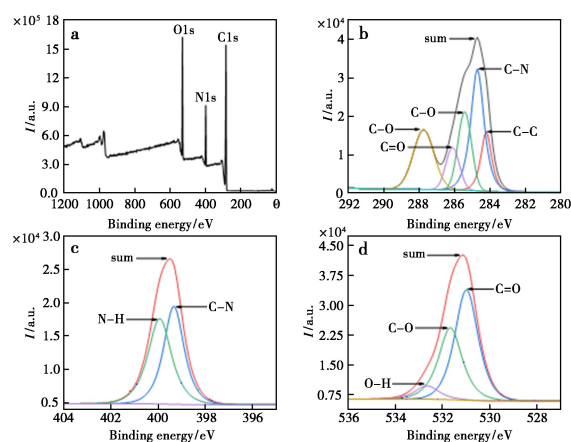


图 2 N-CDs 的 FT-IR 光谱图

Fig.2 FT-IR spectrum of N-CDs

对制备的 N-CDs 进行 XPS 能谱分析。如图 3a 总谱所示,所制备 N-CDs 含有 C、N、O 元素。N 1s 峰说明氮元素已成功掺杂在 N-CDs 上;如图 3b 所示, C 1s 在 284.2、284.7、285.4、286.1 和 287.7 eV 处有明显的吸收峰,分别对应于 C—C、C—N、C—O、C=O 和 C—O 键;如图 3c 所示, N 1s 在 399.3 和 399.9 eV 处有显著的吸收峰,分别对应于 C—N 和 N—H 键;如图 3d 所示, O 1s 在 531.0、531.6 和 532.7 eV 处有明显的吸收峰,表示氧元素的 3 种不同组成,分别对应于 C=O、C—O 和 O—H 键,分析结果与红外分析结果一致,碳点表面具有丰富的氨基和羧基等基团,有良好的水溶性,与预期材料结构相符。

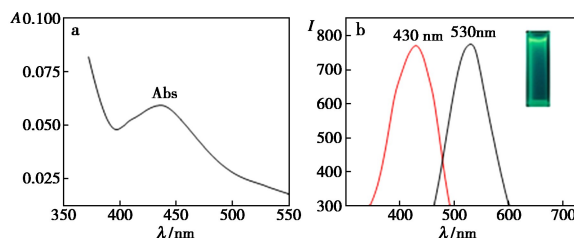


a. XPS 全谱图; b. C 1s 谱图; c. N 1s 谱图; d. O 1s 谱图

图 3 N-CDs 的 XPS 谱图

Fig.3 XPS spectrum of N-CDs

考察了 N-CDs 的紫外吸收及荧光光谱。从图 4a 中可以看出, N-CDs 溶液 (11.2 mg/L) 在 438 nm 处具有明显的特征吸收峰。图 4b 荧光光谱表征显示 N-CDs 最佳激发波长为 430 nm, 对应发射波长为 530 nm, 在紫外光照射下呈现出强绿色荧光。100 nm 斯托克斯位移有助于区分目标和背景信号。以罗丹明 B 作为参照, 测定 N-CDs 荧光量子产率为 16.8%, 说明制备的 N-CDs 具有良好的光致发光性能。



a. 紫外-可见吸收光谱; b. 荧光光谱图及紫外光下的图像

图 4 N-CDs 的光谱图及紫外光下的图像

Fig.4 Spectrum of N-CDs and photo under UV light

图 5 是不同激发波长下 N-CDs 溶液 (11.2 mg/L) 的荧光发射谱图。随着激发波长从 410 nm

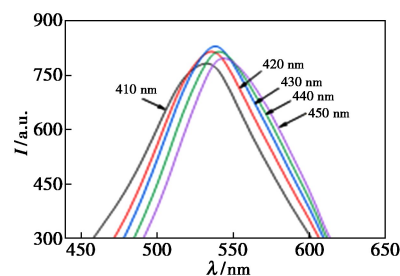


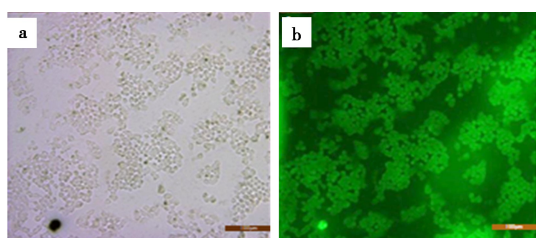
图 5 不同激发波长下 N-CDs 的荧光发射谱图

Fig.5 Fluorescence emission spectrum of N-CDs at different excitation wavelengths

增加到 450 nm, N-CDs 的最大荧光发射峰位置有轻微的红移。可以观察到发射峰的最大位移为 20 nm, 这说明制备的 N-CDs 对激发波长有一定的依赖性。

2.2 N-CDs 细胞标记

用 N-CDs 溶液 (11.2 mg/L) 标记鼠白血病巨噬细胞。图 6a 是光照时在荧光显微镜下采集的图片, 图 6b 是在黑暗时采集的图片。图中可以看到单个细胞形态和细胞内部的明亮绿色荧光。由此, N-CDs 是一种非常好的细胞荧光标记探针和显影剂, 可以广泛运用于生物医学和光学成像领域。



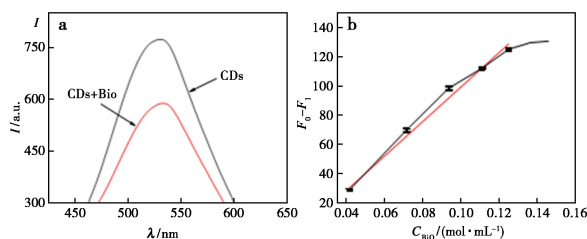
a. 光照时的细胞图片; b. 黑暗时的细胞图片

图 6 N-CDs 标记鼠白血病巨噬细胞的荧光显微镜下图片

Fig.6 Fluorescence microscopy photos of Murine leukemia macrophages cells labeled with N-CDs

2.3 N-CDs 荧光猝灭

His 检测传感器 (N-CDs/Bio) 构建如 1.4 所述。如图 7a 所示, 在 5 mL (11.2 mg/L) N-CDs 溶液中加入 5 mL (0.25 mol/mL) Bio 后, N-CDs 的荧光强度大幅下降。为了探究 Bio 对 N-CDs 荧光猝灭的能力, 在 5 mL (11.2 mg/L) N-CDs 溶液中分别加入 5 mL 不同浓度的 Bio 溶液, 取 2.5 mL 混合液加入 1 mL Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 定容, 进行荧光光谱扫描。如图 7b 所示, N-CDs 荧光强度差值 $F_0 - F_1$ 与 Bio 浓度在 0.041 7~0.125 mol/mL 范围内呈现良好的线性关系 ($R^2 = 0.9924$), 其中



a. 荧光光谱; b. 线性关系图

图 7 N-CDs 与 Bio 作用的荧光光谱及线性关系图

Fig.7 Fluorescence spectrum and linear relationship of N-CDs interaction with Bio

F_0 和 F_1 分别为加入 Bio 前后的荧光强度。而且当溶液中的 Bio 浓度达到 0.125 mol/mL 时, 荧光猝灭程度达到最佳。因此, 在进一步的 N-CDs/Bio 传感器实验中, N-CDs 设定为 5 mL (11.2 mg/L), Bio 设定为 5 mL (0.125 mol/mL)。

2.4 荧光“开-关”的机制

对荧光强度变化的机制进行分析。图 8a 是在 5 mL (11.2 mg/L) N-CDs 溶液中加入 0.125 mol/mL Bio 和 2.37 mmol/L His 后的荧光光谱。如图 8a 所示, 单独加入 His 时 N-CDs 的荧光强度未出现显著变化, 这意味着单纯 His 与 N-CDs 不会产生荧光响应。但是, 在 N-CDs 溶液中加入 Bio 后, N-CDs 在发射峰 530 nm 处对应的荧光强度显著降低, 推测荧光猝灭现象是由于在 Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲溶液中, Bio 和 N-CDs 在静电作用下产生非荧光化合物, 导致静态荧光猝灭。用 Stern-Volmer 方程来分析 N-CDs/Bio 的荧光猝灭机制。

$$F_0/F_1 = 1 + K_{sv} [Q]$$

式中, F_0 和 F_1 分别为未加和已加 Bio 时溶液的荧光强度; $[Q]$ 表示 Bio 的浓度; K_{sv} 为猝灭常数。

图 8b 为考察不同温度条件下, 不同浓度的 Bio 对 11.2 mg/L N-CDs 的荧光猝灭效果。根据 Stern-Volmer 方程, 在不同温度下, F_0/F_1 与 Bio 浓度呈线性关系, 且在 30 °C 时拟合直线的斜率 < 20 °C, 即猝灭常数 K_{sv} 随温度的升高而减小, 因此该荧光猝灭机制是静态猝灭。当 Bio 存在时, N-CDs 的荧光功能处于“关闭”状态。

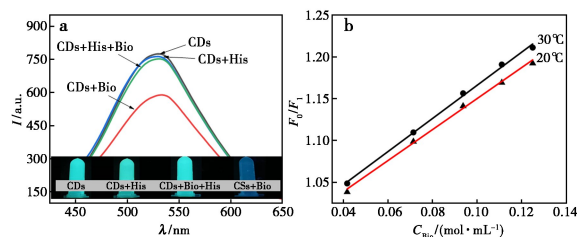


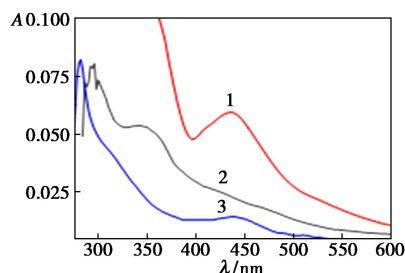
图 8 a. Bio 和 His 对 N-CDs 荧光强度的影响;

b. 不同温度下 Bio 浓度与 F_0/F_1 的关系

Fig.8 a. Effects of Bio and His on N-CDs fluorescence intensity; b. Relationship between concentration of Bio and F_0/F_1 under different temperature

加入 2.37 mmol/L His 后, N-CDs/Bio 传感器的荧光强度又恢复。由图 9 可知, 向 N-CDs + Bio 体系中加入 His 后, N-CDs + Bio + His 的紫外吸收发生了明显的改变。推测是由于 Bio 侧链上带负电的羧基与 His 侧链供质子的咪唑基相互作用

用^[26], Bio 和 His 之间结合力更强, 破坏静电作用使得 Bio 脱离 N-CDs 表面, 因此荧光强度又增强。His“开启”N-CDs/Bio 传感器的荧光功能。



1. N-CDs; 2. N-CDs+Bio; 3. N-CDs+Bio+His

图 9 紫外吸收光谱

Fig.9 UV-Vis absorption spectra

2.5 实验条件优化

实验过程中 His 检测传感器的 pH 值大小与荧光信号变化有密切联系, 因此考察传感器溶液 pH 值对光致发光 (PL) 强度 ($F_0 - F_1$) 的影响。为了使传感器的荧光变化达到最佳, 将 His 和 Bio 的浓度分别设定为 2.37 和 0.125 mol/mL。

图 10a 是传感器溶液 pH 值在 5.5~8.5 范围内对 PL 强度的影响。由图可知, 溶液荧光强度随着 pH 值增大而增强, 在 pH 7.5 左右达到最大值, 然后又下降。还考察了缓冲溶液种类对 PL 强度的影响。选择 3 种缓冲溶液 (磷酸盐、BR 和 Tris-HCl) 来调节传感器溶液的 pH 值。结果表明在 Tris-HCl 缓冲溶液中, 实验效果最佳。因此, 选择 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 进行实验。

孵化时间也是影响 N-CDs/Bio 传感器检测 His 的重要参数, 因此在室温下研究了孵化时间对传感器荧光强度的影响。如图 10b 所示, 加入 2.37 mmol/L His 孵化至 1 min 后, N-CDs/Bio 荧光强度差值 $F_0 - F_1$ 达到稳定。因此为了保证传感器的稳定性, 后续实验加入 His 孵化 1 min 后

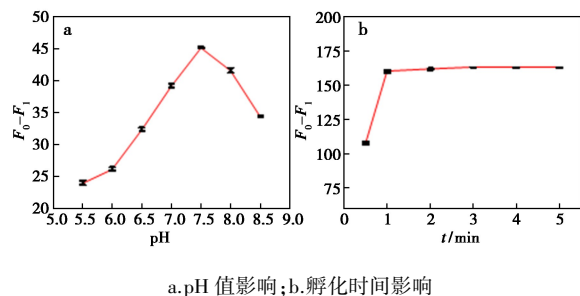


图 10 不同实验条件对 His 与 N-CDs/Bio 传感器作用的荧光强度影响

Fig.10 Effect of different conditions on fluorescence intensity of His interaction with the N-CDs/Bio sensor

测定荧光强度。

2.6 His 检测传感器的性能分析

研究了不同浓度 His 溶液对 N-CDs/Bio 传感器的荧光响应。首先配制浓度范围为 1.73 ~ 25.85 mmol/L 的 His 溶液。然后在最佳实验条件下, 分别加入到 N-CDs/Bio 传感器溶液中并进行荧光光谱分析。如图 11 所示, 随着 His 浓度的增大, N-CDs/Bio 传感器在 530 nm 处的荧光逐渐增强。His 浓度为 1.73 ~ 25.85 mmol/L 范围内, N-CDs/Bio 传感器荧光强度变化 ($\Delta F = F_0 - F_1$) 与 His 浓度呈良好的线性关系, 线性拟合方程: $\Delta F = 6.133 \times [\text{His}] + 4.531$, 相关系数 $R^2 = 0.9984$ 。按公式 $\text{LOD} = 3\sigma/S$ (σ 为 11 次空白样检测值的标准偏差, S 为标准曲线的斜率) 计算, 检测限为 0.366 9 mmol/L, 由此证明 N-CDs/Bio 传感器的检测限低且对 His 具有较强的识别灵敏性。

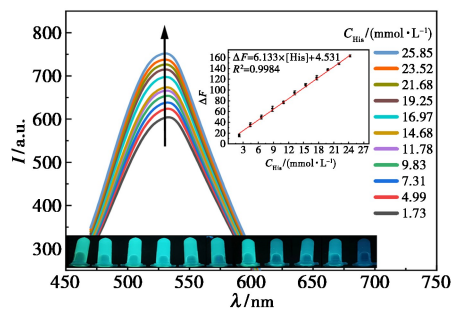


图 11 N-CDs/Bio 传感器与不同浓度 His 作用的荧光光谱及线性关系图

Fig.11 Fluorescence spectrum and linear relationship of N-CDs/Bio sensor interaction with different concentrations of His

2.7 精密度

在最佳实验条件下, 平行测试了 5 组 His 标准溶液 (标准溶液浓度为 10 mmol/L) 与传感器进行反应, His 标准液平均浓度为 10.7 mmol/L。测得相对标准偏差 (RSD) 为 4.2%, 说明该传感器对 His 检测具有良好的重现性。

2.8 共存物质的干扰

为了研究血液中可能存在的其他物质 (如蛋白质、无机离子等) 对 His 检测的干扰, 在最佳实验条件下, 向传感器中加入适量干扰物质, 观察荧光强度变化。其中, 加入钾离子和钠离子的浓度为 1 g/L, 谷氨酸、精氨酸、酪氨酸、葡萄糖、缬氨酸和组氨酸的浓度均为 10 mmol/L。如图 12 所示, 钾离子和缬氨酸可以使 N-CDs/Bio 传感器的荧光强度略有升高, 而 His 可以使传感器的荧光显著

增强,其他干扰物质的影响均可忽略不计,可以说该传感器对于 His 具有良好的选择性响应。

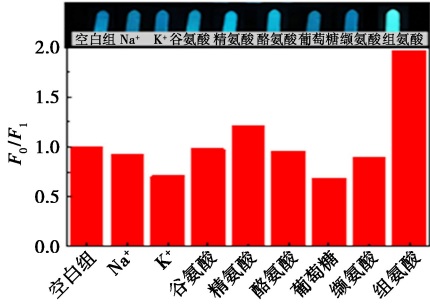


图 12 干扰物质对 N-CDs/Bio 传感器的
荧光强度影响

Fig.12 Fluorescence responses of interferential
substance to N-CDs/Bio sensor

2.9 N-CDs/Bio 传感器应用于人血清中 His 检测

经过实验,所制备的 N-CDs/Bio 传感器对 His 具有较为灵敏的荧光响应,因此将其应用于人血清样品检测。首先将采集的血样转移至微量离心管中,以 4 000 r/min 离心 5 min。取 0.5 mL 上层血清,稀释 10 倍备用。在最佳实验条件下,向石英比色皿中加入 3.5 mL (pH 7.5) 的传感器溶液,以 430 nm 波长激发,记录发射波长 530 nm 处的荧光强度并记为 F_0 ,再用微量注射器向溶液中加入 20 μL 血清样品并测定荧光强度。然后在含血清的混合溶液分别加入 35、55、75 μL His 标准溶液,再次测定混合溶液的荧光强度 (F)。采用加标实验对 His 含量检测,5 次平行测定的结果见表 1。由此可以看出,His 检测的浓度和加入的浓度较为一致,回收率在 96.3%~100.1% 之间,相对标准偏差小于 4.6%。因此,本研究构建的 N-CDs/Bio 传感器可以应用于人血清样品中 His 含量的有效检测,具有较高的灵敏度、特异性和极大的实际应用价值。

表 1 人血清样品中 His 的加标回收测定

Tab.1 Recoveries determination of spiked His in
human serum samples

样本	序号	加入量/ (mmol·L ⁻¹)	测得量/ (mmol·L ⁻¹)	回收率/ %	RSD/ %
血清	1	0	0.005 0	—	—
	2	0.023 7	0.029 6	96.3	4.6
	3	0.037 2	0.041 8	100.1	3.4
	4	0.050 8	0.056 3	99.0	2.8

3 结论

以柠檬酸、尿素作为原料,DMF 为溶剂,1,6-

己二胺为修饰剂,使用溶剂热法合成了具备绿色荧光的长波长碳点。制备的 N-CDs 荧光量子产率高、水溶性和生物相容性好、特异性高。用 N-CDs 标记小鼠巨噬细胞,在显微镜下呈现清晰的绿色荧光细胞成像。此外,基于 N-CDs 的荧光“开关”功能,构建 His 检测的 N-CDs/Bio 传感器。并且在实际血清样品中可以灵敏、准确检测 His。因此该 N-CDs 的开发对生物医学成像和 His 检测传感器构建和应用都具有深远的实际意义。

参考文献:

[1] 陈阳,丁丽丽,刘辉.聚乙烯亚胺碳化聚合物点的制备及其对 H_2O_2 的检测[J].化学试剂,2023,45(11):51-55.

[2] 李娜.基于 DNA 和荧光碳点的光学传感器在分子识别中的应用研究[D].重庆:西南大学,2018.

[3] 李波.高性能氮掺杂碳点的制备、性质及应用研究[D].兰州:兰州大学,2017.

[4] JIANG J,LI S H,YAN Y N,et al.Preparation of nitrogen-doped high quantum yield fluorescent CDs and their biological imaging in vitro[J].J. Lumin., 2017, 38(12): 1 567-1 574.

[5] 闫鹏,艾凡荣,严喜鸾,等.碳量子点的生物应用:成像、载药与毒性[J].材料导报,2017,31(19):35-42.

[6] 杨倩.基于离子液体的氮掺杂碳点的制备及其在 Hg^{2+} 检测中的应用[D].新乡:河南师范大学,2017.

[7] 袁云欢.锗、氮原子掺杂碳点的可控合成及其在生化分析中的研究[D].重庆:西南大学,2016.

[8] 钱玉婷.离子液体功能化荧光碳纳米材料的一步电化学法制备及阴离子检测研究[D].杭州:浙江理工大学,2017.

[9] 郑安琪,陈明丽,舒杨,等.氮掺杂碳点对 pH、血红蛋白的传感[A]//中国化学会.第 21 届全国色谱学术报告会及仪器展览会会议论文集[C].2017:552.

[10] 千佳丽.碳点基荧光纳米探针的构建及其在细胞成像和酶活性评价中的应用[D].兰州:兰州大学,2017.

[11] 张霖,李宏达.碳量子点的合成及在爆炸物检测中的应用[J].化学试剂,2023,45(8):94-103.

[12] 贾晶,路雯婧,李林,等.橘色荧光碳点用于检测亚硝酸盐[J].分析化学,2019,47(4):560-566.

[13] 车望远.基于高荧光碳点的免疫荧光探针的构建及其在微生物检测中的应用研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2016.

- [14] 洪碧云, 唐丽荣, 陈伟香, 等. 碱木质素/聚乙烯亚胺碳点的制备及其对 pH 敏感性[J]. 化工进展, 2019, **38**(4): 1 970-1 977.
- [15] NING G, LI B, LIU J, et al. Red-emission carbon dots as fluorescent “on-off-on” probe for highly sensitive and selective detection of Cu^{2+} and glutathione[J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2022, **414**(6): 2 219-2 233.
- [16] AHMED F, IQBAL S, ZHAO L, et al. “ON-OFF-ON” fluorescence switches based on N, S-doped carbon dots; Facile hydrothermal growth, selective detection of Hg^{2+} , and as a reversible probe for guanine[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2021, **1** 183: 338 977.
- [17] 郭法利, 施杨. 食品中生物素测定方法的研究进展[J]. 食品工业, 2019, **40**(3): 219-222.
- [18] 胡薇薇, 陈忠, 徐莉莎, 等. 内氨酰组氨酸对脑内组胺含量以及癫痫行为的影响[J]. 浙江大学学报(医学版), 2004, **3**: 16-19.
- [19] 胡丹娜. 中枢组胺及其受体对帕金森病大鼠旋转行为的作用[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [20] 孙项丽, 郭莹莹, 于秀娟, 等. 鲭鱼品质评价及品质变化与组胺含量研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, **10**(12): 3 708-3 713.
- [21] 李梅, 韦薇, 高旗, 等. 基于组氨酸抑制 Cu^{2+} - H_2O_2 -ABTS 反应比色法检测组氨酸[J]. 广东化工, 2016, **43**(6): 34-36.
- [22] 刘玲, 李瑞怡, 来婷, 等. His-CDs@ NaTbF_4 的合成及其在组氨酸检测和肿瘤细胞成像中的应用[J]. 无机化学学报, 2018, **34**(7): 1 240-1 248.
- [23] 许应生, 张花花, 李瑞怡, 等. 组氨酸和五乙烯六胺功能化掺硼石墨烯量子点的合成及荧光检测中草药中姜黄素[J]. 分析实验室, 2023, **42**(9): 1 150-1 157.
- [24] 肖慧, 何婧琳, 肖昊, 等. 基于末端脱氧核苷酸转移酶扩增 DNA-铜纳米簇荧光传感检测 L-组氨酸[J]. 分析化学, 2017, **45**(10): 1 517-1 522.
- [25] 刘可远, 杜柑宏, 叶龙, 等. 一种高选择性识别组氨酸的聚合物基手性光学传感器[A]//中国化学会. 主题 A: 高分子化学——2017 全国高分子学术论文报告会摘要集[C]. 2017: 57-58.
- [26] POLLASTRINI M, MARAFON G, CLAYDEN J, et al. Light-mediated control of activity in a photosensitive foldamer that mimics an esterase[J]. *Chem. Commun.*, 2021, **57**(18): 2 269-2 272.

化学品与环境

编者按:世界环境日(World Environment Day)的意义在于提醒全世界注意地球状况和人类活动对环境的危害,强调保护和改善人类环境的重要性。世界环境日为每年的6月5日,它反映了世界各国人民对环境问题的认识和态度,表达了人类对美好环境的向往和追求。

为加深读者对环境保护的认识,树立环保理念,提高环保意识,本刊策划了化学品与环境专栏,本栏目共收录了3篇文章,主要涉及土壤污染物检测、含铅废水修复技术、高放废液中钚的萃取分离等方面。

磁性固相萃取技术在土壤污染物检测中的应用研究进展

王泽岚¹,李瑞雪^{*1},李谦¹,吴明¹,朱捷¹,孟哲²

(1.宁夏回族自治区食品检测研究院(国家市场监管重点实验室(枸杞和葡萄酒质量安全)),宁夏 银川 750001;

2.宁夏大学 化学化工学院 省部共建煤炭高效利用与绿色化工国家重点实验室,宁夏 银川 750021)

摘要:近年来,各种污染物通过多种途径进入土壤环境中并积累,对土壤环境质量、食品安全和人体健康产生极大的危害。土壤基质较为复杂,采用高效、选择性好、灵敏度高、便捷简单的前处理技术对土壤中的污染物进行分析检测尤为重要。磁性固相萃取技术作为一种新型的前处理方法,与传统前处理技术相比具有多种优势。随着磁性纳米材料的兴起,根据土壤中污染物的不同,通过对磁性纳米粒子进行功能化修饰可以得到不同吸附性能的吸附材料,从而对土壤中的各种污染物进行选择性的吸附。梳理了土壤中存在的主要污染物、传统的前处理技术、磁性固相萃取技术简介及优势,详细阐述了磁性固相萃取技术在土壤污染物分析检测中的应用研究进展,为磁性固相萃取技术在土壤污染物实际检测应用中提供参考。

关键词:土壤;磁性固相萃取技术;污染物残留;分析检测;样品前处理

中图分类号:S132 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)06-0053-10

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0789

Research Progress on the Application of Magnetic Solid-phase Extraction Technology in Soil Pollutant Detection WANG Ze-lan¹, LI Rui-xue^{*1}, LI Qian¹, WU Ming¹, ZHU Jie¹, MENG Zhe² (1.Ningxia Food Testing and Research Institute (Key Laboratory of Quality Safety of Chinese Wolfberry and Wine for State Market Regulation), Yinchuan 750001, China; 2.State Key Laboratory of High-efficiency Utilization of Coal and Green Chemical Engineering, College of Chemistry, Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In recent years, various pollutants have entered the soil environment through various ways and accumulated, posing a great threat to soil environmental quality, food safety, and human health. The soil matrix is relatively complex, and it is particularly important to use efficient, selective, and convenient pre-treatment techniques to analyze and detect pollutants in the soil. Magnetic solid-phase extraction technology, as a new pre-treatment method, has multiple advantages compared to traditional pre-treatment techniques. With the rise of magnetic nanomaterials, according to the different pollutants in the soil, functional modification of magnetic nanoparticles can obtain adsorption materials with different adsorption properties, thereby selectively adsorbing various pollutants in the soil. The article summarized the main present pollutants in the soil, traditional pre-treatment technologies, brief

收稿日期:2023-12-06;网络首发日期:2024-03-28

基金项目:宁夏自然科学基金项目(2022AAC03718);2021年区科技厅重点研发项目(2021BEG03026)。

作者简介:王泽岚(1994-),女,宁夏中宁人,硕士,工程师,主要研究方向为色谱质谱检测和分析。

通讯作者:李瑞雪, E-mail: nsj_lrx@163.com。

引用本文:王泽岚,李瑞雪,李谦,等.磁性固相萃取技术在土壤污染物检测中的应用研究进展[J].化学试剂,2024,46(6):53-62。

introduction and advantages of magnetic solid-phase extraction technology, and elaborated on the application research progress of magnetic solid-phase extraction technology in soil pollutant analysis and detection, providing reference for the practical application of magnetic solid-phase extraction technology in soil pollutant detection.

Key words: soil; magnetic solid-phase extraction technology; pollutant residues; analysis and detection; sample pretreatment

1 土壤中污染物的种类及危害

土壤是地球上最宝贵的自然资源之一,是人类赖以生存和发展的物质基础。粮食安全、水安全、能源安全、气候变化、生物多样性等与土壤密切相关,土壤是各种生态系统服务的核心^[1]。然而,随着社会经济的迅猛发展,工业化、城市化、现代化进程加快,土壤污染问题也日趋严重,对食品安全、土壤环境质量和人体健康产生极大的危害。土壤污染物主要分为化学污染物、物理污染物、生物污染物、放射性污染物及其他新兴污染物,其中常见的污染物有重金属、有机农药、放射性元素、有害微生物、新兴污染物等。

1.1 重金属

土壤中的重金属主要有镉(Cd)、汞(Hg)、砷(As)、铜(Cu)、铅(Pb)、锌(Zn)和镍(Ni)。2014年环境保护部发布了《全国土壤污染状况调查公报》,公报中显示我国有16.1%点位的土壤污染程度超标,其中无机污染物超标点位占82.8%,土壤中Cd、Ni、As、Cu、Hg 5种重金属的超标率分别为7.0%、4.8%、2.7%、2.1%、1.6%^[2]。土壤中的重金属污染通常是自然和人为双重因素的影响,一方面源自岩石风化的母岩中重金属的量^[3]。火山爆发、森林火灾等自然因素也会使重金属漂浮在空气中,最终以大气沉降的方式进入土壤。另一方面,采矿、冶金、纺织、垃圾处理等人为因素,也会使大气、水体中的重金属迁移转化到土壤中,造成土壤中重金属污染。这些土壤中的重金属不仅会影响地面植物体,对植物产生毒害作用,导致植物生长缓慢、产量降低、植物体内重金属积累等现象^[4],增加了粮食的安全风险,还会进一步通过食物链累积,严重威胁到人们的身体安全。进入人体的重金属只有一小部分可以被代谢出体外,有些重金属即使在低浓度下也会对人体造成严重的损害,如致癌、致突变、致畸等^[5]。

1.2 有机农药

农药是农业上广泛用于防止病虫害及调节植物生长的化学药剂,是当前农业生产中不可缺少的一种生产资料。使用农药可以迅速有效地控制住病虫害的侵扰,生产成本低防治效果好,大大减

少了作物的损失,提高了农作物的产量。尽管喷洒农药在一定程度上提高了作物的产量,然而每年施用的农药,施用于田间的农药只有10%~20%的施用量作用于目标农作物表面,大部分都洒落在土壤或漂浮在大气中^[6,7]。土壤中的农药残留会干扰生物多样性和土壤特性,广泛密集的使用农药加剧了土壤污染,导致土壤酸化、土壤养分减少、土壤结构板结、土壤生物种类及数量减少^[8]。农药在土壤中存在期很长,农药低的溶解度和高的结构稳定性极大地限制了其在土壤中的降解。农作物除了通过茎、叶、种子等部位进行病虫害防治,还会通过对土壤中存在的农药进行吸收,积累在作物体内^[9]。农药残留对人体危害巨大,可造成人的肝、肾和神经系统损伤,可致急性、慢性中毒。土壤污染中常见的有机农药种类有杀虫剂类、除草剂类、杀菌剂类等^[10-12]。

1.3 放射性元素

土壤的放射性污染包括天然放射性源和人为放射性源^[13]。土壤中天然放射性源是自然产物中⁴⁰K、²³⁸U、²²⁶Ra、²³²Th等元素经过放射性衰变,在衰变过程中产生的一系列放射性子体而广泛分布于土壤环境中。天然放射性元素内外照射剂量非常低,不会影响人的正常生产生活。土壤中的人为放射性源主要来自于大气层核试验产生的放射性落下灰,处置不当的工业生产和医疗等产生放射性同位素的单位机构,含铀矿物、石油、天然气、煤、泥炭及某些矿砂等开采冶炼过程中释放出的放射性废弃物^[14]。¹³⁷Cs、⁹⁰Sr是土壤环境中最危险的放射性物质,会对人体造成极大的危害,如致畸、致癌、致突变,大剂量照射时会造成生物和人的死亡。长期低剂量土壤放射性辐射会危害食品安全,降低土壤肥效及土壤对有毒物质的净化功能^[15,16]。

1.4 新兴污染物

新兴污染物主要包括全氟化合物、环境内分泌干扰物、药品和个人护理品、微塑料等^[17]。新兴污染物通常具有多种生物毒性,具有较强的生物持久性和生物富集等特性。其来源广泛,对生态环境及人体健康构成严重危害。全氟化合物会

随着食物链进入到人体,对人类生殖系统和神经系统造成毒害^[18]。环境内分泌干扰物包括双酚 A、多溴联苯醚类、烷基酚类、邻苯二甲酸酯等,会对人体的正常生理代谢产生干扰^[19]。药品和个人护理品具有生物累积性,会通过食物链放大进入人体从而产生危害,会引发人体过敏反应,对人体产生致癌作用^[20]。微塑料是指直径<5 mm 的塑料颗粒,常见的微塑料有聚乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯等,微塑料会通过食物链进入不同层次动植物体内,最终经过传递进入人体。新兴污染物已通过多种途径进入土壤并在土壤环境中积累,对土壤生态系统和人类健康造成了潜在的危害^[21]。

2 土壤中污染物的分析检测技术

土壤污染具有隐蔽性、潜伏性、长期性和滞后性。土壤污染与大气污染、水污染等污染问题相比,土壤污染一般不易察觉,从土壤污染问题出现到产生严重后果往往滞后较长时间。因此,及时对土壤中污染物进行分析检测不但可以及时发现问题,而且通过检测所得的数据对于农业生产是至关重要的。土壤基质较为复杂,在进行土壤样品分析时,前处理方法及检测方法通常有以下几种。

2.1 预处理方法

土壤样品预处理主要是提取和净化两个环节。常见的提取和净化方法有振荡提取、超声波辅助萃取法、索氏提取法、固相萃取法、基质固相分散萃取法、加速溶剂萃取法等,这些传统的预处理方法在土壤样品的分析检测中已有应用。

2.1.1 振荡提取法

振荡提取法是在土壤样品中加入适当的提取试剂并进行涡旋振荡,使得土壤中的目标污染物充分溶解在溶剂中。振荡提取法简单易操作,提取效果较好,但是较多使用有机试剂,不利于环保。

2.1.2 超声波辅助萃取法

超声波辅助萃取法是在土壤样品中加入适当的提取试剂,利用超声波对液体施加负压时产生空化、扰动、击碎等作用,加速目标物进入溶剂,从而对目标物进行萃取。该方法提取效率高,简单易操作,但是也会较多使用有机试剂。

2.1.3 索氏提取法

索氏提取法是将样品置于回流装置中,加入

提取液进行浸润和加热,从而提取出样品中的目标污染物。该方法可以保证土壤样品与溶剂充分接触,但是会耗费较多有机试剂,耗时较长,在实际应用中很难快速的获得检测结果。

2.1.4 固相萃取法

固相萃取法是通过固体吸附剂吸附土壤样品中目标污染物的一种方法,在杂质分离后再加入洗脱液对目标物进行洗脱富集。固相萃取法能有效的将目标物与干扰组分分离,不需要过多有机试剂。但是不能处理大量样品,固相萃取柱重复使用性低,样品过柱流速、洗脱液流速、淋洗液强度等都会对实验结果产生影响,操作耗时较长。

2.1.5 基质固相分散萃取法

基质固相分散萃取法是将样品吸附在 C18、C8 键的固定相,用不同极性的溶剂洗脱样品。该方法可以从固体或半固体样品中提取出目标化合物,减少了有机溶剂使用量,但是需要根据样品性质选择合适的固相分散剂和洗脱剂,操作条件严格,对设备的依赖程度高。

2.1.6 加速溶剂萃取法

加速溶剂萃取法选择合适的溶剂,通过提高萃取溶剂的温度(50~200℃)和压力(10.3~20.6 MPa)来提高萃取效率的一种方法。加速溶剂萃取法具有萃取溶剂用量少、速度快以及萃取效率高的优点。但是该方法对设备的要求高,高温高压条件下可能会使目标化合物分解,影响分析结果。

2.2 检测方法

样品前处理技术至关重要,不同分析仪器原理不同,对样品前处理的要求也不同。常见的用于土壤中污染物检测的方法有液相色谱法、气相色谱法、液相色谱-质谱法、气相色谱-质谱法等。

2.2.1 色谱法

色谱法是试样中各组分在色谱分离柱中的固定相和流动相间不断进行分配的过程。色谱法根据流动相的不同又分为气相色谱法和液相色谱法。色谱法能够进行高效的化合物分离和定量分析,具有分离效率高、灵敏度高、分析速度快、应用范围广的特点。试样经过色谱柱的分离进入到检测器,常见的检测器包括荧光检测器、紫外检测器、氢火焰离子化检测器、电子捕获检测器等。

气相色谱法(GC)通常用于沸点低于 400℃ 的各种有机或无机试样的分析。气相色谱法分析的样品应具有可挥发性且热稳定性好,GC 能直接

分析的样品应该是气体或液体,若是固体样品应溶解在适当的溶剂中或通过特殊的进样技术进行分析。在土壤样品分析检测中,气相色谱法主要用于作物、土壤残留的有机磷、有机氯、氨基甲酸酯以及拟除虫菊酯类农药检测。液相色谱法(HPLC)通常用于高沸点、热稳定性差、相对分子量较大的有机物定量或定性分析,如氨基甲酸酯杀虫剂、草甘膦除草剂、多环芳烃类化合物、联苯胺类化合物、酚类和醛酮类化合物等。采用 HPLC 分析的样品要求纯度高、溶解性好、浓度应该在适当的范围内,若配备紫外检测器,应确保样品具有紫外吸收。

2.2.2 质谱法

质谱法在土壤污染物的检测中具有广泛的应用。质谱分析法是将分子电离成分子离子和碎片离子,利用不同离子在电场或磁场的运动行为不同,按照离子的质荷比(m/z)分开进行定性、定量分析的一种方法。质谱法通常与气相色谱或液相色谱联用,气相色谱或液相色谱是分离系统,而质谱是检测系统。气相色谱-质谱法和液相色谱-质谱法能检测出 400~500 种蔬菜、水果、土壤中有有机磷、有机氯、拟除虫菊酯类、氨基甲酸酯类农药及其他有机污染物。

气相色谱-质谱法联用(GC-MS)综合了气相色谱和质谱的特性,先采用气相色谱使样品中复杂的化学组分得到分离,不同组分随着载气流出色谱柱,进入到离子源进行离子化,把离子按质荷比分开得到质谱图,通过质谱图得到样品定性定量结果。此方法可在较短的时间内对多组分混合物进行分析,具有检测灵敏度高和分离效果好的优点。采用 GC-MS 分析检测的样品,应该在色谱柱的工作温度范围内能够完全气化,样品可挥发、热稳定性好。

气相色谱三重四级杆质谱联用仪(GC-MS/MS)通过使用四级杆串联质谱进行目标分析物的定性和定量分析,首先离子源将经色谱柱分离出的化合物使用电子轰击或化学电离进行离子化,离子化后的化合物被引入四级杆质量分析器中,通过调节四级杆中的偏压和交变电场的频率,只有指定范围内 m/z 的离子可以穿过四级杆。GC-MS/MS 能对目标物进行更高灵敏度、高选择性的分析检测,对痕量化合物准确定量,可用于复杂样品的分析,可以通过离子碎片提供更详细的信息,已广泛应用于环境、食品、医药等领域的研究和分

析检测。

液相色谱-质谱法联用(LC-MS)结合了液相色谱有效分离热不稳定性及高沸点化合物的分离能力与质谱仪组分的鉴定能力,通常用于不挥发性化合物、极性化合物、热不稳定性、大分子量化合物等的分析测定。此方法具有高分离能力、高灵敏度、低检测限、应用范围更广,可分析复杂有机混合物,已广泛用于药品分析、食品分析、环境分析等领域。为获得更好的分析检测结果,在进行 LC-MS 前,样品需要完全溶解并去除杂质,若使用缓冲体系需要用易挥发性缓冲剂。

液相色谱三重四级杆质谱联用仪(LC-MS/MS)是一种高分辨率的分析仪器,样品分离后的化合物从液相色谱中进入质谱检测系统,首先经过 ESI 源或 APCI 电离源获得离子,四级杆质量分析器根据离子的质荷比将它们分离,同一时间内只允许一种质荷比的离子通过四级杆,通过改变四级杆的电压,可以选择不同的目标离子。三重四级杆液质联用仪具有更高的灵敏度、更好的分辨率和更广泛的分析范围,在环境分析、药物代谢研究、生物分析等领域广泛应用。

2.2.3 光谱法

光谱法可以快速准确地检测土壤中存在的各种有机或无机化合物,在土壤污染物的检测中具有广泛的应用。通过紫外-可见吸收光谱法可以检测土壤中的无机物质,如重金属离子的定性和定量分析。荧光光谱法可以检测土壤中的有机物质,如对多环芳烃等的定性定量分析。采用光谱法进行检测的样品需要能够在合适的溶剂中溶解,溶解度的选择应适宜,样品稳定,样品浓度应在仪器的检测范围内。

3 磁性固相萃取技术

3.1 磁性固相萃取技术的简介

磁性固相萃取(MSPE)是将具有磁性的材料作为吸附剂对目标分析物进行分离富集的一种前处理方法。该技术结合了磁性分离和固相萃取的特点,是 21 世纪分离富集领域的革命性技术,在样品预处理方面具有重要的应用价值。在 MSPE 过程中,磁性固相萃取材料加入到样品溶液中,待目标分析物吸附到材料表面,施加外部磁场弃去杂质溶液,后加入适当的洗脱液,再通过外部磁场转移洗脱液,进行测定。图 1 为磁性固相萃取法测定土壤中农药的示意图。

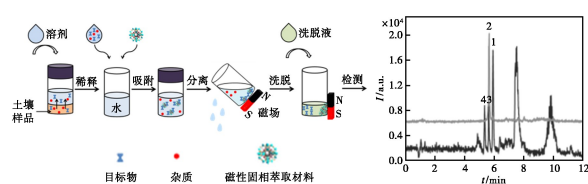


图 1 磁性固相萃取法测定土壤中农药的过程示意图

Fig.1 Schematic representation of the procedure for determination of pesticides in soil using magnetic solid-phase extraction

3.2 磁性固相萃取技术的优点

磁性固相萃取技术与传统前处理技术相比具有多种优势。磁性固相吸附材料通常是纳米级材料,比表面积更大,使用较少用量的吸附剂在较短的时间内就可以吸附到目标物质。MSPE 使用外部磁场即可实现相互分离,操作简单省时,特别是与传统的固相萃取相比,避免了耗时的离心、上样、柱堵塞等过程。此外,磁性吸附剂可以根据目标物的不同,对磁性吸附剂进行功能化修饰,在使用后对吸附材料进行清洗,可以循环使用。磁性固相萃取技术已广泛应用于食品安全^[22-24]、环境监测^[25-27]、生物医药^[28-30]等领域。

3.3 磁性固相萃取材料及其吸附原理

磁性材料是磁性固相萃取技术的关键,根据目标化合物的性质设计出不同功能化的磁性固相萃取材料,从而达到从复杂基质中选择性吸附目标化合物的目的。随着新材料的迅速发展,多种磁性材料被合成制备,常见的有磁性金属有机骨架材料、磁性碳纳米材料、磁性分子印迹聚合物纳米材料、磁性纳米复合材料等。

3.3.1 磁性金属有机骨架材料

金属有机骨架材料是由金属离子或离子簇与有机配体通过配位键自组装形成的一种具有周期性网状结构的晶体材料,具有比表面积大、超高的孔隙率、孔结构可调节、可功能化修饰等多种优势^[31],现已成为在分离富集、催化、药物传递、超级电容等领域极具前景的杂化材料^[32]。由于金属有机骨架材料的功能化可修饰性,其与目标分析物之间的相互作用机制也有所不同,如疏水性作用、静电作用、氢键、 π -配合及孔径拓展等^[33]。

3.3.2 磁性碳纳米材料

磁性碳纳米材料中以磁性石墨烯、磁性石墨烯衍生物、磁性碳纳米管等在样品的前处理领域得到了广泛的关注。石墨烯是碳的同素异形体,是由无数个 sp^2 杂化相连的碳原子紧密排列呈二

维蜂窝状结构,这些独特的结构使得石墨烯具有优异的导电性能、光学性能、带隙可调的电学特性、超大的比表面积及良好的生物相容性,被认为是一种未来革命性的材料^[34]。氧化石墨烯是一种重要的石墨烯衍生物,其表面存在大量的含氧官能团,如羟基($-OH$)、环氧基 $[-C(O)C-]$ 、羰基($-C=O$)、羧基($-COOH$)、酯基($-COO-$)等^[35],这些含氧官能团的存在能够有效增强氧化石墨烯在溶剂中的分散性和反应活性,并且这些含氧官能团易与含氨基、羧基、异氰酸酯基等基团的目标化合物发生反应,还可以通过氢键、 π - π 键等与目标化合物实现非共价键结合^[36,37]。碳纳米管可以看做由单层或多层石墨烯片层卷曲形成^[38],具有与石墨烯类似的优异性能,如比表面积大、热稳定性好、丰富的 π - π 共轭体系等,除此之外还具有独特的中空管状结构^[39],对有机化合物具有高亲和力和较大的吸附容量。根据目标分析物的性质,将碳纳米材料赋予磁性并进行适当改性,得到的磁性碳纳米材料对复杂基质的分离富集具有重要意义。

3.3.3 磁性分子印迹聚合物纳米材料

分子印迹聚合物即根据待测物质(模板分子)的不同,模板分子与聚合物单体形成多重结合位点并被记忆,去除模板分子后,可制备出对模板专一识别的聚合物。分子印迹聚合物具有制备成本低、机械强度高、热稳定性强、耐酸碱能力好等优点^[40],能够从复杂基质中特异性结合目标分子。磁性分子印迹聚合物纳米材料作为随着磁性固相萃取技术发展起来的一种新型功能化材料,具有磁性材料的超顺磁性和分子印迹聚合物高选择性的双重优点^[41]。

3.3.4 磁性纳米复合材料

随着磁性固相萃取技术的快速发展,对磁性固相萃取材料的综合性能提出了更高的要求与挑战。研究制备多种优异性能协同作用的磁性纳米复合材料已经成为一种趋势。磁性纳米复合材料具有两种及以上吸附材料的优异性能,在复杂基质中能提高对目标分析物的选择性和吸附效率,吸附材料的稳定性也会得到改善^[42,43]。

3.4 磁性固相萃取技术在土壤污染物残留检测中的应用

3.4.1 重金属

磁性固相萃取技术已应用于土壤中重金属污染物的富集。Bagheri 等^[44]制备了一种新型磁性

金属有机骨架 (MOF) 材料 [(Fe₃O₄-Pyridine)/Cu₃(BTC)₂], 结合火焰原子吸收光谱法用于土壤等样品中 Pd(Ⅱ) 的快速吸附和检测, 该方法具有高的灵敏度和选择性, 对环境友好, 吸附容量大。Liu 等^[45] 采用改性的纳米 Fe₃O₄ 颗粒 (Fe₃O₄-DES) 作为吸附剂, 并通过电感耦合等离子体发射光谱仪同时测定土壤等环境样品中的铜和铅, 该方法线性范围宽, 检出限低, 吸附能力强, 富集因子大。Tadjarodi 等^[46] 制备了异硫氰酸苯酯功能化的核壳纳米粒子 (Fe₃O₄@SiO₂), 采用响应面法分别对影响吸附过程和脱附过程的因素进行优化, 成功对土壤、水等样品中痕量的 Cd(Ⅱ) 和 Pb(Ⅱ) 离子进行快速吸附, Cd(Ⅱ) 和 Pb(Ⅱ) 离子的 LOD 分别为 0.05 和 0.9 ng/mL, 吸附容量分别为 179 和 156 mg/g, 吸附性能好, 吸附速度快。Xie 等^[47] 制备了新型磁性离子印迹聚合物 (DMIIP) 用于土壤和食品中 Cd²⁺、Pb²⁺ 的分离和分析, DMIIP 表现出大的吸附容量, 高的选择性, 可以实现快速吸附并具有良好的重复使用性能。He 等^[48] 制备了 Fe₃O₄@SiO₂@GMA-S-SH 磁性纳米颗粒, 通过与高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用, 建立了一种磁性固相萃取土壤、农田水等样品中痕量 Hg²⁺ 的检测方法, 由于功能基团的高亲和力, 该磁性纳米颗粒对 Hg²⁺ 表现出优异的吸附性能, 加标样品回收率为 84.3%~116%。Taghizadeh 等^[49] 制备了一种新型磁性 MOF 纳米复合材料并成功应用于土壤等样品中痕量 Cd(Ⅱ)、Pb(Ⅱ)、Zn(Ⅱ)、Ni(Ⅱ) 4 种重金属离子的快速提取, 采用 Box-Behnken 响应面试验设计对吸附过程和解吸过程中的主要因素进行优化, 4 种离子的 LOD 为 0.12~1.2 ng/mL, 吸附量为 98~206 mg/g。Wang 等^[50] 制备了一种花状磁性二硫化钼纳米复合材料 (MoS₂/Fe₃O₄) 用于土壤和废水样品中 Pb(Ⅱ) 和 Hg(Ⅱ) 的吸附和去除, MoS₂/Fe₃O₄ 复合材料易于分离, 选择性好, 可重复使用, 在 5 次吸附-解析循环后仍表现出良好的吸附性能。虽然已有一些磁性固相萃取技术应用于土壤样品中重金属污染物的研究, 但多数还是对水样或食品等样品中重金属污染物的研究^[51-55]。

3.4.2 有机农药

磁性固相萃取技术已广泛应用于土壤中痕量有机农药的吸附。金晶等^[56] 基于磁性固相萃取技术, 采用超高效液相色谱质谱法进行定性定量

分析, 建立了土壤中 4 种苯脲类除草剂的前处理方法, 该方法检出限低, 灵敏度高, 4 种苯脲类除草剂的回收率为 72.7%~94.4%, 适用于土壤中痕量苯脲类物质的测定。Gubin 等^[57] 制备了离子液体修饰的磁性纳米颗粒, 建立了一种 MSPE-GC-MS 方法用于测定土壤、水、海底沉积物中的 2,4-D 丁酯及其代谢产物, 各目标物质回收率均可达到 92% 以上, 该方法应用于土壤样品中, 2,4-D 和 2,4-DB 的 LOD 为 10 ng/kg, 4-CP 和 2,4-DCP 的 LOD 为 10~15 ng/kg。Oller-Ruiz 等^[58] 制备了 CoFe₂O₄@聚吡咯磁性纳米离子, 使用三重四级杆串联质谱法对土壤中 6 种氯代苯氧酸类除草剂进行测定分析, 平均回收率为 80%~117%, 日间相对标准偏差为 6.3%~14%。He 等^[59] 制备了一种新型氨基功能化磁性骨架复合材料 Fe₃O₄-NH₂@MIL-101(Cr), 采用微波辅助磁性固相萃取结合气相色谱-电子捕获检测器建立了土壤样品中 8 种有机氯农药的检测方法, 回收率为 71.2~102.4%, 该方法检出限低, 灵敏度高, 基质干扰少, 可以在短时间内从复杂基质中提取分析物。Phosiri 等^[60] 以氯化胆碱和蔗糖为原料, 合成了一种磁性层状双氢氧化物复合材料 (MIH@Mg/Al LDH-NADES), 用于吸附环境样品中的有机氯农药, 该方法萃取时间短, 溶剂用量少, 线性范围宽, 检出限和定量限低, 精密度高, 回收率为 88.8%~104.1%, 适用于土壤等环境样品中有机氯农药的分析检测。Wang 等^[61] 建立了一种基于 Fe₃O₄@β-环糊精脂质双层纳米复合材料 (Fe₃O₄@β-CD-LB) 与气相色谱-四级杆-飞行时间质谱联用检测土壤样品中 9 种有机氯农药的方法, Fe₃O₄@β-CD-LB 可以选择性提取土壤样品中 9 种有机氯农药, 与传统分析方法相比, 该方法简便快速, 线性范围宽, 检出限低, 重复性好, 平均回收率可达 78%~107%。Zhao 等^[62] 首次制备了氨基修饰的磁性多壁碳纳米管 (m-MWCNTs-NH₂), 磁性固相萃取-液相色谱-串联质谱法吸附水、土壤和河流沉积物中 18 种农药残留物, 各目标物质回收率为 80.3%~105.9%, 定量限在液体基质中 <2.04 ng/L, 在固体基质中 <0.50 ng/g, 该方法具有操作简单、快速、富集因子高等优点。

3.4.3 新兴污染物

周婵媛等^[63] 采用原位反应法制备了管内填充磁性碳纳米管 (IF-MCNTs), 建立了管内填充磁性碳纳米管/磁性固相萃取-气相色谱/质谱法

(IF-MCNTs/MSPE-GC/MS)测定土壤和水藻样品中7种多环芳烃的分析方法,所制备的IF-MCNTs能够有效富集萘(NAP)、蒽(ANE)、茚(FLU)、菲(PHE)、荧蒽(FLA)、芘(PYR)和苯并荧蒽(B(b)FL),方法线性范围为5.0~500 ng/L,检出限为1.7~3.1 ng/L,实际环境样品中7种PAHs加标回收率为73.5%~97.2%。Li等^[64]制备了MOF-1210(Zr/Cu)-MNPs磁性纳米粒子,结合高效液相色谱法用于土壤样品中二苯甲酮的分析检测,该方法线性范围为0.1~300.0 ng/mL,重现性好,RSD≤3.60%,LOD为0.01~0.02 ng/mL,成功应用于土壤样品中二苯甲酮的提取和检测,回收率为87.6%~113.8%。Gamonchuang等^[65]采用不同的氨基聚合物对混合氢氧化铁(MIHs)进行改性,结果表明聚苯二胺改性的混合氢氧化铁(MIH@PPDA)对苯酚表现出良好的吸附性能,在土壤样品中,所有苯酚残留物的回收率为78.2%~130.1%,RSD低于10.8%。Li等^[66]制备了还原氧化石墨烯/ZnFe₂O₄(rGO/ZnFe₂O₄)复合材料磁性固相萃取雌激素,该方法线性范围为0.05~500 ng/mL,在土壤样品中,4种雌激素的回收率均可达到78.56%以上。Pasanen等^[67]制备了一种磁性多孔纳米复合材料(nano-Fe@ZIF-8)同时快速富集微塑料和塑料衍生的内分泌干扰物,在最佳条件下该材料能够在5 min内去除≥98%的高浓度(25 mg/L)聚苯乙烯微球,去除≥94%的双酚A(1 mg/L)和4-叔丁基苯酚(1 mg/L),显示出优异的吸附性能。

4 展望

磁性固相萃取技术对土壤中污染物的分析检测,国内外已有相关研究报道,并取得了一些成果,但目前对于土壤中的重金属、酚类物质、放射性元素等研究尚有限。针对已有的研究成果,未来的研究可着眼于以下几个方面:

4.1 构建新型具有选择性的磁性吸附材料。土壤中的污染物种类繁多,且大多数污染物在土壤中的浓度相对较小。今后可根据污染物的性质,通过对磁性纳米粒子进行功能化修饰,选择性吸附土壤中痕量的污染物质,为土壤中污染物的检测及风险评估治理提供可靠准确的支撑。

4.2 加强磁性吸附材料在土壤污染物中的应用研究。土壤基质较为复杂,目前已有大量磁性固相萃取技术在水环境样品中的应用研究,但在土

壤环境样品中的应用研究还相对较少,今后可以选择吸附性能优异的磁性吸附材料,对土壤基质进行分析检测研究。

4.3 加强磁性固相萃取技术对土壤中重金属、酚类物质、放射性元素的分析检测研究。目前土壤中的污染物大多数研究成果都聚焦在对农药的分析检测,土壤中的重金属、酚类物质、放射性元素也是主要的污染物。今后可以加强对土壤中重金属残留、酚类物质、放射性元素的分析检测研究。

4.4 加强磁性固相萃取技术对土壤中新兴污染物的分析检测研究。目前磁性固相萃取技术应用于土壤污染物分析检测的研究成果大多是在传统土壤污染物的分析检测方面,针对各类新兴污染物分析检测的应用研究还较少。土壤环境中新兴污染物的种类繁多、浓度较低,且土壤基质又比较复杂,传统检测手段对于新兴污染物在土壤中的分离和检测存在一定的局限性,磁性固相萃取技术对于土壤中新兴污染物的分离和提取具有优势,为准确量化土壤中微量和痕量的新兴污染物提供了可能。今后可以加强磁性固相萃取技术对土壤中新兴污染物的分析检测研究,为新兴污染物的风险评估及治理提供更准确的依据。

参考文献:

- [1] 陈能场,何小霞.土壤健康:中国粮食安全之根[J].资源与环境,2022,3:94-100.
- [2] 环境保护部和国土资源部.全国土壤污染状况调查公报[J].资源与人居环境,2014,4:26-27.
- [3] GUAGLIARDI I, ZUZOLO D, ALBANESE S, et al. Uranium, thorium and potassium insights on Campania region (Italy) soils: Sources patterns based on compositional data analysis and fractal model [J]. *J. Geochem. Explor.*, 2020, **212**: 106 508.
- [4] CHEN Y G, HE X L S, HUANG J H, et al. Impacts of heavy metals and medicinal crops on ecological systems, environmental pollution, cultivation, and production processes in China [J]. *Ecotox. Environ. Safe.*, 2021, **219**: 112 336.
- [5] MAHAR A, WANG P, ALI A, et al. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review [J]. *Ecotox. Environ. Safe.*, 2016, **126**: 111-121.
- [6] 朱霞萍,王勇,安艳,等.环境样中有机磷农药残留检

- 测前处理技术研究进展[J].中国测试,2021,**47**(9): 52-60.
- [7] 邢献予.土壤农药污染的危害及修复技术[J].现代农村科技,2022,**4**:99-100.
- [8] 王哲,屠春宝,王如月,等.农业土壤环境污染及修复研究进展[J].农业与技术,2023,**43**(19):94-99.
- [9] 王俊伟,周春江,杨建国,等.农药残留在环境中的行为过程、危害及治理措施[J].农药科学与管理,2018,**39**(2):30-34.
- [10] 祁慧鹂,朱国繁,王鑫伟,等.农药污染土壤生物刺激修复技术研究进展[J].土壤,2021,**53**(2):221-228.
- [11] 张娜娜,姜博,邢奕,等.有机磷农药污染土壤的微生物降解研究进展[J].土壤,2018,**50**(4):645-655.
- [12] 朱国繁,应蓉蓉,叶茂,等.我国农药生产场地污染土壤修复技术研究进展[J].土壤通报,2021,**52**(2):462-473.
- [13] 杨云波,李永玲.土壤放射性污染来源及修复工艺综述[J].区域治理,2020,**2**:162-164.
- [14] 汪媛媛,郑刘根,吴盾,等.小尺度矸石堆场及其周边土壤中放射性元素特征分析及风险评价[J].环境化学,2022,**41**(11):3 640-3 649.
- [15] LI Z L, HE Y F, SONNE C, et al. A strategy for bioremediation of nuclear contaminants in the environment[J]. *Environ. Pollut.*, 2023, **319**:120 964.
- [16] YAN L J, LE Q, SONNE C, et al. Phytoremediation of radionuclides in soil, sediments and water[J]. *J. Hazard. Mater.*, 2021, **407**:124 771.
- [17] 吕小明.典型新兴环境污染物的研究进展[J].中国环境监测,2012,**28**(4):118-123.
- [18] 夏慧,敖俊杰,袁涛.室内灰尘中全氟化合物的污染状况与人体暴露水平评估[J].生态毒理学报,2016,**11**(2):223-230.
- [19] HOWSE G L, BOVILL R A, STEPHENS P J, et al. Synthesis and antibacterial profiles of targeted triclosan derivatives[J]. *Euro. J. Med. Chem.*, 2019, **162**:51-58.
- [20] AHMED S, NING J, CHENG G, et al. Receptor-based screening assays for the detection of antibiotics residues—A review[J]. *Talanta*, 2017, **166**:176-186.
- [21] 张大定,厉萌萌,朱汉青,等.土壤环境中新污染物治理的研究进展及展望[J].广东化工,2023,**50**(3):126-134.
- [22] ZHAO J, LI Z Y, CHENG T, et al. Synthesis of magnetic covalent organic framework composites for effective extraction of benzimidazole fungicides from food samples[J]. *Microchem. J.*, 2023, **195**:109 419.
- [23] YANG X S, ZHAO J, MA T T, et al. Magnetic covalent organic framework for effective solid-phase extraction and HPLC determination of ochratoxin A in food[J]. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2023, **179**:114 639.
- [24] FU Q, XUA Z Z, SUN X, et al. Recent advance and applications of covalent organic frameworks based on magnetic solid-phase extraction technology for food safety analysis[J]. *Trends Anal. Chem.*, 2023, **162**:117 054.
- [25] DUO H X, YUE J Y, ZHANG X D, et al. Magnetic solid phase extraction based on metal organic framework for pharmaceutical analysis from food, environmental and biological media[J]. *Microchem. J.*, 2024, **196**:109 557.
- [26] ALI N, RIEAD M M H, BILAL M, et al. Adsorptive remediation of environmental pollutants using magnetic hybrid materials as platform adsorbents[J]. *Chemosphere*, 2021, **284**:131 279.
- [27] SONG F, MA L, GAO L, et al. Green preparation of magnetic pyrene-based hyper-cross-linked polymer using dual-purpose ferric chloride reagent for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from natural water bodies[J]. *J. Chromatogr. A*, 2023, **1 711**:464 462.
- [28] ZHOU D B, HAN F, DING L, et al. Magnetic C₆₀ nanospheres based solid-phase extraction coupled with isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in Chinese herbal medicines[J]. *J. Chromatogr. B*, 2020, **1 144**:122 076.
- [29] GUO W J, SHI Z S, ZHANG J, et al. Analysis of aristolochic acid I in mouse serum and tissues by using magnetic solid-phase extraction and UHPLC-MS/MS[J]. *Talanta*, 2021, **235**:122 774.
- [30] ZHANG X H, XU H Y, ZHOU C Y, et al. Magnetic solid phase extraction followed by in-situ derivatization with core-shell structured magnetic graphene oxide nanocomposite for the accurate quantification of free testosterone and free androstenedione in human serum[J]. *J. Chromatogr. B*, 2022, **1 196**:123 188.
- [31] YAGHI O M, LI G M, LI H L. Selective binding and removal of guests in a microporous metal-organic framework[J]. *Nature*, 1995, **378**:703-706.
- [32] MAYA F, CABELLO C P, FRIZZARIN R M, et al. Magnetic solid-phase extraction using metal-organic frameworks (MOFs) and their derived carbons[J]. *Trends Anal. Chem.*, 2017, **90**:142-152.
- [33] HASAN Z, JHUNG S H. Removal of hazardous organics from water using metal-organic frameworks (MOFs): Plausible mechanisms for selective adsorptions[J]. *J.*

- Hazard. Mater.*, 2015, **283**:329-339.
- [34] NOVOSELOV K S, GEIM A K, MOROZOV S V, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films [J]. *Science*, 2004, **306**:666-669.
- [35] GAO W, ALEMANY L B, CI L, et al. New insights into the structure and reduction of graphite oxide [J]. *Nat. Chem.*, 2009, **1**(5):403-408.
- [36] 林源为, 郭雪峰. 石墨烯表面化学修饰及其功能调控[J]. 化学学报, 2014, **72**:277-288.
- [37] 黄国家, 陈志刚, 李茂东, 等. 石墨烯和氧化石墨烯的表面功能化改性[J]. 化学学报, 2016, **74**:789-799.
- [38] 旷文祝, 杨洋, 罗红霞, 等. 碳纳米管原生手性电化学传感器应用研究进展[J]. 化学试剂, 2023, **45**(6):69-77.
- [39] 陈点, 吕仕铭, 汪羽翎. 非共价键化学修饰碳纳米管的分散及其机理[J]. 材料导报, 2023, **37**(17):22 040 300-22 040 318.
- [40] 赵广丽, 张悦, 孙大妮, 等. 分子印迹技术用于抗生素残留检测的研究进展[J]. 化学试剂, 2022, **44**(9):1 350-1 359.
- [41] ZHOU T Y, DING L, CHE G B, et al. Recent advances and trends of molecularly imprinted polymers for specific recognition in aqueous matrix: Preparation and application in sample pretreatment [J]. *Trends Anal. Chem.*, 2019, **114**:11-28.
- [42] LI W K, CHEN J, ZHANG H X, et al. Selective determination of aromatic acids by new magnetic hydroxylated MWCNTs and MOFs based composite [J]. *Talanta*, 2017, **168**:136-145.
- [43] ZHAO X Y, CHEN L G, LI B. Magnetic molecular imprinting polymers based on three-dimensional (3D) graphene-carbon nanotube hybrid composites for analysis of melamine in milk powder [J]. *Food Chem.*, 2018, **255**:226-234.
- [44] BAGHERI A, TAGHIZADEH M, BEHBAHANI M, et al. Synthesis and characterization of magnetic metal-organic framework (MOF) as a novel sorbent, and its optimization by experimental design methodology for determination of palladium in environmental samples [J]. *Talanta*, 2012, **99**:132-139.
- [45] LIU Q, HUANG X Y, LIANG P. Preconcentration of copper and lead using deep eutectic solvent modified magnetic nanoparticles and determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry [J]. *Atom. Spectrosc.*, 2020, **41**(1):36-42.
- [46] TADJARODI A, ABBASZADEH A, TAGHIZADEH M, et al. Solid phase extraction of Cd(II) and Pb(II) ions based on a novel functionalized Fe₃O₄@SiO₂ core-shell nanoparticles with the aid of multivariate optimization methodology [J]. *Mater. Sci. Eng. C*, 2015, **49**:416-421.
- [47] XIE C S, HUANG X J, WEI S L, et al. Novel dual-template magnetic ion imprinted polymer for separation and analysis of Cd²⁺ and Pb²⁺ in soil and food [J]. *J. Clean. Product.*, 2020, **262**:121 387.
- [48] HE Y F, HE M, NAN K, et al. Magnetic solid-phase extraction using sulfur-containing functional magnetic polymer for high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometric speciation of mercury in environmental samples [J]. *J. Chromatogr. A*, 2019, **1 595**:19-27.
- [49] TAGHIZADEH M, ASGHARINEZHAD A A, POOLADI M, et al. A novel magnetic metal organic framework nanocomposite for extraction and preconcentration of heavy metal ions, and its optimization via experimental design methodology [J]. *Microchim. Acta*, 2013, **180**:1 073-1 084.
- [50] WANG Z W, ZHANG J, WEN T, et al. Highly effective remediation of Pb(II) and Hg(II) contaminated wastewater and soil by flower-like magnetic MoS₂ nano-hybrid [J]. *Sci. Total Environ.*, 2020, **699**:134 341.
- [51] WANG Y, LIN K, LIU Y, et al. Nanocomposites of functionalized metal organic frameworks and magnetic graphene oxide for selective adsorption and efficient determination of Lead(II) [J]. *J. Solid State Chem.*, 2022, **313**:123 300.
- [52] SHAN X Y, ZHANG L, YE H P, et al. Magnetic solid phase extraction of lead ion from water samples with humic acid modified magnetic nanoparticles prior to its flame atomic absorption spectrometric detection [J]. *Microchem. J.*, 2022, **179**:107 417.
- [53] ZHOU D B, XIAO Y B, HAN F, et al. Magnetic solid-phase extraction based on sulfur-functionalized magnetic metal-organic frameworks for the determination of methylmercury and inorganic mercury in water and fish samples [J]. *J. Chromatogr. A*, 2021, **1 654**:462 465.
- [54] MOLAEI K, BAGHERI H, ASGHARINEZHAD A A, et al. SiO₂-coated magnetic graphene oxide modified with polypyrrole-polythiophene: A novel and efficient nanocomposite for solid phase extraction of trace amounts of heavy metals [J]. *Talanta*, 2017, **167**:607-616.
- [55] OZDEMIR S, YALÇIN M S, KILINÇ E, et al. A fungal functionalized magnetized solid phase extractor for pre-

- concentrations of Pb(II), Mn(II), and Co(II) from real samples [J]. *Food Chem.*, 2023, **413**: 135-608.
- [56] 金晶, 顾海东, 高仕谦, 等. 超声提取-磁性固相萃取-UHPLC-MS/MS 测定土壤中 4 种苯脲类除草剂 [J]. 分析试验室, 2017, **36**(1): 87-91.
- [57] GUBIN A, SUKHANOV P, KUSHNIR A, et al. Ionic-liquid-modified magnetite nanoparticles for MSPE-GC-MS determination of 2,4-D butyl ester and its metabolites in water, soil, and bottom sediments [J]. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 2022, **17**: 100-652.
- [58] OLLER-RUIZ A, GARRIDO I, VIÑAS P, et al. Reliable analysis of chlorophenoxy herbicides in soil and water by magnetic solid phase extraction and liquid chromatography [J]. *Environ. Chem. Lett.*, 2018, **16**: 1 077-1 082.
- [59] HE X, ZHOU Y Y, YANG W, et al. Microwave assisted magnetic solid phase extraction using a novel aminofunctionalized magnetic framework composite of type $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@MIL-101 (Cr)}$ for the determination of organochlorine pesticides in soil samples [J]. *Talanta*, 2019, **196**: 572-578.
- [60] PHOSIRI P, SANTALADCHAIYAKIT Y, BURAKHAM R. Natural deep eutectic solvent-decorated magnetic layered double hydroxide as a sorbent for the enrichment of organochlorine pesticides in environmental samples [J]. *J. Chromatogr. A*, 2022, **1 673**: 463-111.
- [61] WANG H, YAN S W, QU B, et al. Magnetic solid phase extraction using $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@}\beta\text{-cyclodextrin-lipid}$ bilayers as adsorbents followed by GC-QTOF-MS for the analysis of nine pesticides [J]. *New J. Chem.*, 2020, **44**: 7 727-7 739.
- [62] ZHAO P F, WANG Z K, LI K J, et al. Multi-residue enantiomeric analysis of 18 chiral pesticides in water, soil and river sediment using magnetic solid-phase extraction based on amino modified multiwalled carbon nanotubes and chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr. A*, 2018, **1 568**: 8-21.
- [63] 周婵媛, 蒙眺, 杨春艳, 等. 管内填充磁性碳纳米管固相萃取-气相色谱/质谱法测定环境样品中多环芳烃 [J]. 分析试验室, 2021, **40**(9): 1 015-1 020.
- [64] LI W Q, WANG R, CHEN Z L. Metal-organic framework-1210(zirconium/cuprum) modified magnetic nanoparticles for solid phase extraction of benzophenones in soil samples [J]. *J. Chromatogr. A*, 2019, **1 607**: 460-403.
- [65] GAMONCHUANG J, BURAKHAM R. Amino-based magneto-polymeric-modified mixed iron hydroxides for magnetic solid phase extraction of phenol residues in environmental samples [J]. *J. Chromatogr. A*, 2021, **1 643**: 462-071.
- [66] LI W Q, ZHANG J, ZHU W L, et al. Facile preparation of reduced graphene oxide/ ZnFe_2O_4 nanocomposite as magnetic sorbents for enrichment of estrogens [J]. *Talanta*, 2020, **208**: 120-440.
- [67] PASANEN F O, FULLER R, MAY F. Fast and simultaneous removal of microplastics and plastic-derived endocrine disruptors using a magnetic ZIF-8 nanocomposite [J]. *Chem. Eng. J.*, 2023, **455**: 140-405.

重金属吸附剂巯基化核桃壳制备条件优化

孙湔¹, 张翠玲^{*1,2}, 潘樟梓¹, 尚志栋¹, 贺懿琛¹, 滕泽璟¹

(1. 兰州交通大学 环境与市政工程学院, 甘肃 兰州 730070;

2. 甘肃省黄河水环境重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为提高核桃壳(WS)对重金属离子的吸附性能,利用 L-半胱氨酸(L-Cys)对 WS 进行改性,得到巯基化核桃壳(CWS)。以 CWS 对 Pb(II) 吸附量为评价指标,利用单因素试验、响应面试验逐步优化 CWS 制备条件,并借助场发射扫描电镜(SEM)、能谱仪(EDS)和傅里叶红外光谱仪(FT-IR)等表征方法探讨 CWS 的制备机理。结果表明:L-Cys 和 WS 质量比是影响 CWS 吸附 Pb(II) 性能的主要因素,温度影响次之,pH 与温度之间存在显著的交互作用;CWS 最优制备条件为 $m(\text{L-Cys}):m(\text{WS})=1.58:1$ 、温度为 63.2 °C、pH 9.89、反应时间为 4 h,最优条件下制备的 CWS 对 Pb(II) 吸附量可达 24.06 mg/g;CWS 表面呈现许多凹陷、孔状结构丰富,CWS 制备机理主要以发生酰胺化反应为主。研究显示,经巯基化核桃壳可用于 Pb(II) 等重金属离子废水的处理。

关键词:核桃壳;L-半胱氨酸;吸附;响应面;铅废水

中图分类号:X703 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)06-0063-08

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0049

Optimization the Preparation Conditions of Sulfhydrated Walnut Shell as a Heavy Metal Adsorbent SUN Hao¹, ZHANG Cui-ling^{*1,2}, PAN Zhang-zhi¹, SHANG Zhi-dong¹, HE Yi-chen¹, TENG Ze-jing¹ (1.School of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China; 2.Gansu Provincial Key Laboratory of Yellow River Water Environment, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to improve the adsorption performance of walnut shell (WS) for heavy metal ions, WS was modified with L-cysteine (L-Cys) to obtain thiolated walnut shell (CWS). Taking the adsorption amount of Pb(II) as the evaluation index, single factor experiments and response surface experiments were used to gradually optimize the preparation conditions of CWS, and the preparation mechanism of CWS was explored with the help of SEM, EDS, FT-IR and other characterization methods. The results showed that the mass ratio of L-Cys to WS was the main factor affecting the adsorption performance of CWS for Pb(II), followed by temperature. There was a significant interaction between pH and temperature; the optimal condition of CWS was $m(\text{L-Cys}):m(\text{WS})=1.58:1$, the temperature was 63.2 °C, the pH was 9.89, and the reaction time was 4 h. The adsorption capacity of CWS prepared under the optimal conditions for Pb(II) could reach 24.06 mg/g; CWS surface presented many depressions and rich pore structures, and the preparation mechanism of CWS was mainly based on amidation reaction. Research showed that thiolated walnut shells could be used to treat heavy metal ion wastewater such as Pb(II).

Key words: walnut shell; L-cysteine; adsorption; response surface methodology; lead wastewater

含铅废水因在食物链中的不可降解性和生物蓄积性,而对生命和环境造成严重影响^[1,2]。含铅废水修复技术主要有离子交换^[3]、膜分离^[4]、电解^[5]、化学沉淀^[6]和吸附^[7,8]等,其中吸附法因成本低、方法简单和不造成二次污染等优点而被广泛推广。绳琳琳等^[7]将胡敏素-锰氧化物复合吸附材料用于含铅废水处理;陈燕敏等^[8]将废弃卷烟滤嘴中再生得到的醋酸纤维素作为原材料制备出醋酸纤维素多孔微球,对 Pb(II) 具有良好的吸附能力。而低耗的吸附材料一直是研究目标。

核桃壳(WS)作为一种常见的农林废弃物,

纤维素和半纤维素是主要组成成分,含有能与重金属离子结合的活性官能团,可用于重金属废水的处理,但对重金属离子吸附量较低^[9]。而对

收稿日期:2024-01-20;网络首发日期:2024-04-07

基金项目:甘肃省科技计划项目(22CX3GA076);甘肃省教育厅产业支撑计划项目(2021CYZC-31);宁夏回族自治区自然科学基金项目(2023AAC03336)。

作者简介:孙湔(1998-),男,甘肃天水人,硕士生,主要研究方向为水污染控制。

通讯作者:张翠玲, E-mail: zhangcui ling@ lzjtu. edu. cn。

引用本文:孙湔,张翠玲,潘樟梓,等. 重金属吸附剂巯基化核桃壳制备条件优化[J]. 化学试剂, 2024, 46(6): 63-70。

由图 1 可知,水样中 Pb(II) 吸附性能随 L-Cys 不断增加呈现先上升后下降的趋势。这可能是由于适度过量的 L-Cys 有利于酰胺化反应的进

行,提高 WS 与 L-Cys 之间有效碰撞,使得 WS 上—SH 的相对含量也随之增加。但超过一定量后,过量的 L-Cys 产生堵塞孔径,减少了与 WS 表面接触且与其他反应物质发生副反应,占用了 WS 上接枝位点,降低了 CWS 对 Pb(II) 的吸附性能。选取 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS}) = 2 : 1$ 为后续 CWS 制备条件。

2.1.2 催化剂 EDC·HCl 用量对 CWS 吸附 Pb(II) 的影响

取 0.500 0 g 的 WS、 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS}) = 2 : 1$ 、NHS 为 0.100 0 g,在温度为 65 ℃ 的条件下反应 4 h,EDC·HCl 与 L-Cys 质量比对 CWS 去除 Pb(II) 的影响如图 2 所示。

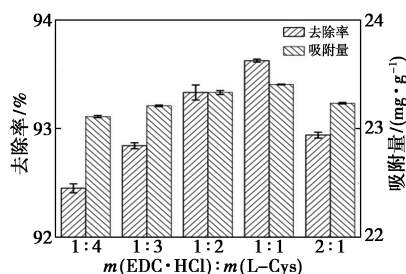


图2 EDC·HCl 对 CWS 去除 Pb(II) 影响

Fig.2 Effect of EDC·HCl on Pb(II) removal by CWS

由图 2 可知,当 $m(\text{EDC} \cdot \text{HCl}) : m(\text{L-Cys})$ 逐渐增大时,Pb(II) 的去除率先增大后降低, $m(\text{EDC} \cdot \text{HCl}) : m(\text{L-Cys}) = 1 : 1$ 时,Pb(II) 去除效果最好。可能原因是,EDC·HCl 作为一种酰胺化反应催化剂,能够与 WS 上的—COOH 反应生成中间体 O—酰基异脲,该中间体又可以与 L-Cys 分子链上—NH₂ 发生亲核反应,生成酰胺键^[14]。随着 EDC·HCl 的增加,生成的 O—酰基异脲数量迅速增多,增大了 WS 与 L-Cys 之间酰胺化反应机率,使接枝在 WS 分子链上—SH₂ 增多。而过多的 EDC·HCl 可能导致 CWS 出现凝胶态,降低孔隙度^[15,16],阻碍 WS 与 L-Cys 的有效接触,导致反应速率降低。后续 CWS 制备条件选为 $m(\text{EDC} \cdot \text{HCl}) : m(\text{L-Cys}) = 1 : 1$ 。

2.1.3 活化剂 NHS 用量对 CWS 吸附 Pb(II) 的影响

取 0.500 0 g WS、 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS}) = 2 : 1$ 、 $m(\text{EDC} \cdot \text{HCl}) : m(\text{L-Cys}) = 1 : 1$,在温度为 65 ℃ 的条件下反应 4 h,EDC·HCl 与 NHS 质量比对 CWS 去除 Pb(II) 的影响如图 3 所示。

由图 3 可知,随着 $m(\text{EDC} \cdot \text{HCl}) : m(\text{NHS})$ 比例的增加,CWS 对 Pb(II) 去除率不断上升,对

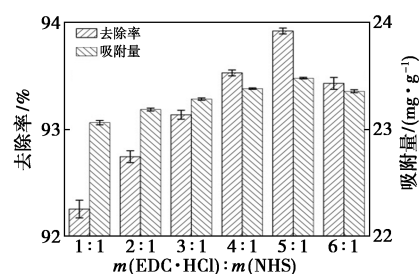


图3 NHS 对 CWS 去除 Pb(II) 影响

Fig.3 Effect of NHS on CWS removal of Pb(II)

Pb(II) 去除效果最好的比例为 $m(\text{EDC} \cdot \text{HCl}) : m(\text{NHS}) = 5 : 1$ 。这是因为中间体 O—酰基异脲分子结构极不稳定、部分水解;加入活化剂—NHS 后,O—酰基异脲与—NHS 反应生成稳定性更高的活性 NHS 酯,该产物与 L-Cys 上—NH₂ 可以生成更多的酰胺键,提高—SH 在 WS 上接枝率^[17]。但—NHS 过量时,增加反应物之间黏度,降低反应物之间的反应概率^[18]。所以后续 CWS 制备选取 $m(\text{EDC} \cdot \text{HCl}) : m(\text{NHS}) = 5 : 1$ 。

2.1.4 制备时间对 CWS 吸附 Pb(II) 的影响

取 0.500 0 g WS,加入 L-Cys 与 EDC·HCl,使 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS}) = 2 : 1$,反应时间对 CWS 去除 Pb(II) 的影响结果如图 4 所示。

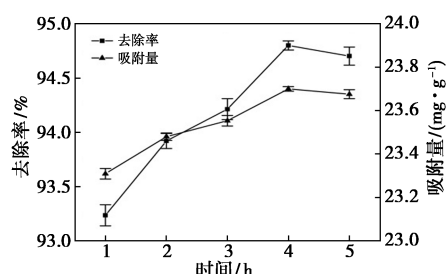


图4 反应时间对 CWS 去除 Pb(II) 影响

Fig.4 Effect of reaction time on Pb(II) removal by CWS

由图 4 可知,CWS 的制备时间对去除 Pb(II) 性能影响较小,随着反应时间的增大,去除性能先增高后略微下降。适度增加反应时间,可以使 WS 和 L-Cys 之间充分反应,但当反应时间超过一定范围后,可能会使 CWS 分子链上—SH 发生部分氧化,降低了 CWS 与 Pb(II) 之间的配位机率。结合成本与效率,所以选取 4 h 为宜。

2.1.5 温度对 CWS 吸附 Pb(II) 的影响

固定 WS 质量为 0.500 0 g,加入 L-Cys 与 EDC·HCl,温度对 CWS 去除 Pb(II) 的影响如图 5 所示。

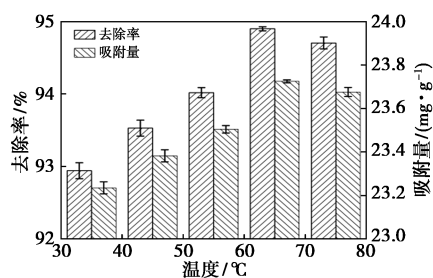


图 5 反应温度对 CWS 去除 Pb(Ⅱ) 影响

Fig.5 Effect of reaction temperature on Pb(Ⅱ) removal by CWS

由图 5 可知,随着温度的升高,CWS 对 Pb(Ⅱ)的去除率先升高后略有降低,当温度为 65 °C 时,吸附效果最好。因为低温不利于 WS 与 L-Cys 之间的酰胺化反应,反应不彻底;升温可加快其反应速率,提高去除性能;但温度过高时,反应物之间活性降低且 L-Cys 上—SH 容易被氧化,从而降低 CWS 去除性能。所以后续 CWS 制备在 65 °C 下进行。

2.1.6 pH 对 CWS 吸附 Pb(Ⅱ) 的影响

固定 WS 质量为 0.500 0 g,加入 L-Cys 与 EDC·HCl,改变反应体系 pH,pH 对 CWS 去除 Pb(Ⅱ)的影响如图 6 所示。

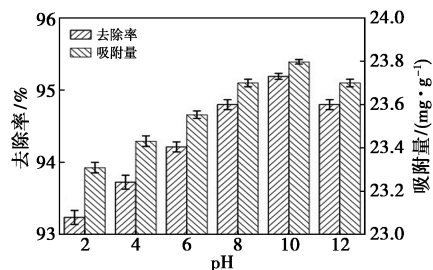


图 6 反应 pH 对 CWS 去除 Pb(Ⅱ) 影响

Fig.6 Effect of reaction pH on Pb(Ⅱ) removal by CWS

由图 6 可以看出,随着体系 pH 升高,CWS 对 Pb(Ⅱ)的去除率逐渐呈上升趋势。当 pH 10 时,CWS 对 Pb(Ⅱ)的去除效果最好。pH 过低导致 WS 与 L-Cys 通过酰胺化反应制备的 CWS 酸化,H⁺含量较多^[19],H⁺与 Pb(Ⅱ)有着吸附竞争作用,减弱 CWS 对 Pb(Ⅱ)的吸附能力。当 pH 12 时,可能是因为 L-Cys 上—SH 容易形成二硫键,CWS 对 Pb(Ⅱ)去除性能有所降低。所以选用 pH 10 作为 CWS 后续制备条件。

2.2 响应面法优化制备条件

2.2.1 CCD 实验设计与结果

基于单因素结果,选 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 、温

度、pH 这 3 个较显著影响因子,固定反应时长为 4 h,利用响应面法中的 Box-Behnken 设计,以 CWS 对 Pb(Ⅱ)的去除率为目标响应值。考察影响因子对 CWS 吸附 Pb(Ⅱ)性能的影响及之间交互作用,实验设计与结果分别如表 1 和 2 所示。

表 1 试验因素和水平编码

Tab.1 Experimental factor and level coding

编号	因素	水平				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A	$m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$	0.32	1	2	3	3.68
B	pH	4.64	6	8	10	11.63
C	温度	48.18	55	65	75	81.82

表 2 CCD 试验方案与结果

Tab.2 CCD test plan and results

试验序号	A	B	C	Pb(Ⅱ) 去除率/%
1	3.00	6.00	55.00	94.12
2	3.68	8.00	65.00	93.76
3	2.00	8.00	65.00	95.76
4	0.32	8.00	65.00	95.12
5	2.00	8.00	65.00	95.21
6	2.00	8.00	65.00	96.14
7	2.00	8.00	65.00	95.86
8	1.00	6.00	75.00	94.32
9	2.00	8.00	65.00	95.46
10	2.00	11.36	65.00	95.68
11	2.00	4.64	65.00	95.06
12	1.00	10.00	75.00	94.71
13	2.00	8.00	65.00	95.89
14	2.00	8.00	81.82	93.24
15	1.00	10.00	55.00	95.58
16	1.00	6.00	55.00	94.96
17	3.00	10.00	55.00	95.32
18	2.00	8.00	48.18	92.56
19	3.00	10.00	75.00	93.52
20	3.00	6.00	75.00	94.02

2.2.2 响应面方差分析

对试验数据进行回归分析得到如式(5)所示的回归模型,回归模型的方差分析及显著性检验结果见表 3。

$$Y = 95.71 - 0.36A + 0.20B - 0.17C - 0.039AB - 0.049AC - 0.24BC - 0.36A^2 - 0.035B^2 - 0.91C^2 \quad (5)$$

由表 3 方差分析可知,模型回归项 $P > F = 0.0034 < 0.05$,模型拟合显著。多元回归模型的相关系数为 $R^2 = 0.8562 > 0.8$,说明实验数据可以由此模型表示^[20]。模型决定系数 R_{adj}^2 为 0.7268,说明预测值与实际值接近;变异系数(CV)为 $0.55\% < 10\%$,说明可用该模型对 CWS 制备进行优化分析^[20]。

表 3 CCD 模型的方差分析
Tab.3 Analysis of variance of CCD model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P>F
模型	16.23	9	1.80	6.62	0.003 4
A	1.74	1	1.74	6.39	0.030 0
B	0.55	1	0.55	2.04	0.184 2
C	0.38	1	0.38	1.38	0.267 4
AB	0.012	1	0.012	0.044	0.838 0
AC	0.019	1	0.019	0.070	0.797 1
BC	0.47	1	0.47	1.71	0.220 5
A ²	1.90	1	1.90	6.98	0.024 6
B ²	0.017	1	0.017	0.064	0.806 0
C ²	11.88	1	11.88	43.58	<0.000 1
残差	2.73	10	0.27		
失拟项	2.17	5	0.43		
误差	0.55	5	0.11		
总和	18.96	19			

2.2.3 响应面分析

利用 Design-Expert 8 软件分析 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 、温度、pH 各因素之间交互作用及对 Pb(Ⅱ)去除性能的影响,得到 3 个因素之间对 Pb(Ⅱ)去除率的三维模型图和等高图(图 7~9)。

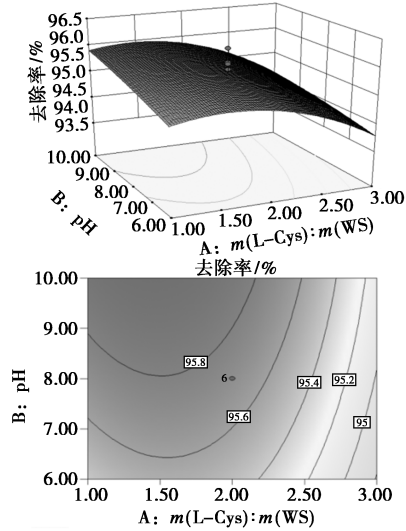


图 7 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 与 pH 影响 Pb(Ⅱ)去除率的响应曲面和等高图

Fig.7 Response surface and contour plot of the effect of mass ratio of L-Cys to WS and pH on Pb(Ⅱ) removal rate

图 7 显示了 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 与 pH 对 CWS 的吸附性能。图中等高线接近圆形,证明 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 与 pH 对 Pb(Ⅱ)的吸附性能无显著影响^[21];与赵瑜等^[22]研究结果相比,拟合曲面坡度较小,随着 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 与 pH 的

增大,CWS 对 Pb(Ⅱ)吸附能力变化不明显,说明 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 与 pH 之间交互作用对去除率的结果影响较小;从图中可以看出 pH 约为 8.0 时,CWS 吸附能力达到最佳。

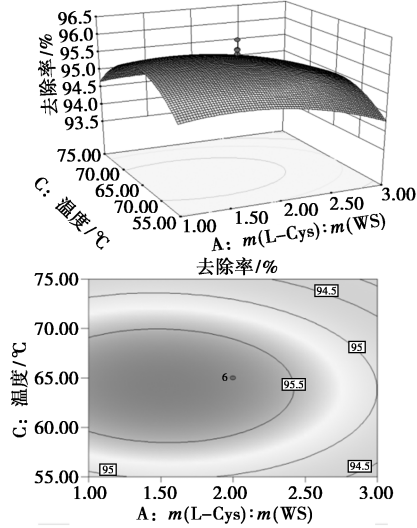


图 8 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 与温度影响 Pb(Ⅱ)去除率的响应曲面和等高图

Fig.8 Response surface and contour plot of the mass ratio of L-Cys to WS and the effect of temperature on Pb(Ⅱ) removal rate

图 8 为 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 与温度对 CWS 的吸附性能。等高线接近圆形,表明 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 与温度对 Pb(Ⅱ)的吸附性能无显著影响;拟合曲面坡度较大,随着 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 与温度不断增大,CWS 对 Pb(Ⅱ)的去除率先增

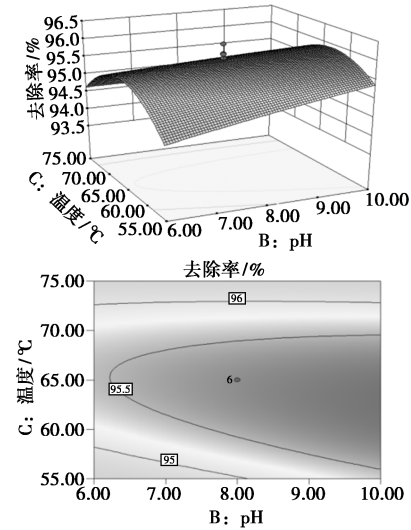


图 9 pH 与温度影响 Pb(Ⅱ)去除率的响应曲面和等高图

Fig.9 Response surface and contour plot of pH and temperature effects on Pb(Ⅱ) removal rate

大后降低,说明 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS})$ 与温度之间交互作用对除 $\text{Pb}(\text{II})$ 结果影响较大。

图 9 为 pH 与温度对 CWS 的吸附性能。等高线为椭圆形,表明 pH 与温度对 $\text{Pb}(\text{II})$ 的有显著影响;拟合曲面坡度较大,随着 pH 与温度不断增大,CWS 对 $\text{Pb}(\text{II})$ 的去除率先显著增大后减小,说明 pH 与温度之间交互作用对除 $\text{Pb}(\text{II})$ 有显著影响。当温度为 65 $^{\circ}\text{C}$ 时,CWS 吸附能力最佳。

2.2.4 验证试验

由二次拟合模型分析可知 CWS 对 $\text{Pb}(\text{II})$ 去除达到最佳时 3 个因素的组合为 $m(\text{L-Cys}) : m(\text{WS}) = 1.58 : 1$ 、温度为 63.2 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 9.89。为了验证预测值的准确性,在最优组合条件下进行 3 次平行试验,CWS 对 $\text{Pb}(\text{II})$ 平均值去除率为 96.23%,与模型预测值 96.36% 相近,预测值与试验值拟合度较高,模型合理。

2.3 表征分析

2.3.1 扫描电镜分析(SEM)

为观察改性后核桃壳表面形貌的变化,将 WS 和最佳条件制备下的 CWS 分别置于扫描电镜下观察,得到如图 10 所示不同放大倍数下的 SEM 图像。

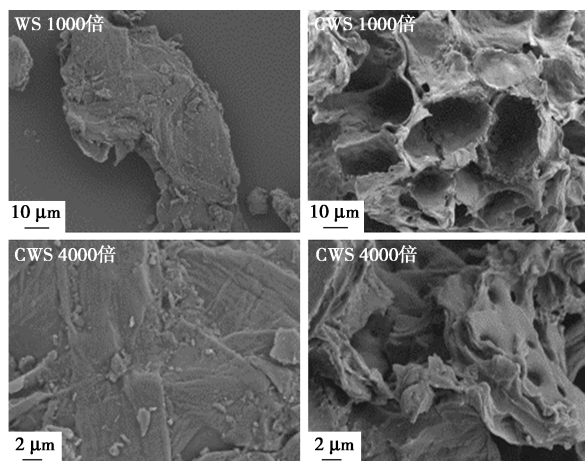


图 10 改性前后核桃壳扫描电镜图

Fig.10 Scanning electron microscope images of WS before and after modification

由图 10 可知,CWS 与 WS 相比表面更加粗糙,出现大量不规则孔状结构,表面呈褶皱形貌,沟壑增多,比表面积增大,活性位点增多,进一步说明 CWS 对 $\text{Pb}(\text{II})$ 有着较好的吸附性能^[23]。

2.3.2 X 射线能谱分析(EDS)

通过面扫等形式对 WS 与 CWS 表面进行能

谱分析,改性前后 WS 与 CWS 表面元素含量变化如表 4 所示。

表 4 WS、CWS 元素含量表

Tab.4 Element content of WS and CWS

元素	质量百分含量/%	
	WS	CWS
C	63.53	58.84
O	35.21	37.75
N	0.94	1.68
S	0.03	1.35
K	0.07	0.06
Ca	0.15	0.07
Mg	0.03	0.02
Na	0.04	0.23
总量	100	100

通过表 4 可看出,CWS 与 WS 相比,C 含量有所降低,这可能是因为预处理时 NaOH 溶液溶解了半纤维素和木质素,引入烷基支链,使烷基化程度增加,从而降解了半纤维素和木质素^[24]。CWS 表面 N、S 含量明显增高,说明经过酰胺化反应,L-Cys 上的—SH 与—NH₂ 成功引入到 WS 分子链上。

2.3.3 红外光谱分析(FT-IR)

将 WS 和 CWS 经蒸馏水洗涤数次后于 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱下烘干,利用 KBr 压片法进行红外光谱表征分析,结果如图 11 所示。

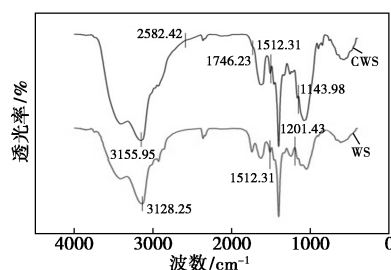


图 11 WS 与 CWS 红外光谱图

Fig.11 Infrared spectra of WS and CWS

由图 11 可以看出,WS 与 CWS 在 3 128.25 和 3 155.95 cm^{-1} 附近均出现了一个较强吸收峰,该峰由—OH 伸缩振动产生^[25],该峰且发生了偏移,说明经 NaOH 预处理后消除了 WS 纤维分子上部分氢键^[26]。WS 中在 1 201.43 cm^{-1} 处表示半纤维素中愈创木基环甲氧基振动峰明显减弱,说明木质素被有效降解^[27],且 CWS 中 1 143.98 cm^{-1} 处表示纤维素中 C—O—C 振动峰偏移且有所增强,也进一步说明木质素的降解使纤维素含量相对增加^[28]。在 1 746.23 cm^{-1} 处出现了酰胺

键吸收峰,因此说明 WS 上含氧基团与 L-Cys 上的氨基发生反应^[29]。在 $1\,512.31\text{ cm}^{-1}$ 处 WS 和 CWS 均出现较强峰,该峰为 —COO— 振动峰^[30],且峰值明显加强。CWS 中在 $2\,582.42\text{ cm}^{-1}$ 处出现 —SH 伸缩振动峰^[31]。通过以上这些峰值的变化,说明 L-Cys 与 WS 发生了如式(1)与(2)所示的反应,将 —SH 成功引入到 WS 分子链上。

3 结论

3.1 L-Cys 和 WS 的质量比是影响 CWS 性能的主要因素,随着质量比的增大,CWS 对 Pb(II) 的吸附去除性能呈现先增后降的趋势;温度影响次之,时间影响最小,pH 与温度之间存在交互作用对 Pb(II) 去除有显著影响。

3.2 CWS 最佳制备条件为 $m(\text{L-Cys}):m(\text{WS})=1.58:1$ 、温度为 $63.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 9.89、反应时间为 4 h,在最优条件下制备的 CWS 用于含铅废水的处理,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,以 150 r/min 的振荡速率吸附 2 h,对 Pb(II) 的吸附量可达 24.06 mg/g 。

3.3 与 WS 相比,CWS 表面呈现许多凹陷、孔状结构更加丰富、吸附位点明显增多,CWS 制备机理主要为 WS 分子结构的羧基(—COOH)与 L-Cys 的氨基(—NH_2)发生酰胺化反应。

3.4 本课题主要研究 CWS 的制备条件及 CWS 对 Pb(II) 的吸附机理和吸附性能,对成分复杂、影响因素众多的实际 Pb(II) 废水未做研究,CWS 的实际应用价值仍需进一步研究;同时对 CWS 在实际含 Pb(II) 废水中脱附和循环吸附性能也需进一步探索。

参考文献:

- [1] 古小超,梅鹏蔚,张震,等.含铅废水处理技术研究进展[J].工业水处理,2020,**40**(12):14-19.
- [2] 孙迎雪,朱琳.重金属污染对环境管理与保护的影响[J].环境工程,2023,**41**(4):304-305.
- [3] 朱建龙,孙荣,周佳燕,等.磷酸改性板蓝根药渣污泥基生物炭的制备及其对含铅废水的处理研究[J].给水排水,2024,**60**(1):57-65.
- [4] ABOU-SHA D Y, AHM E D, ALMERIA O J, et al. Effect of pH on separation of Pb(II) and NO_3^- from aqueous solutions using electrodialysis [J]. *Desalination*, 2012, **285**(1):46-53.
- [5] CUI X, LI N, CHEN G, et al. Sludge based micro-electrolysis filler for removing tetracycline from solution [J]. *Colloid Interf. Sci.*, 2019, **534**(1):490-498.
- [6] 古小超,梅鹏蔚,张震,等.含铅废水处理技术研究进展[J].工业水处理,2020,**40**(12):14-19.
- [7] 绳琳琳,黄占斌,王颖南.胡敏素-锰氧化物复合材料对铅的吸附特征研究[J].现代化工,2023,**43**(7):159-164;170.
- [8] 陈燕敏,刘冰,赵文伯,等.废弃烟滤嘴制备醋酸纤维素微球及其对 Pb(II) 的吸附性能[J].化学试剂,2023,**45**(2):83-89.
- [9] 鲁秀国,鄢培培,党晓芳.核桃壳对模拟废水中 Cu^{2+} 的吸附性能研究[J].环境污染与防治,2014,**36**(1):1-4;8.
- [10] WANG C, HE M, ZHOU F, et al. Heavy metal ion adsorption properties and stability of aminesulfur modified biochar in aqueous solution [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2021, **42**(2):874-882.
- [11] 汤琪,刘攀,王孝华,等.磷酸改性核桃壳作为 Cr(VI) 吸附剂的改性工艺优化研究[J].化工新型材料,2020,**48**(1):162-166;172.
- [12] 鲁秀国,陈晶,官伟.核桃壳生物质负载纳米零价铁对 Cr(VI) 污染土壤的修复研究[J].应用化工,2023, **52**(6):1 669-1 674.
- [13] GEORGIEVA G V, GONSALVES L, TAVLIEVA P M. Thermodynamics and kinetics of the removal of nickel (II) ions from aqueous solutions by biochar adsorbent made from agro-waste walnut shells [J]. *J. Mol. Liq.*, 2020, **312**:112 788.
- [14] 王进喜,常青,王亚军.一种改性高分子絮凝剂的制备[J].环境工程,2014,**32**(5):45-48.
- [15] XU T, LIU X. Peanut shell activated carbon: Characterization, surface modification and adsorption of Pb^{2+} from aqueous solution [J]. *Chin. J. Chem. Eng.*, 2008, **16**(3):401-406.
- [16] SHEYDA A, ESMAEIL B, VIVEK S, et al. The effect of the carbodiimide cross-linker on the structural and biocompatibility properties of collagen-chondroitin sulfate electrospun mat [J]. *Int. J. Nanomed.*, 2018, **13**:4 405-4 416.
- [17] PARK C, VO L C, KANG T, et al. New method and characterization of self-assembled gelatinoleic-nanoparticles using a desolvation method via carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) reaction [J]. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, **89**(1):365-373.
- [18] ZHANG X, YAN L, LI J, et al. Adsorption of heavy metals by L-cysteine intercalated layered double hydroxide: Kinetic, isothermal and mechanistic studies [J]. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 2020, **562**(C):149-158.
- [19] 李运环,冯长江,崔俊瑛,等.水生植物基载镁生物炭复合材料对水溶液中 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 的吸附研究[J].现代化工,2022,**42**(S2):263-268.

- [20] 王露露, 王刚, 周雅琦, 等. 基于响应面法优化重金属絮凝剂 DTSPAM 对水中 Cu^{2+} 的去除条件[J]. 应用化工, 2022, **51**(6): 1 586-1 591; 1 597.
- [21] BHAGWAT K P, JHAMPLE B S, DANDGE B P. Statistical medium optimization for the production of collagenolytic protease by *Pseudomonas* sp. SUK using response surface methodology [J]. *Microbiology*, 2015, **84**(4): 520-530.
- [22] 赵瑜, 张翠玲, 李晓, 等. 重金属吸附剂巯基化花生壳制备条件的优化[J]. 花生学报, 2023, **52**(1): 92-100.
- [23] 詹凤琪, 李彦龙, 盖安俊, 等. 活性氮化硼的制备、表征及其对重金属离子的吸附特性研究[J]. 环境科学研究, 2023, **36**(7): 1 317-1 328.
- [24] 孙永鹏, 王刚, 高微微, 等. 新型除镉吸附剂 MPWS 制备条件的优化与机理[J]. 环境科学研究, 2023, **36**(3): 546-556.
- [25] LIANG X F, HAN J, XU Y M, et al. Sorption of Cd^{2+} on mercapto and amino functionalized palygorskite[J]. *Appl. Surf. Sci.*, 2014, **322**(15): 194-201.
- [26] 何士成, 彭太兵, 孙曼钰, 等. 碱处理中温度对不同底物特性木质纤维素结构及酶解的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, **45**(21): 292-296.
- [27] ZHOU Q, YAN C, LUO W. Preparation of a novel carboxylaterich wheat straw through surface graft modification for efficient separation of $\text{Ce}(\text{III})$ from wastewater [J]. *Mater. Design*, 2016, **97**(1): 195-203.
- [28] TANG F, ZHANG L, ZHANG Z, et al. Cellulose filter paper with antibacterial activity from surface-initiated ATRP[J]. *J. Macromol. Sci.*, 2009, **46**(10): 989-996.
- [29] 赵文金, 张顺, 安晓强, 等. 聚硫代酰胺修饰活性炭对 $\text{Au}(\text{III})$ 的选择性吸附效果与机制[J]. 环境科学, 2022, **43**(3): 1 521-1 528.
- [30] LI X, ZHU X, ZHU Y, et al. Porous nitrogen-doped carbon vegetable-sponges with enhanced lithium storage performance[J]. *Carbon*, 2014, **69**(1): 515-524.
- [31] 王冕, 赵龙, 侯红. 巯基改性坡缕石的制备、表征及其对 Cd 的吸附作用[J]. 环境科学研究, 2023, **36**(4): 794-804.

吡啶-氧杂二氮唑在钯离子萃取分离中的应用

张丽芬¹, 李书启^{*1}, 叶泽聪^{*2}, 梁宁³, 许奕超³, 刘志豪⁴

(1.天津天狮学院 食品工程学院,天津 301700;2.广东工业大学 轻工化工学院,广东 广州 510006;

3.泰灵佳科技(北京)有限公司,北京 100020;4.甘肃味美食品有限公司,甘肃 兰州 730070)

摘要: 高放废液中钯的萃取分离对贵金属钯资源的回收利用和核燃料循环中的玻璃固化过程都有重要意义,其关键在于高效高选择性萃取体系的开发和设计。基于氮杂环配体高效配合钯离子的特性,设计合成了一种具有吡啶-氧杂二氮唑结构的萃取剂 6,6'-((4-异丁氧基吡啶-2,6-二基)双(1,2,4-氧杂二氮唑-5,3-二基))双(4-异丁氧基吡啶甲腈)(T2),用于酸性条件下钯离子的选择性萃取。以间硝基三氟甲苯为稀释剂且在 1 mol/L 2-溴己酸存在下,配体 T2 对钯离子体现出较好的萃取能力。萃取动力学表明 2 h 即可萃取 68% 的钯进入有机相。该体系适用酸度广泛,在 0.2~4 mol/L 硝酸条件下均对钯展现出定量萃取,表明其优异的酸稳定性。此外,在多种阳离子共存条件下,该体系能高选择性地分离萃取出钯离子,表明其良好的实际应用潜力。研究不仅提供了一类高效的钯萃取剂,更为其它新型钯萃取剂和萃取体系的开发提供了重要参考。

关键词: 钯分离;氮杂环;高放废液;溶剂萃取;配体

中图分类号: O641.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)06-0071-06

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0056

Synthesis of Pyridine-oxadiazole Ligand and Its Application in Palladium Ion Extraction and Separation ZHANG Li-fen¹, LI Shu-qi^{*1}, YE Ze-cong^{*2}, LIANG Ning³, XU Yi-chao³, LIU Zhi-hao⁴ (1.School of Food Engineering, Tianjin Tianshi College, Tianjin 301700, China; 2.School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China; 3. Teling Technology (Beijing) Limited Company, Beijing 100020, China; 4. Gansu Weimei Food Limited Company, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The extraction and separation of palladium from high-level liquid waste is of great significance to the recovery and utilization of precious metal palladium resources and the glass solidification process in the nuclear fuel cycle. The key lies in the development and design of efficient and highly selective extraction system. Based on the characteristics of efficient complexation of palladium ions with nitrogen heterocyclic ligands, an extractant 6,6'-((4-isobutoxypyridine-2,6-diyl) bis(1,2,4-oxadiazole-5,3-diyl)) bis(4-isobutoxypicolonitrile) (T2) with pyridine-oxadiazole structure was designed and synthesized for the selective extraction of palladium ions under acidic conditions. With 3-nitrobenzotrifluoride as the diluent and in the presence of 1 mol/L 2-bromhexanoic acid, ligand T2 has a good extraction ability for palladium ion. The extraction kinetics showed that 68% of palladium could be extracted into the organic phase within 2 h. The system is applicable to a wide range of acidity, and almost shows quantitative extraction of palladium under the condition of 0.2~4 mol/L nitric acid, indicating its excellent acid stability. In addition, under the condition of coexistence of multiple cations, the system can selectively separate and extract palladium ions, indicating its good practical application potential. This work not only provides a kind of efficient palladium extractants, but also provides an important reference for the development of other new palladium extractants and extraction systems.

Key words: palladium separation; nitrogen heterocycle; high level liquid waste; solvent extraction; ligand

金属钯作为一种贵金属,具有耐腐蚀、耐高温以及强延展性等特点,因此在医疗器械、制药工程、燃料电池、珠宝及汽车催化转化器等领域都有

着广泛的应用^[1-4]。而另一方面,二价钯离子(Pd²⁺)具有与某些蛋白质、维生素以及 DNA 配位的倾向,从而破坏一些细胞结构^[5]。人们除了会

收稿日期:2024-01-24;网络首发日期:2024-05-08

基金项目:国家自然科学基金委员会青年科学基金项目(NSFC22205040)。

作者简介:张丽芬(1977-),女,河北张家口人,硕士,高级工程师,主要研究方向为化学分析检测。

通讯作者:李书启,E-mail:lishuqibrez@163.com;叶泽聪,E-mail:yezecong@gdut.edu.cn。

引用本文:张丽芬,李书启,叶泽聪,等.吡啶-氧杂二氮唑在钯离子萃取分离中的应用[J].化学试剂,2024,46(6):71-76。

受到某些被微量钡离子污染的药物和医药产品的影 响外,还会受到被手机辐射、珠宝、汽车排放物 等的催化转化的钡离子威胁。并且含有 Pd^{2+} 的 废弃物极易污染生物和环境,导致潜在的危害,对 人类健康构成威胁^[6,7]。乏燃料后处理过程产生 的高放废液含有大量钡,从高放废液中回收钡不 仅可以极大地缓解我国钡资源短缺问题,也可以 避免核废液玻璃化过程中形成独立相,从而降低 放射性污染物泄露风险。

在过去几十年中,各种技术已被用于从放射 性溶液中回收裂变产生的 Pd^{2+} ^[8-11]。其中,液-液 萃取法由于其效率高、成本低、易于操作等优点, 成为了高放废液后处理中唯一工业化的金属离子 分离方法。从其它共存金属离子中分离钡需要 使用能够承受长时间暴露于辐射和极高酸度溶 液的萃取剂^[12,13]。因此,设计结构稳定的萃取 剂是从高放废物中回收 Pd^{2+} 的另一个挑战。此 外,在这种高酸性条件下, Pd^{2+} 对于其它金属离 子的选择性也是一大难题。到目前为止,很少 有萃取剂能够同时满足所有这些要求。开发一 种高效且能选择性分离 Pd^{2+} 的溶剂萃取体系显 得至关重要。

据软硬酸碱理论,钡属于软酸,更偏向于和 氮/硫等软碱配体配合。其中,氮配体更加环 保^[14,15],完全焚烧后不产生二次污染和固体残 留,因此相较于含硫配体^[16,17] 受到更为广泛的关 注。本文利用氮杂环配体高效高选择性配合 Pd^{2+} 的特性,设计并合成了一种吡啶-氧杂二氮唑 配体用于酸性条件下钡离子的选择性萃取分离。 主要报道该类萃取剂的合成方法,以及其在不同 酸度、浓度、多种竞争离子存在等条件下对钡离 子的溶剂萃取性能。通过氮原子的引入,增强了与 钡离子的配位能力,使钡离子的萃取分离获得了 理想的效果。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Avance III HD 400 MHz 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);OPTON-31055 TSQ Endura 型超高 效液相色谱串联三重四极杆质谱联用仪(美国 Thermo Fisher 公司);5110 型等离子体发射光谱 仪(美国 Agilent 公司)。

4-氧代-1,4-二氢-2,6-吡啶二甲酸($\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_5$)、

三氟乙酸酐($\text{C}_4\text{F}_6\text{O}_3$, TFAA)、吡啶($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$)、氨 水(NH_4OH)、N,N-二甲基甲酰胺($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$)、 N,N-二异丙基乙胺($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}$, DIEA)(上海毕得医 药科技有限公 司);甲醇(CH_3OH)、乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)、二氯甲烷(CH_2Cl_2)、硫酸(H_2SO_4)、溴 代异丁烷($\text{C}_4\text{H}_9\text{Br}$)、碳酸钾(K_2CO_3)、氢氧化钠 (NaOH)、四氢呋喃($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$)(上海阿拉丁生化科 技股份有限公司);草酰氯($\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$)、四丁基氟 化铵($\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{FN}$)(萨恩化学技术(上海)有限公 司)。所用药品及试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

目标化合物的合成路线如图 1 所示,其中 4- 羟基-2,6-吡啶二甲酸(1)、2,6-吡啶二甲酸-4-羟 基-2,6-二甲酯(2)、2,6-吡啶二甲酸-4-(2-甲基丙 氧基)-2,6-二甲酯(3)、4-(2-甲基丙氧基)-2,6-吡 啶二甲酸(4)为已知化合物,新化合物的合成步 骤及表征如下。

1.2.1 4-异丁氧基吡啶-2,6-二甲酰胺(5)的 合成

向含有 1.6 g (6.00 mmol) 化合物 3 的 50 mL 甲醇溶液中滴加 12.0 mL (28% 在水中, 0.12 mol) NH_4OH , 所得混合物在室温下剧烈搅拌 24 h。将 形成的白色沉淀过滤并用冷却水洗涤,并在真空 下干燥,得到 1.18 g 83% 白色固体化合物 5。 $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz), δ : 8.82 (s, 2H); 7.68 (s, 2H); 7.64 (s, 2H); 3.97 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz); 2.06 (m, 1H); 1.00 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz)。

1.2.2 2,6-二氰基-4-异丁氧基吡啶(6)的合成

在氮气气氛下,向含有 680 mg (2.9 mmol) 化 合物 5 的 100 mL 无水二氯甲烷(DCM)悬浮液中 加入 1.02 g (12.9 mmol) 吡啶,并缓慢加入 1.45 g (6.89 mmol) 三氟乙酸酐。在室温下搅拌所得混 合物 18 h 后,加入 75 mL 水。收集有机相,用 50 mL DCM 萃取水相。合并的有机相用无水 Na_2SO_4 干燥,减压浓缩。残余物通过硅胶快速色 谱(DCM 作为洗脱剂)纯化,得到 480 mg 84% 白 色油状的化合物 6。 $^1\text{H NMR}$ ($\text{Chloroform}-d$, 400 MHz), δ : 7.37 (s, 2H); 3.88 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz); 2.16 (m, 1H); 1.06 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz)。 $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{Chloroform}-d$, 100 MHz), δ : 166.43, 136.17, 118.09, 115.63, 76.06, 27.90, 18.89。 ESI-HRMS, 实测值(计算值), m/z : 202.097 4 (202.097 5) [$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O} + \text{H}$] $^+$ 。

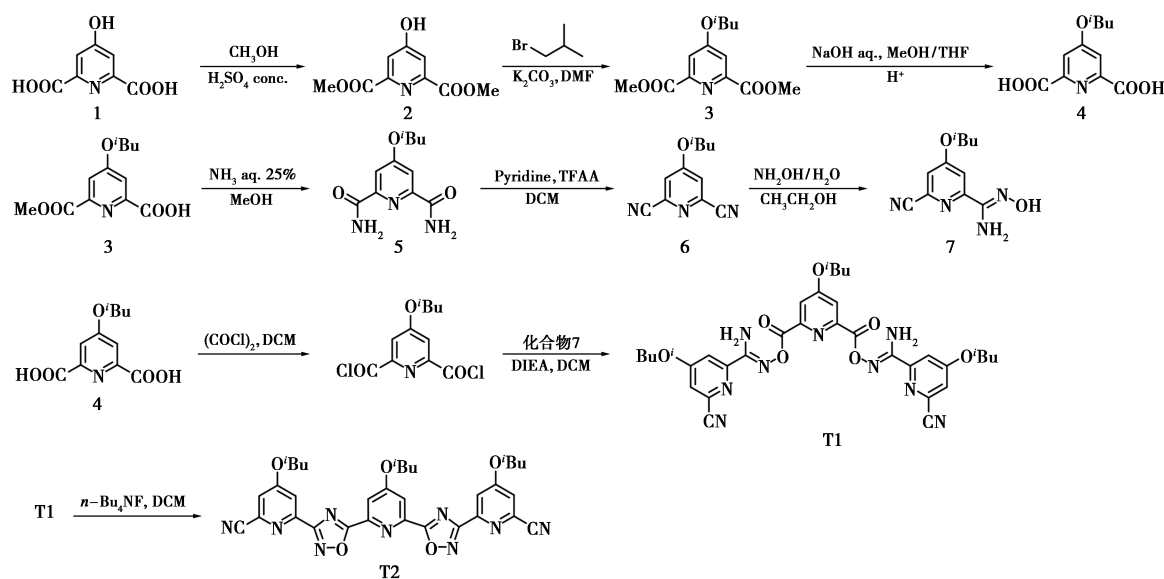


图 1 分子结构式以及合成路线图

Fig.1 Molecular structures and synthetic route

1.2.3 2-氨基肼-6-氰基-4-异丁氧基吡啶(7)的合成

向含有 201 mg (1.0 mmol) 化合物 6 的乙醇溶液中加入 66 mg (1.0 mmol) 质量分数为 50% 的羟胺水溶液。在室温下搅拌该溶液 24 h, 溶剂在真空下蒸发。将产物在硅胶 ($V(\text{DCM}):V(\text{MeOH})=95:5$) 上纯化, 得到 159 mg 68% 无色固体化合物 7。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz), δ : 10.12 (s, 1H); 7.75 (d, 1H, $J=2.4$ Hz); 7.55 (d, 1H, $J=2.4$ Hz); 5.87 (s, 2H); 3.94 (d, 2H, $J=6.6$ Hz); 2.13 ~ 1.98 (m, 1H); 0.98 (d, 6H, $J=6.8$ Hz)。 ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz), δ : 170.38, 157.93, 153.96, 137.64, 121.90, 121.82, 112.95, 79.86, 32.60, 23.73。ESI-HRMS, 实测值(计算值), m/z : 235.118 6(235.119 0) [$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2+\text{H}$] $^+$ 。

1.2.4 (2Z, 2'Z)-N', N''-((4-异丁氧基吡啶-2,6-二羰基)双(氧))双(6-氰基-4-异丁氧基吡啶甲酰亚胺)(T1)的合成

向含有 172 mg (0.72 mmol) 化合物 4 的无水 DCM 溶液中加入 274 mg (2.16 mmol) 草酰氯并搅拌 1 h。将含有 337 mg (1.44 mmol) 化合物 7 和 280 mg (2.16 mmol) 二异丙基乙胺的无水 DCM 溶液加入上述草酰氯无水 DCM 溶液中, 将所得溶液搅拌 5 h 后, 在真空下除去溶剂。残余物溶解在 DCM 中, 在剧烈搅拌下加入大量甲醇后, 产生大量白色固体。通过过滤收集 444 mg 92% 白色固体, 并表征为目标化合物 T1。 ^1H NMR

(Chloroform- d , 400 MHz), δ : 7.92 (s, 2H); 7.91 (s, 2H); 7.31 (d, 2H, $J=2.4$ Hz); 6.56 (s, 4H); 3.98 (d, 2H, $J=6.4$ Hz); 3.92 (d, 4H, $J=6.4$ Hz); 2.16 (m, 3H); 1.10 (d, 6H, $J=6.8$ Hz); 1.05 (d, 12H, $J=6.8$ Hz)。ESI-HRMS, 实测值(计算值), m/z : 672.288 8(672.288 9) [$\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_9\text{O}_7+\text{H}$] $^+$ 。

1.2.5 化合物 T2 的合成

向含有 350 mg (0.52 mmol) 化合物 T1 的 30 mL DCM 中加入含有 30.5 mg (0.12 mmol) 四丁基氟化铵的 THF 溶液。将所得溶液搅拌 24 h 后, 在真空下除去溶剂。将残余物溶解在 DCM 中, 在剧烈搅拌下加入大量甲醇后形成大量白色固体。通过过滤收集 320 mg 97% 白色固体, 并表征为目标化合物 T2。 ^1H NMR (Chloroform- d , 400 MHz), δ : 8.13 (s, 2H); 8.03 ~ 7.96 (m, 2H); 7.41 ~ 7.33 (m, 2H); 4.05 (d, 2H, $J=6.4$ Hz); 3.96 (d, 4H, $J=6.4$ Hz); 2.21 (m, 3H); 1.12 (d, 6H, $J=6.9$ Hz); 1.09 (d, 12H, $J=6.6$ Hz)。 ^{13}C NMR (Chloroform- d , 100 MHz), δ : 174.60, 167.99, 167.46, 166.68, 148.90, 145.37, 135.53, 117.90, 116.51, 114.22, 112.57, 75.69, 28.05, 19.02。ESI-HRMS, 实测值(计算值), m/z : 653.294 4(653.294 3) [$\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_9\text{O}_5+\text{NH}_4$] $^+$ 。

2 结果与讨论

2.1 萃取动力学研究

为了探究萃取动力学, 本文研究了不同萃取

时间对体系 Pd^{2+} 萃取结果的影响(图 2)。将一定量的萃取剂和 2-溴己酸溶解于间硝基三氟甲苯中,制得含 3 mmol/L 萃取剂和 1 mol/L 2-溴己酸的有机相。而间硝基三氟甲苯的选择主要是因为其沸点高、难挥发,对有机配体和萃合物都有良好的溶解性。2-溴己酸作为溶剂萃取领域中常用的相改性剂,可以增加萃合物的亲脂性,并已广泛应用于高放废液中金属离子分离领域。

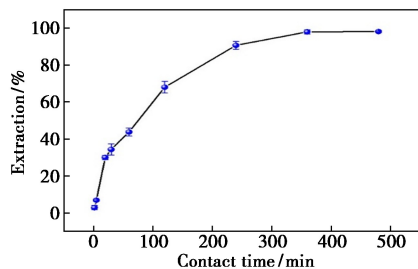


图 2 化合物 T2 在不同萃取时间对 Pd^{2+} 的萃取分配比

Fig.2 Distribution ratios of compound T2 for Pd^{2+} extraction at different contact time

水相为含有一定金属离子浓度的 HNO_3 溶液。取有机相和水相各 3 mL,装入离心管中 25 °C 充分振荡,在不同时间离心分相后取 200 mL 水相用于检测 Pd^{2+} 的剩余浓度,同时取出 200 mL 有机相,保证过程中相比始终为 1:1。实验平行 2 组。

从图 2 中可以看出,在起始阶段, Pd^{2+} 迅速被萃取进入有机相,在 120 min 时可萃取 68%,约在 360 min 时候达到平衡,萃取率达到 98%,基本实现定量萃取。但是整个萃取过程偏慢,这可能是由于稀释剂间硝基三氟甲苯粘度大,两相混合接触慢,并且配体 3 个主要氮杂环间以单键连接,萃取金属时需先将 3 个配位原子旋转至同一平面,因此需要克服较高的能垒从而对金属的结合能力相对较弱。该问题在今后研究中有望通过添加适量的低粘度稀释剂,如二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷得以优化解决。

2.2 水相酸度对其萃取的影响

由于真实含 Pd^{2+} 废水通常具有较高的酸性,因此硝酸浓度对 Pd^{2+} 萃取的影响是评价萃取剂性能的最重要因素之一。高放废液中硝酸浓度主要小于等于 4 mol/L,因此本文主要研究水相硝酸浓度为 0.2~4 mol/L 时体系对钯离子的萃取性能。其中,水相中 Pd^{2+} 的初始浓度为 0.1 mol/L。

取有机相和水相各 0.5 mL,装入离心管中 25 °C 剧烈振荡 8 h 以上,离心后取 200 mL 水相用于检测 Pd^{2+} 剩余浓度,实验平行 2 组。从图 3 可以看出,在整个酸度范围内,体系对 Pd^{2+} 均展现出优异的萃取能力,几乎都实现了定量萃取。随着酸度提高,萃取性能没有明显下降,证明配体具有良好的耐酸性和实际应用潜力。

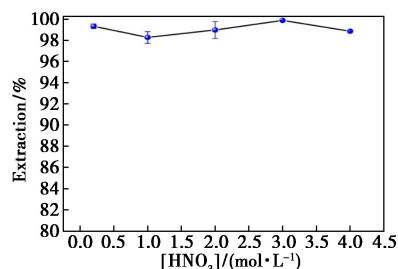
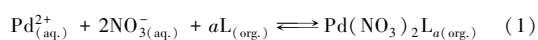


图 3 水相不同硝酸浓度对 Pd^{2+} 萃取的影响

Fig.3 Influence of nitric acid concentration in water on the extraction efficiency towards Pd^{2+}

2.3 萃取过程中的化学计量

由于配体 T2 属于中性配合萃取剂,其对 Pd^{2+} 的萃取遵循中性配合反应,可用式(1)表述。



式中,L 为配体 T2; a 为萃取 1 个钯离子时参与的配体数量;下标(org.)和(aq.)分别为有机相和水相。

在给定的实验条件下,式(1)的表观萃取平衡常数 K_{ex} 可定义为:

$$K_{\text{ex}} = [\text{Pd}(\text{NO}_3)_2\text{L}_a]_{(\text{org.})} / ([\text{Pd}^{2+}]_{(\text{aq.})} [\text{NO}_3^{-}]_{(\text{aq.})}^2 [\text{L}]_{(\text{org.})}^a) \quad (2)$$

同时,分配比 D_{Pd} 可以表示为:

$$D_{\text{Pd}} = [\text{Pd}(\text{NO}_3)_2\text{L}_a]_{(\text{org.})} / [\text{Pd}^{2+}]_{(\text{aq.})} \quad (3)$$

在式(2)中引入式(3),重新排列得到对数方程:

$$\log D_{\text{Pd}} = \log K_{\text{ex}} + 2\log [\text{NO}_3^{-}]_{(\text{aq.})} + a\log [\text{L}]_{(\text{org.})} \quad (4)$$

在式(4)中配体的平衡浓度近似等于其初始浓度。 a 的值可以从 $\log D_{\text{Pd}}$ 与 $\log [\text{L}]_{(\text{org.})}$ 的线性

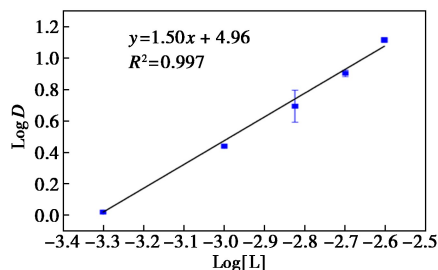


图 4 萃取剂浓度对萃取效果的影响

Fig.4 Effect of extractant concentration on extraction effect

回归图中确定。配体浓度对 Pd^{2+} 在 3.0 mol/L HNO_3 溶液中萃取的影响如图 4 所示。通过线性拟合得到一条斜率接近 1.50 的直线,表明萃取过程可能存在 L/Pd 的 1/1 和 1/2 两种配合比例的萃合物。

2.4 理论计算

使用 Gaussian 16 软件,以 B3LYP 为泛函和 6-31g(d,p) 基组优化了配体分子 T2 的基态结构。同时,获得了单/三线态能级以及前线分子轨道分布,结果如图 5a 所示。配体分子 T2 的优化结构呈现“镊子”型,大量的氮原子和氧原子朝向骨架内部,有利于对钯离子的螯合作用。

此外通过含时密度泛函方法(TD-DFT)计算了配体分子 T2 的单线态能级,三线态能级与自旋轨道耦合 SOC,由图 5b 可以看出,配体分子 T2 具有简并的三线态能级,这有利于实现多通道的自旋转换过程。

以上理论计算结果可以预测分子 T2 与钯离子形成配合物的稳定性和结构,为设计高效的萃取剂提供指导。

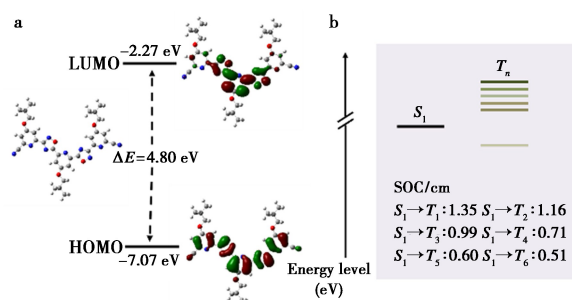


图 5 (a)利用 B3LYP/6-31g(d,p) 基组计算得到的配体 T2 的基态优化结构与 HOMO-LUMO 轨道分布;
(b)TD-DFT 计算的配体 T2 能级图

Fig.5 (a)Ground state optimization structure and HOMO-LUMO orbital distribution of ligand T2 calculated by B3LYP/6-31g (d,p) basis set;(b)ligand T2 energy level diagrams calculated by TD-DFT

2.5 萃取选择性

高放废液中含有超过 40 种金属离子,用于高放废液金属离子分离的萃取剂需体现出优异的选择性。因此,为研究配体 T2 的选择性萃取能力,以含 3 mmol/L 萃取剂和 1 mol/L 2-溴己酸为有机相,以及含 17 种金属离子的 3 mol/L HNO_3 溶液为模拟高放废液水相,取有机相和水相各 1 mL,装入离心管中 25 °C 剧烈振荡 8 h 以上,离心后取 500 mL 水相用于检测 Pd^{2+} 剩余浓度。实验平行 2

组。结果如图 6 所示,体系对 Pd^{2+} 离子的吸附率达到了 98.5%,表现出优秀的吸附能力。其他离子仅被少量萃取: Rb (11.2%), Gd (7.4%), Eu (8.2%), Yb (7.5%), Sm (8.0%), Nd (7.5%), Re (8.4%)。

以上结果表明这种吸附剂对 Pd^{2+} 有卓越的选择性,进一步证明其具有良好的实际应用潜力。这种优异的萃取选择性主要是由于氮原子这类软碱配体与 Pd^{2+} 这类软酸离子具有很强的选择性结合能力。

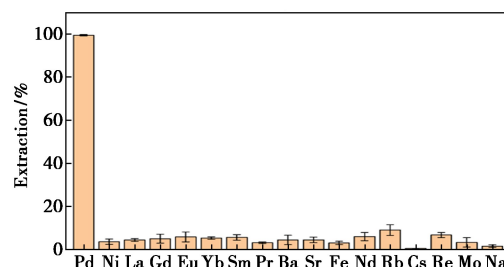


图 6 模拟高放废液中配体 T2 对不同金属离子的萃取性能

Fig.6 Extraction performances of ligand T2 for different metal ions co-existing in simulated high-level liquid waste

3 结论

本文基于氮杂环配体高效配合 Pd^{2+} 的特性,设计合成了一种吡啶-氧杂二氮唑配体 T2,用于从高浓度硝酸溶液中萃取 Pd^{2+} 。配体 T2 对 Pd^{2+} 表现出较好的萃取能力,2 h 即可萃取 68% 的 Pd^{2+} 进入有机相。并且这种配体也表现出优异的酸稳定性以及高选择性,在高放废液中分离回收 Pd^{2+} 方面具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] AWUAL M R, HASAN M M, ZNAD H. Organic-inorganic based nano-conjugate adsorbent for selective palladium (II) detection, separation and recovery [J]. *Chem. Eng. J.*, 2015, **259**: 611-619.
- [2] GIL-NEGRETE J M, SESTELO J P, SARANDESES L A. Synthesis of bench-stable solid triorganoindium reagents and reactivity in palladium-catalyzed cross-coupling reactions [J]. *Chem. Commun.*, 2018, **54**: 1 453-1 456.
- [3] 邹肖, 张宁琪, 王宝军, 等. 一种三重对称疏杂扭曲多环芳烃的合成 [J]. *化学试剂*, 2024, **46**(3): 112-117.
- [4] ZHAO Y, LI X, SCHECHTER J M, et al. Revisiting the oxidation peak in the cathodic scan of the cyclic voltam-

- mogram of alcohol oxidation on noble metal electrodes [J]. *RSC Adv.*, 2016, **6**:5 384-5 390.
- [5] VELMURUGAN M, THIRUMALRAJ B, CHEN S M, et al. Development of electrochemical sensor for the determination of palladium ions (Pd^{2+}) using flexible screen printed un-modified carbon electrode [J]. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 2017, **485**: 123-128.
- [6] CIESZYNSKA A, WISNIEWSKI M. Selective extraction of palladium (II) from hydrochloric acid solutions with phosphonium extractants [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2011, **80**: 385-389.
- [7] YAMADA M, GANDHI M R, KUNDA U M R, et al. Recovery of Pd (II) from leach solutions of automotive catalysts by solvent extraction with new thiophosphate extractants [J]. *Hydrometallurgy*, 2020, **191**: 105 221.
- [8] FORD P, SANTOS E, FERRAO P, et al. Economics of end-of-life materials recovery: A study of small appliances and computer devices in portugal [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**: 4 854-4 862.
- [9] KANCHARLA S, SASAKI K. Acid tolerant covalently functionalized graphene oxide for the selective extraction of Pd from high-level radioactive liquid wastes [J]. *J. Mater. Chem. A*, 2019, **7**: 4 561-4 573.
- [10] 于洋, 陈小雅, 丁夕格, 等. 基于高密度低共熔溶剂的分散液液微萃取 [J]. 化学试剂, 2023, **45** (11): 111-116.
- [11] ZHAO H J, GE M L, YAN Y, et al. Inductively coupled plasma mass spectrometry as a reference method to evaluate serum calcium measurement bias and the commutability of processed materials during routine measurements [J]. *Chin. Med. J. (Eng.)*, 2018, **131**: 1 584-1 590.
- [12] KONSHINA D N, BURYLIN M Y, ANASHKIN R, et al. Solid-phase extraction with injection of modified silica gel slurries into ETAAS for determination of Cu (II), Hg (II), Pd (II) [J]. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 2018, **16**: 2 885-2 894.
- [13] WOO H K, KIM H, JEON S, et al. One-step chemical treatment to design an ideal nanospacer structure for a highly sensitive and transparent pressure sensor [J]. *J. Mater. Chem. C*, 2019, **7**: 5 059-5 066.
- [14] RAJU B, KUMAR J R, LEE J Y, et al. Separation of platinum and rhodium from chloride solutions containing aluminum, magnesium and iron using solvent extraction and precipitation methods [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2012, **227/228**: 142-147.
- [15] ZHUANG W Q, FITTS J P, AJO-FRANKLIN C M, et al. Recovery of critical metals using biometallurgy [J]. *Curr. Opin. Biotech.*, 2015, **33**: 327-335.
- [16] NGUYEN T H, SONU C H, LEE M S. Separation of Pt (IV), Pd (II), Rh (III) and Ir (IV) from concentrated hydrochloric acid solutions by solvent extraction [J]. *Hydrometallurgy*, 2016, **164**: 71-77.
- [17] TRUONG H T, LEE M S. Separation of Pd (II) and Pt (IV) from hydrochloric acid solutions by solvent extraction with Cyanex 301 and LIX 63 [J]. *Miner. Eng.*, 2018, **115**: 13-20.

分析与测试

编者按:分析测试技术主要是获取物质的组成、含量、结构、形态、形貌以及变化过程的技术、方法和仪器(装置)。现代分析测试技术的发展极大地促进现代科学的发展,广泛应用于生命科学、环境化学、材料科学等领域,随着科学技术的快速发展,分析测试技术正在向快速、准确、自动、灵敏及适应特殊分析的方向迅速发展。

本栏目特别精选 5 篇不同方向的分析测试技术文章,主要涉及沉积物中壬基酚和双酚 A 的分析、双标记氨基酸同位素丰度的测定、穿心莲药材中穿心莲内酯类成分的检测、牦牛肉中多种抗生素残留的测定、9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖中碘化钠残留量的测定等方面。

高效液相色谱串联质谱法分析沉积物中壬基酚和双酚 A

王安冬,赵明,周刚,祝永卫*
(北京工业大学 分析测试中心,北京 100124)

摘要:建立并优化了基于超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱技术测定沉积物中壬基酚和双酚 A 含量的方法。沉积物样品经 HLB-SPE 萃取柱处理后,以甲醇-5 mmol/L 甲酸铵为流动相,通过 Agilent Eclipse Plus C18 RRHD 超高效液相色谱柱进行分离和分析,选择电喷雾离子源,多反应监测负离子模式下进行测定。结果表明,壬基酚和双酚 A 在质量浓度 5~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内均呈良好的线性关系, $R^2 \geq 0.99$,检出限范围为 0.066~0.14 $\mu\text{g/L}$,平均回收率为 88.9%~105%,精密密度为 2.97%~8.20%。方法的选择性、灵敏度及准确性均良好,可实现沉积物中壬基酚和双酚 A 含量的同时准确测定。

关键词:壬基酚;双酚 A;沉积物;高效液相色谱质谱联用;新污染物

中图分类号:0657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)06-0077-06

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0779

Analysis of Trace Nonylphenol and Bisphenol A in Soil Sediments by HPLC/MS/MS WANG An-dong, ZHAO Ming, ZHOU Gang, ZHU Yong-wei* (Analysis and Testing Center, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: A method for determining the content of nonylphenol and bisphenol A in soil sediment using high-performance liquid chromatography mass spectrometry was established via optimizing various parameters, such as mobile phase, chromatographic column, mass spectrometry parameters. After extracting, the soil sediments were concentrated and purified by solid phase extraction. While, methanol-5 mmol/L ammonium formate was used as mobile phase for separating and analyzing by Agilent Eclipse Plus C18 RRHD ultra high performance liquid chromatography column, in which, the negative electrospray (ESI^-) under multiple reaction monitoring (MRM) mode was detected. The results demonstrated that its detection limit range was 0.066~0.14 $\mu\text{g/L}$ and its linear range was 5~100 $\mu\text{g/L}$ with $R^2 \geq 0.99$. especially, its average recovery range was 88.9%~105% and relative standard deviation range was 2.97%~8.20%. This method presented a good selectivity, sensitivity, accuracy, and repeatability, which could meet the needs of accurate trace determination of nonylphenol and bisphenol A content in soil sediments.

Key words: nonylphenol; bisphenol A; soil sediment; liquid chromatography-mass spectrometry; emerging contaminant

近年来环境内分泌干扰物(Endocrine disrupting chemicals, EEDs)对环境安全的影响和生命健康的危害引起广泛关注^[1-3]。其中壬基酚(Nonylphenol, NP)和双酚 A(Bisphenol A, BPA)作为典型的人

收稿日期:2023-12-06;网络首发日期:2024-03-22

基金项目:新工科背景下的大型仪器设备开放共享的多元模式运行机制项目(JSWZ201801)。

作者简介:王安冬(1993-),女,山东日照人,硕士,实验师,主要研究方向为有机小分子质谱分析。

通讯作者:祝永卫, E-mail: sh@bjut.edu.cn。

引用本文:王安冬,赵明,周刚,等.高效液相色谱串联质谱法分析沉积物中壬基酚和双酚 A[J].化学试剂,2024,46(6):77-82。

工合成酚类内分泌干扰物,是大量应用于工业生产的精细化工原料,在环境中分布广泛^[4]。二者表现出较强的雌激素活性,并通过食物链进入生物体内,对生殖和神经系统等产生严重的不良作用^[5,6],已先后被欧盟、美国、加拿大等国家列为优先危害物质^[7]。

沉积物作为水体环境的重要组成部分,其对有机污染物在环境中的迁移、转化、归宿和生态效应等起着重要的作用^[8,9]。壬基酚和双酚 A 等酚类物质由于其结构脂溶分配系数大,在环境中容易吸附在悬浮体上,然后转移到沉积物中。同时,平流、腐蚀以及生物扰动等自然事件也会导致蓄积在沉积物中的污染物再次释放到水体或大气等环境中^[5]。因此,沉积物中积存的污染物对生态环境存在的潜在危害亟需引起重视。

目前,环境中壬基酚和双酚 A 的分析检测方法主要为气相色谱质谱联用法^[10-12]、高效液相色谱法^[13,14]以及液相色谱质谱联用法^[15-17]等,其中,气相色谱质谱联用法需对壬基酚和双酚 A 进行衍生化处理,前处理操作较为繁琐耗时;高效液相色谱法需要将待测物与样品基质其他干扰组分完全分离,样品运行时间较长且分离分析方法也是难点,此外高效液相色谱通常使用紫外检测器和荧光检测器,分析灵敏度受限。相比于上述前两种方法,液相色谱质谱联用法通过电喷雾离子源将样品电离后对目标物进行分析,选择性好、灵敏度高且检测时间短,已成为壬基酚和双酚 A 等污染物最常用的检测方法。但是,目前国内外对于沉积物中壬基酚和双酚 A 的限量没有出台并指定明确的标准检测方法。环境沉积物样品基质复杂,有机质种类繁多、结构和性质存在一定的差异,实际样品检测时干扰较多,对检测方法的选择性和准确度要求更高,故针对以上情况,本文通过充分考察并优化色谱和质谱条件,建立前处理简单、选择性好、准确度高的测定方法,同时测定沉积物中双酚 A 和壬基酚。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

1290-6460C 型高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国 Agilent 公司);Ultra clear TWF 型超纯水仪(德国 SIEMENS 公司);AG245 型万分之一天平(美国梅特勒公司);KQ3200DB 型超声波提取器(昆山市超声仪器有限公司);HLB-SPE

萃取柱(Oasis 3cc, 60 mg/L, 美国 Waters 公司);Lab-1A-50 型真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);KD200 型氮气吹扫仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

甲醇、乙腈、甲酸铵、氨水、甲酸(质谱纯,美国 Fisher Scientific 公司);壬基酚标准品、双酚 A 标准品、双酚 A 内标标准品(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

样品是在辽宁省葫芦岛红海滩(经纬度:40.566 181, 120.745 262),使用不锈钢柱状采样器收集沉积物岩(约 15 cm)。保持沉积物垂直并立即转移到实验室。转移过程中,沉积物被放置在一个装满同一地点采集的湖水的水槽中,并使用曝气设备来维持水槽内的溶解氧水平,以模拟原位沉积环境。共采集沉积物样品 90 个。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

分别精确称取(10.0±0.05) mg 壬基酚标准品与双酚 A 标准品以及双酚 A 内标标准品,用甲醇溶解配制成质量浓度为 1 000 mg/L 的壬基酚标准储备液、双酚 A 标准储备液以及双酚 A 内标标准储备液,密封并置于冰箱 4 ℃ 保存备用。

准确移取适量上述标准储备液,用甲醇稀释并配制成质量浓度为 10.0 mg/L 的壬基酚与双酚 A 混合标准中间液和内标标准中间液。用甲醇稀释上述混合标准中间液将其配制为壬基酚和双酚 A 质量浓度分别为 5、10、20、50、100 μg/L 的混标标准溶液,各混标标准溶液中 BPA-D₁₆ 内标物的质量浓度均为 50 μg/L。

1.2.2 样品前处理

将采集的沉积物样品在真空冷冻干燥机中冷冻干燥后研磨,过 100 目筛,准确称取(1.0±0.05) g 沉积物至玻璃离心管,加入 8 mL 丙酮超声提取 40 min,以 5 000 r/min 的速度离心 10 min,重复两次,合并上清液,氮气吹干至 1~2 mL,用超纯水稀释至 150 mL。过 0.45 μm 的玻璃纤维滤膜后准备进行固相萃取。

固相萃取柱活化:依次用 5 mL 正己烷、5 mL 二氯甲烷和 5 mL 甲醇进行活化,抽干后用 5 mL 甲醇和 10 mL 超纯水进行平衡,流速均为 1 mL/min。上样:取 2 mL 该样品调整至 pH 3 左右,接下来以 5 mL/min 的流速经过 HLB 小柱。淋洗:用 10 mL V(甲醇):V(超纯水溶液)=1:4 的混合溶液和 6 mL 正己烷依次淋洗,抽干后备用。洗脱:用

3 mL 甲醇和 5 mL $V(\text{正己烷}):V(\text{丙酮溶液})=1:1$ 的混合溶液以 1 mL/min 的流速洗脱萃取柱上的目标物质收集至 10 mL 玻璃离心管中。将全部洗脱液氮吹浓缩至近干,用甲醇复溶至 1 mL。准确添加 5 μL (10.0 mg/L) BPA- D_{16} 内标,涡旋混合均匀后通过 0.22 μm 的 PTFE 滤膜至进样瓶中。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:Agilent Eclipse Plus C18 RRHD 超高效液相色谱柱 (1.8 μm , 150 mm $\times$ 3.0 mm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL ;流速:0.3 mL/min;流动相:5 mmol 甲酸铵 (A) 和甲醇 (B);梯度洗脱程序:0 ~ 3.0 min, 30% B; 3.1 ~ 8.0 min, 95% B; 8.1 ~ 10.0 min, 95% B。

质谱条件:离子源:AJS ESI 源,负离子模式;扫描模式:多反应监测 (MRM);干燥气 (N_2) 温度:350 $^{\circ}\text{C}$;干燥气 (N_2) 流量:5 L/min;雾化器压力:310.275 kPa;鞘气温度:400 $^{\circ}\text{C}$;鞘气流量:12 L/min;毛细管电压:3 500 V。壬基酚和双酚 A 质谱参数见表 1。

表 1 NP、BPA 及同位素内标的质谱参数^注

Tab.1 Collections of the mass spectrometry parameters of NP, BPA and internal standards

目标物	保留时间/min	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压/V	碰撞能量/eV	离子模式
NP	6.35	219.0	147.2	120	32	Negative
			133.0*	120	30	Negative
BPA	3.72	226.8	210.7	90	30	Negative
			132.6*	90	30	Negative
BPA- D_{16} (IS)	3.63	241.2	222.7	120	15	Negative
			141.8*	120	40	Negative

注:标有*的共存物未做大允许量。

2 结果与讨论

2.1 实验条件优化

2.1.1 色谱条件的优化

根据目标化合物性质,本实验选用实验室现有的反相色谱柱进行考察,结果发现 Agilent Eclipse Plus C18 RRHD 超高效液相色谱柱 (1.8 μm , 150 mm $\times$ 3.0 mm) 能够将目标化合物实现完全基线分离,且出峰时间适中,峰形较佳。

基于 Agilent Eclipse Plus C18 RRHD 超高效液相色谱柱考察了流动相的有机相为乙腈或甲醇时对目标物分离情况的影响,结果发现甲醇-水作流动相时峰宽稍窄且基线更平稳,如图 1 所示。

这也与较多文献所报道的,甲醇用于流动相,相比于乙腈,质谱电喷雾电离效果更好的结论一致^[18]。此外,对于实际样品加标检测实验中发现使用甲醇作为流动相,相比于乙腈,目标化合物受基质干扰更小,推测是因为乙腈洗脱能力过强,不能很好将复杂的基质进行分离,基于上述考虑,最终选用甲醇作为流动相的有机相。

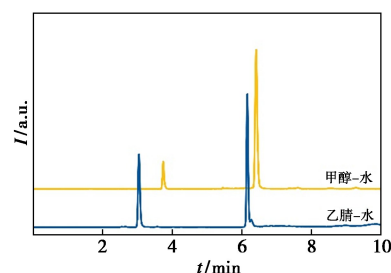


图 1 甲醇和乙腈作流动相有机相对目标物色谱峰的影响

Fig.1 Influence of methanol and acetonitrile as mobile organic phase on the chromatographic peaks of targets

为充分考察并优化流动相水相对目标化合物离子化的影响,对比了甲醇-水、甲醇-0.1%氨水、甲醇-5 mmol 甲酸铵、甲醇-0.1%甲酸 4 种不同流动相体系下壬基酚和双酚 A 的响应强度、色谱峰形及分离效果。4 种流动相体系下的色谱图如图 2 所示,甲醇-5 mmol 甲酸铵流动相体系下目标化合物离子的响应信号更强,且基线平稳、峰形较好,推测原因是 NP 和 BPA 结构中的羟基能够电离出氢离子而呈现出一定的弱酸性,流动相体系加入一定量的呈弱碱性的离子化试剂,能够促进目标化合物电离,提高其离子化效率^[19],从而提高质谱响应;此外,实验发现,在水相中添加了 0.1% 的甲酸作流动相时也使目标化合物离子获得了较好的响应,虽然从质谱电离的角度考虑, NP 和 BPA 在碱性条件下更易解离,但在色谱的

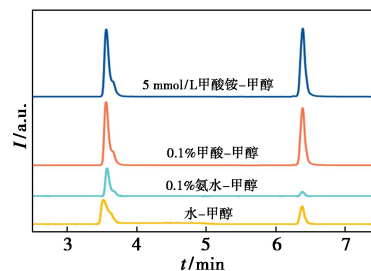


图 2 不同流动相体系下壬基酚、双酚 A 及同位素内标的总离子流图

Fig.2 TIC chromatograms profiles of NP, BPA, BPA- D_{16} in different mobile phases

分离过程中,弱酸的加入在一定程度上抑制了溶质离子化效应,减弱了 C18 色谱柱键合相表面残存硅羟基的影响和干扰,对峰形起到了较好的改善作用,使基线更平稳进而有利于提高质谱响应。

基于上述对流动相有机相和水相的考察,最终选用甲醇-5 mmol/L 甲酸铵作为本实验的流动相体系。

2.1.2 质谱参数的优化

由于酚类化合物结构中酚离子官能团带负电荷,在电喷雾电离源负离子模式下易产生较高响应,因此,本实验在 ESI-模式下进行质谱条件的建立及优化。

首先通过 SCAN 模式进行一级母离子扫描,确定壬基酚、双酚 A 及双酚 A 内标的母离子,分别为 m/z 219.0、 m/z 226.8、 m/z 241.2。随后用 Product Ion Scan 模式对其子离子进行扫描分析,分别选择丰度较高、响应强度较好的两个离子碎片作为该目标物的定量离子和辅助定性离子(表 1)。最后在 MRM 模式下通过调整和优化毛

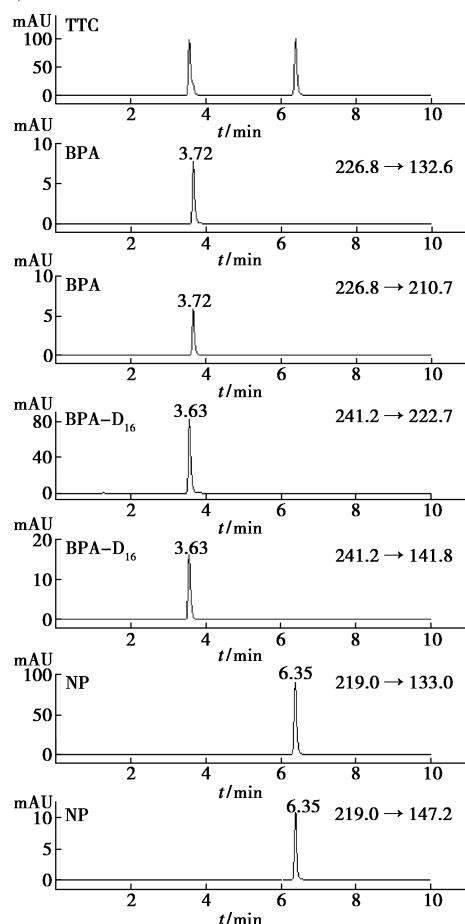


图 3 条件优化后的总离子流及 MRM 色谱图

Fig.3 Total ion flow and MRM chromatogram spectra after optimization of conditions

细管电压、碎裂电压、碰撞能量、雾化器压力、干燥气(N_2)温度及流量、鞘气温度及流量等质谱采集参数,使 NP、BPA 及 BPA- D_{16} 的母离子与特征碎片离子对响应强度最大。最终,本方法优化后的质谱采集参数见表 1,优化后的总离子流图及各目标化合物的 MRM 谱图如图 3 所示。

2.2 方法学考察

2.2.1 基质效应

基质效应(Matrix effect, ME)是在分析复杂样品时,样品中共流出的其他组分或杂质在质谱 ESI 离子源竞相离子化,导致目标化合物的离子化效果被抑制或增强^[18],进而影响其质谱响应强度。在一定的实验条件下,根据标准溶液与基质标准溶液的响应强度对基质效应进行评估。具体公式如式(1)所示。

$$ME(\%) = (A_{\text{matrix}}/A_{\text{methanol}}) \times 100\% \quad (1)$$

一般来说,ME 值介于 0.85~1.15 之间,说明不存在明显的基质效应,ME>1.15 表示基质增强,ME<0.85 则表示基质抑制^[19]。

本实验在空白样品中分别加入低(10 $\mu\text{g/L}$)、中(20 $\mu\text{g/L}$)、高(50 $\mu\text{g/L}$)3 个水平浓度的标准溶液,同时准备以甲醇为基质的同浓度标准溶液,平行进样测定 3 次。测得结果为沉积物样品中 NP 和 BPA 的平均 ME 值分别为 0.85 和 0.69。该结果表明实际样品对 NP 和 BPA 的含量测定存在一定的基质抑制效应,且 BPA 的基质抑制效应明显。为了尽量规避和降低基质效应对含量测定的影响,本实验在建立定量方法时使用内标法进行含量测定,选用具有与双酚 A 类似的物理化学性质和离子化效率的同位素内标,最大程度抵消基质效应的干扰。

2.2.2 标准曲线及方法的检出限和定量限

采用内标法进行定量,将 5 种不同浓度(5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$)的混标标准溶液在优化好的实验条件下进行测定,以目标化合物定量离子与

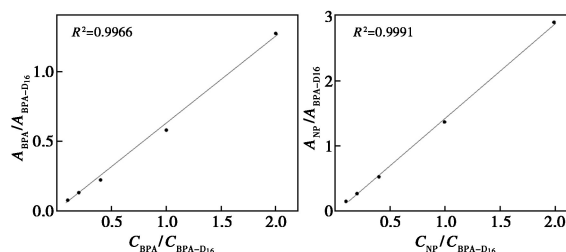


图 4 BPA 及 NP 的内标标准曲线

Fig.4 Internal standard curves of BPA and NP

内标物定量离子的峰面积比值为纵坐标,浓度比值为横坐标,绘制标准工作曲线。如图 4 所示,壬基酚、双酚 A 在上述线性范围内线性关系良好,相关系数(R^2)分别为 0.999 1 和 0.996 6,能够满足定量分析的需要。

在该实验条件下,以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)对应的质量浓度确定本方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)。结果表明 NP 及 BPA 的检出限分别为 0.14 和 0.060 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限分别为 0.47 和 0.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.2.3 加标回收率及精密度

以实际空白样品进行 3 个水平的壬基酚和双酚 A 加标回收试验,加标水平分别为 5、20 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$,每个水平进行 6 次平行试验,按照 1.2.2 前处理后,在 1.2.3 仪器条件下进行测定。其回收率结果如表 2 所示,NP 和 BPA 的平均回收率为 88.9%~105%,相对标准偏差(RSD)为 2.97%~8.20%。

表 2 方法回收率及精密度测定结果

Tab.2 Summaries of the recovery and precision measurement results of the proposed method

目标物	(n=6,%)					
	加标水平 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		加标水平 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$		加标水平 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	平均 回收率	相对标 准偏差	平均 回收率	相对标 准偏差	平均 回收率	相对标 准偏差
NP	90.1	5.11	102	4.23	98.6	2.97
BPA	88.9	8.20	105	3.77	103.0	3.46

2.2.4 决定限度($CC\alpha$)和检测容量($CC\beta$)

根据《执行关于分析方法运行和结果解释的欧盟委员会指令》(2002/657/EC)中提出的,决定限度(Decision limit, $CC\alpha$)是指大于等于此浓度,实验将有 5%的可能性出现假阴性结果;检测容量(Detection capability, $CC\beta$)则表示该目标物可以准确定量最低浓度。如果样品中该物质含量超过 $CC\beta$,表示实验将有 5%的可能性出现假阳性结果^[20]。由于目前本研究中的目标物壬基酚和双酚 A 在土壤沉积物中并未有限量标准及确证限度(Validation limit, VL)要求,因此,参考欧盟的规定并结合其他研究制定了使用本实验中 $CC\alpha$ 和 $CC\beta$ 的计算方法^[21,22]。公式如下所示。

$$CC\alpha = 0.2 \times VL + 1.64 \times SD_{0.2} \times VL \quad (2)$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1.64 \times SD_{0.2} \times VL \quad (3)$$

其中,根据相关研究中壬基酚和双酚 A 的检出水平以及毒害剂量等综合因素考虑,本次实验

把 VL 设置为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (壬基酚)^[23]和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (双酚 A)^[24], $SD_{0.2} \times VL$ 为添加 0.2 $\times VL$ 水平的分析物的样品的标准差。

经计算,本研究中壬基酚的 $CC\alpha$ 、 $CC\beta$ 分别是 9.75 和 13.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$;双酚 A 的 $CC\alpha$ 、 $CC\beta$ 分别是 5.56 和 7.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$,均在本方法准确定量的浓度范围内,因为本文所建立的方法能够适用于土壤沉积物中的统计确定性为 95%的壬基酚与双酚 A 的检测。

2.3 实际样品检测

采用本文优化得到的实验条件对采集的土壤沉积物样品进行分析。样品经 1.2.2 方法处理后,在 1.2.3 仪器条件下进行检测。结果表明该批样品中壬基酚含量范围为 7.73~36.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$,双酚 A 的含量范围是 3.30~16.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,样品浓度信息如表 3 所示。说明该采样点具有一定程度的壬基酚和双酚 A 的暴露风险,亟需进一步对其开展研究。

表 3 沉积物样品中 NP 和 BPA 含量测定结果

Tab.3 Determination results of NP and BPA content in sediment samples ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

	浓度范围	浓度中位数	浓度平均值
NP	7.73~36.9	11.35	12.52
BPA	3.30~16.3	6.68	8.03

图 5 为实际样品中目标化合物的总离子流及目标成分壬基酚和双酚 A 的 MRM 谱图。

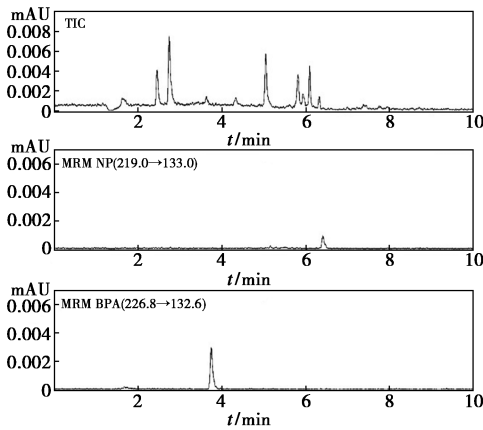


图 5 实际土壤沉积物样品的总离子流及 MRM 谱图
Fig.5 Total ion flow and MRM Spectrograms of samples in actual soil sediment

3 结论

本文建立了使用高效液相色谱质谱联用法同时检测土壤沉积物中壬基酚和双酚 A 含量的方

法,考察并优化了色谱柱、流动相、质谱参数等影响方法选择性和定量准确度的因素,并对其基质效应、决定限度和检测容量等进行了详细的分析考察。本方法前处理简单,使用内标法定量一定程度上降低了复杂土壤沉积物样品的基质效应,灵敏度、准确性高,可满足土壤沉积物中痕量壬基酚和双酚 A 等内分泌干扰物的快速高效检测要求。

参考文献:

- [1] LE G. Twenty-five years after “Wingspread”—Environmental endocrine disruptors (EEDs) and human health [J]. *Curr. Opin. Toxicol.*, 2017, **3**(4): 40-47.
- [2] LI L, YING Y, ZHANG C, et al. Bisphenol A exposure and risk of thyroid nodules in Chinese women: A case-control study [J]. *Environ. Inter.*, 2019, **126**(5): 321-328.
- [3] BANG D Y, KYUNG M, KIM M J, et al. Human risk assessment of endocrine-disrupting chemicals derived from plastic food containers [J]. *Compre. Rev. Food Sci. Food Safe.*, 2012, **11**(5): 453-470.
- [4] HIPWELL A E, KAHN L G, FACTOR-LITVAK P, et al. Exposure to non-persistent chemicals in consumer products and fecundability: A systematic review [J]. *Hum. Reprod. Update*, 2019, **25**(1): 51-71.
- [5] 向昆仑. 壬基酚、辛基酚、双酚 A 在珠江口水生动物体内的积累特征[D]. 广东: 暨南大学, 2015.
- [6] KORKMAZ A, AHBAB M, KOLANKAYA D, et al. Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats [J]. *Food Chem. Toxicol.*, 2010, **48**(10): 2 865-2 871.
- [7] ROCHESTER J R. Bisphenol A and human health: A review of the literature [J]. *Reproductive Toxicol.*, 2013, **42**(12): 132-155.
- [8] 宋杰玉, 徐婵, 李进, 等. 长江流域全氟化合物污染现状及环境基准探讨 [J]. *环境科学与技术*, 2022, **45**(9): 219-229.
- [9] 马嘉宝, 刘斯文, 魏吉鑫, 等. 持久性有机污染物环境地球化学调查研究进展与展望 [J]. *中国地质调查*, 2023, **10**(3): 117-130.
- [10] 周益奇, 许宜平, 马梅, 等. 柱前衍生/气相色谱-质谱法同时测定壬基酚方法研究 [J]. *分析测试学报*, 2005, **24**(1): 49-52.
- [11] 侯博, 范艳, 韩永辉, 等. 酸碱净化-改进的衍生化气相色谱/质谱法测定土壤中 11 种酚类化合物 [J]. *化学试剂*, 2022, **44**(1): 110-115.
- [12] CARME V, MONICA I, VICTORIA S. Two polydimethylsiloxane rod extraction methods for the sensitive determination of phenolic compounds in water samples [J]. *J. Sep. Sci.*, 2014, **37**(24): 3 706-3 713.
- [13] 郭文建, 王超, 吕怡兵, 等. 固相萃取-液相色谱/荧光检测法同时测定水中 8 种烷基酚和烷基酚聚氧乙烯醚 [J]. *环境化学*, 2018, **37**(3): 497-504.
- [14] 曾文芳, 王小芳, 虞爱旭, 等. 水中双酚 A 和辛基酚及 4-壬基酚的高效液相色谱荧光检测法 [J]. *环境与健康杂志*, 2013, **30**(11): 1 017-1 018.
- [15] 陈剑刚, 赵倩宁, 谭爱军. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定水源水中的壬基酚、辛酚和双酚 A [J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, **22**(12): 2 798-2 801.
- [16] 殷伟, 范德玲, 汪贞, 等. 天津市地表水体与沉积物中 7 种高关注酚类化合物的污染特征与生态风险分析 [J]. *生态毒理学报*, 2020, **15**(1): 230-241.
- [17] 马燕玲, 王一名, 初坤, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定葡萄酒中酚酸和酚醛类化合物 [J]. *化学试剂*, 2023, **45**(2): 141-147.
- [18] 公丕学, 廉贞霞, 薛霞, 等. UPLC-MS/MS 测定婴幼儿配方乳粉中双酚 A 和壬基酚 [J]. *食品工业科技*, 2019, **40**(17): 238-243; 250.
- [19] MENG M H, HE Z Y, XU Y P, et al. Simultaneous extraction and determination of antibiotics in soils using a QuEChERS-based method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J. Agro-Environ. Sci.*, 2017, **36**(8): 1 672-1 679.
- [20] ZHOU L J, YING G G, LIU S, et al. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr. A*, 2012, **1 244**: 123-138.
- [21] CARRETERO V, BLASCO C, PICÓ Y. Multi-class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr. A*, 2008, **1 209**(1): 162-173.
- [22] 尹志强. 动物源性食品中多族药物高通量筛查确证技术研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [23] PETERS R, BOLCK Y, RUTGERS P, et al. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr. A*, 2009, **1 216**(46): 8 206-8 216.
- [24] BOUSOVA K, SENYUVA H, MITTENDORF K. Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr. A*, 2013, **1 274**: 19-27.

基于高分辨液质联用的双标记氨基酸同位素丰度测定方法研究

赵雅梦^{1,2,3}, 徐增益^{1,2}, 范若宁^{1,2}, 解龙^{1,2}, 侯静华¹, 李良君¹, 刘建军³, 雷雯^{*1,2}

(1.上海化工研究院有限公司,上海 200062;2.上海市稳定同位素检测及应用研发专业技术服务平台,上海 200062;3.上海交通大学医学院附属仁济医院 核医学科,上海 200127)

摘要:近年来,稳定同位素标记化合物,尤其是同位素标记氨基酸在合成生物学、蛋白质组学、代谢组学等前沿科学研究中发挥着越来越重要的作用。建立了一种基于高分辨液质联用的双标记氨基酸同位素丰度检测方法,以 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸为例,考察了样品浓度、质谱扫描张数等影响因素对同位素丰度计算结果的影响,结果表明该方法具有良好的准确性和稳定性,所需样品用量少,操作简单,有望成为一种简便、通用的同位素试剂质控方法;也将为代谢组学、海洋学等同位素示踪技术应用研究提供数据支持。

关键词:双标记氨基酸;同位素丰度;高分辨液质联用仪;质量控制; $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸

中图分类号: O65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)06-0083-06

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0664

Analysis of Isotope Abundance for Double-labelled Amino Acid with Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometer ZHAO Ya-meng^{1,2,3}, XU Zeng-yi^{1,2}, FAN Ruo-ning^{1,2}, XIE Long^{1,2}, HOU Jing-hua¹, LI Liang-jun¹, LIU Jian-jun³, LEI Wen^{*1,2} (1.Shanghai Research Institution of Chemical Industry Co. Ltd., Shanghai 200062, China; 2.Shanghai Professional Technology Service Platform on Detection and Application Development for Stable Isotope, Shanghai 200062, China; 3.Department of Nuclear Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China)

Abstract: In recent years, stable isotope-labeled compounds, especially isotope-labeled amino acids are widely used in frontier scientific research such as synthetic biology, proteomics and metabolomics. An analytical method for the isotopic abundance calculation of $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N double-labeled amino acids was established based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometer (LC-HRMS). Application conditions, sample concentration and the number of scanned mass spectra were investigated. Results showed that the method had good accuracy and stability, required less sample and was easy to operate. It is expected to be a simple and generalized method for quality control of isotope reagents, and also to support frontier scientific research such as fermentation engineering and metabolomics.

Key words: double-labelled amino acid; isotope abundance; liquid chromatography-high resolution mass spectrometer; quality control; $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glycine

随着生命科学领域的迅速发展,稳定同位素试剂尤其是同位素标记氨基酸在蛋白质组学、代谢组学等前沿科学研究中发挥着越来越重要的作用^[1,2]。以稳定同位素标记氨基酸如 $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ -赖氨酸等为核心试剂的 SILAC 技术是蛋白质定量的重要手段,广泛应用于分子标志物筛选、蛋白质翻译后修饰等研究^[3-5];以 $^{13}\text{C}_5$ -谷氨酰胺、 $^{13}\text{C}_4$ -天冬氨酸等为示踪剂的代谢流分析技术可动态监测代谢物转化过程,是近年来代谢机理研究的重要工具^[6-8]。

同位素分布及丰度除了用于同位素试剂质量评价外,其作为一个重要参数在代谢组学、发酵工程等科学研究中发挥的作用也愈发重要^[9-12]。静电轨道阱、离子淌度等质谱新技术和 Python、R 语言等编程语言的发展使得同位素分布及丰度的分

析方法日益简便^[13-15]。有机质谱法是同位素分布及丰度分析的重要工具^[16-18],它是利用化合物同位素质量数的差异,通过“质量簇”等算法完成同位素丰度的计算。郑波等^[19]首次提出对质谱数据进行“质量簇”法归类处理,计算得到了 ^{13}C

收稿日期:2023-10-17;网络首发日期:2024-04-01

基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFF0701900);上海市普陀区加快发展研发服务产业专项资金项目(202210-B01-05)。

作者简介:赵雅梦(1994-),女,河南新乡人,博士,工程师,主要研究方向为同位素分析及检测技术研究。

通讯作者:雷雯, E-mail: leiweisrci@163.com。

引用本文:赵雅梦,徐增益,范若宁,等.基于高分辨液质联用的双标记氨基酸同位素丰度测定方法研究[J].化学试剂,2024,46(6):83-88。

标记的美沙西汀同位素丰度,随后基于“质量簇法”的有机质谱法发展成为同位素丰度分析的主要方法。雷雯等^[17]在此基础上,结合气质联用技术开发了针对血液等生物样品中氨基酸 ^{15}N 同位素丰度的计算方法。盛立彦等^[20]通过将“质量簇”法中的复杂计算步骤简化为线性方程式,建立了一种基于液相色谱-质谱联用仪的同位素丰度快速测定计算方法,在样品浓度 0.1 g/L 以上时,检测方法偏差 $\leq 0.2\%$ atom% D(与标准方法比),重现性 $\text{RSD} \leq 0.1\%$ 。高分辨质谱具有超高分辨率,可实现多种同位素标记模式峰的分离,近年来在同位素丰度计算方面的优势逐渐显现^[21]。田甜等^[22]建立了基于四级杆轨道阱高分辨质谱仪的氘标记化合物同位素分布与丰度检测方法,能够快速检测氘标记同位素分布和丰度,且所需试剂和分析物用量少。近年来随着前沿科学的发展,双标记化合物尤其是双标记氨基酸得以广泛应用。但目前国内双标记同位素试剂产品较少,缺乏相关的同位素丰度分析检测方法和质量评价方法。

以 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸($^{13}\text{C}_2\text{H}_5^{15}\text{NO}_2$)为例,考察样品浓度、质谱扫描次数等对同位素丰度测定的影响,建立了稳定、准确的同位素丰度计算方法,实现了 ^{13}C 和 ^{15}N 同位素丰度的同时测定。此外,还将其应用于标记形式更为复杂的 $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ -赖氨酸的同位素丰度计算,结果表明此方法具有较高的准确性和稳定性,为双标记同位素试剂的质量控制提供了一种准确、简便的方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Orbitrap Exploris 120 型高分辨液质联用仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);METTLER-XPE 型电子天平(瑞士梅特勒托利多集团);Vortex-5 型涡旋仪(中国其林贝尔仪器制造有限公司);Merck-Milipore Simolcity™型超纯水系统(德国默克公司)。

$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸(同位素丰度:99%)、 $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ -赖氨酸(同位素丰度:99.2%)(美国剑桥实验室);甲醇、甲酸(LC-MS 级,美国 Thermo Fisher 科技有限公司)。

1.2 标准溶液配制

准确称取 1.0 mg 氨基酸样品,加入 1 mL 50%甲醇水溶液,涡旋 30 s 充分混匀,配成浓度为

1.0 mg/mL 的储备液。准确移取适量储备液,用 50%甲醇水溶液稀释成 100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、800 ng/mL、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 的工作标准溶液。储备液和工作标准溶液均保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil GOLD VANQUISH 型色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm,1.9 μm);流动相:流动相 A 为甲醇,流动相 B 为含 0.1%甲酸的水溶液;洗脱条件:90% B 等度洗脱 5 min;流速:0.3 mL/min;进样量:1 μL 。

1.3.2 质谱条件

离子源:ESI;电喷雾电压(Ion Spray Voltage):3 500 V;鞘气(Sheath Gas):5.34 L/min;辅助气(Aux Gas):9.35 L/min;离子传输管温度:320 $^{\circ}\text{C}$;扫描模式:全扫描(Full Scan)模式下正离子扫描;分辨率:12 000;扫描质荷比范围: m/z 70~500。

2 结果与讨论

2.1 双标记氨基酸同位素丰度计算

在使用高分辨液质联用仪进行同位素丰度计算前,首先需先确定仪器分辨率(式(1))是否满足分离各种标记形式质谱峰的需求。对于 ^{13}C , ^{15}N 标记化合物,其质量差值最小为 1 个 ^{13}C 和 1 个 ^{15}N 的精确质量数差(0.006 3 Da),所需的最大分辨率约为 32 K(按分子量最大的氨基酸色氨酸计算)。采用相同的计算方法对 C、D 标记及 N、D 标记氨基酸进行分辨率计算,所需最大分辨率分别为 70 K 和 2.2 K,小于仪器实际分辨率(120 K),可以实现所有标记形式的分子离子峰分离,满足同位素丰度计算的首要条件。

$$R = [(m1 + m2)/2]/(|m1 - m2|) \quad (1)$$

式中, $m1, m2$ 分别代表对应化合物的质荷比。

此外,仪器质量轴偏差对于同位素丰度计算结果也具有较大影响。只有当仪器质量轴偏差小于各同位素异数体的相对同位素偏差时^[14],才能确保相邻峰之间无干扰,仪器质量轴偏差(IMD)和相对同位素偏差(ID)的计算如式(2)所示。

$$\text{IMD} = [|M_{\text{theor}} - M_{\text{max}}|/M_{\text{theor}}] \times 10^6 \quad (2)$$

式中, M_{max} 为重复进样 6~8 针中实测值与理论值偏差最大的质荷比; M_{theor} 为待测化合物的理论质荷比。

$$\text{ID} = [([MA_m B_n + H]^+ - [MA_{m-1} B_{n+1} + H]^+)/[MA_m B_n + H]^+] \times 10^6 \quad (3)$$

式中, A 和 B 分别代表被标记的两种元素; m, n 代表同位素标记个数; $[MA_m B_n + H]^+$ 和 $[MA_{m-1} B_{n+1} + H]^+$ 即为化合物中质量数最相近的两种同位素标记形式的质荷比。

根据式(3)计算可知对于 ^{13}C , ^{15}N 标记、C、D 标记及 N、D 标记氨基酸, 其最大同位素偏差分别为 30、10 和 400 $\mu\text{g/mL}$, 满足偏差小于仪器质量轴偏差 ($<5 \mu\text{g/mL}$) 的要求, 可参照 HG/T 5942—2021 标准^[21], 直接根据双标记氨基酸各同位素的信号强度进行丰度计算, 如式(4)所示。

$$E = \sum (n \cdot x_n) / n \quad (4)$$

式中, n 为标记化合物同位素标记个数; x_n 为标记化合物中对应标记个数的同位素分布百分比。

尽管如此, 在每次进样前仍需使用校正液对质量轴进行校正, 确保仪器质量轴稳定且仪器偏差小于各同位素异数体的相对同位素偏差。

2.2 同位素丰度分析方法研究

以 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸为例, 分别对样品浓度, 质谱扫描张数等可能影响同位素丰度检测结果的因素进行考察, 确定同位素标记氨基酸样品的最佳检测条件; 通过多次进样分析等对方法的准确性和稳定性进行考察。

2.2.1 LC-HRMS 谱图分析

在正离子模式下对 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸进行液质联用分析, 质谱图如图 1 所示, 由于双标记化合物可能存在未完全标记的情况, 因此在 ESI⁺ 质谱图中可能存在 $[^{13}\text{C}_2\text{H}_5^{15}\text{NO}_2 + \text{H}]^+$ 、 $[^{13}\text{CCH}_3^{15}\text{NO}_2 + \text{H}]^+$ 、 $[^{13}\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2 + \text{H}]^+$ 、 $[^{13}\text{CCH}_3\text{NO}_2 + \text{H}]^+$ 、 $[\text{C}_2\text{H}_5^{15}\text{NO}_2 + \text{H}]^+$ 、 $[\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2 + \text{H}]^+$ 这 6 种分子离子峰, 其精确质荷比可通过软件或原子精确质量计算。根据化合物的质谱图, 结合同位素丰度的计算方法即可完成同位素丰度的计算。

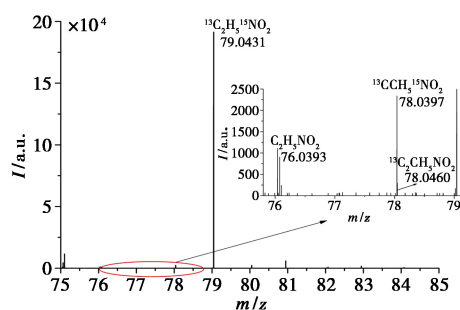


图 1 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸质谱图

Fig.1 Mass spectrum of $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glycine

2.2.2 峰面积/峰强度计算对比

由式(4)可知同位素丰度是由同位素分布百分比和标记个数计算得到的, 峰面积和峰强度均可代表化合物的质谱响应, 进而得到不同同位素

标记模式分子离子峰的百分比用于同位素丰度的计算, 不同方式的计算结果可能存在较大差异, 因此考察了峰面积和峰强度两种不同标记形式百分比计算形式下双标记甘氨酸的同位素丰度, 重复测量 3 次考察计算方法的稳定性。

表 1 以峰面积和峰强度计算 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸同位素丰度的结果对比

Tab.1 Comparison of $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glycine isotope abundances calculated as peak area and peak intensity

检测次数	计算依据	
	峰强度	峰面积
1	98.93	99.04
2	99.07	99.18
3	99.26	98.99
同位素丰度/(atom%)	99.08	99.07
相对标准偏差($n=3$)/%	0.14	0.08

结果如表 1 所示, 以峰强度计算得到的同位素丰度为 99.08%, 相对标准偏差为 0.14%, 以峰面积计算得到的同位素丰度为 99.07%, 相对标准偏差为 0.08%。两种计算方式得到的结果基本一致, 相对标准偏差均小于 0.2%, 说明稳定性良好。以峰强度计算简单便捷, 不需要对不同形式的分子离子峰进行提取、积分等步骤。因此, 后续实验中同位素丰度计算以峰强度为计算依据。

2.2.3 样品浓度

样品浓度是影响同位素丰度检测准确性和稳定性的关键因素, 选择合适的样品浓度十分重要。当样品浓度较低时, 部分标记形式的分子离子峰可能达不到检测阈值, 从而导致同位素丰度计算结果偏低; 而过高的样品浓度则容易造成质谱污染, 影响后续样品检测。分别对 0.1、0.2、0.5、0.8、1.2 $\mu\text{g/mL}$ 的 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸进行液质联用分析, 重复测量 3 次, 根据同位素丰度值及相对标准偏差确定样品的最佳分析浓度。

如图 2 和表 2 所示, 当 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 时, 计算得到的同位素丰度值为 98.21%, 相对标准偏差为 0.28%, 这可能是由于样品浓度较低时, 含量较低的未完全标记化合物可能存在检测不到的情况, 从而影响同位素丰度的准确计算; 随着样品浓度增加, 同位素丰度计算值也随之增加; 当浓度增加至 1 $\mu\text{g/mL}$ 时, 同位素丰度计算值趋于稳定 (99.03%), 相对标准偏差小 (0.01%), 且与试剂标示值 (同位素丰度: 99%) 基本一致。因此后续实验选择样品浓度为

1 $\mu\text{g/mL}$ 。

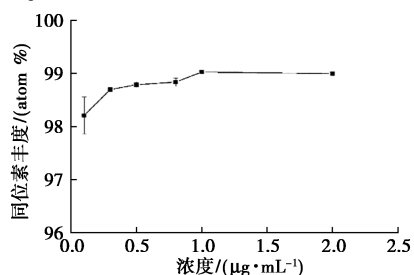


图 2 不同浓度下 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸同位素丰度

Fig.2 Isotope abundance of $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glycine under different concentration

表 2 不同浓度下 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸同位素丰度值及其相对标准偏差

Tab.2 Isotopic abundance and RSD of $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glycine at different concentration

样品浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	同位素丰度值/ (atom%)	相对标准偏差 ($n=3$)/%
0.1	98.21	0.28
0.3	98.70	0.03
0.5	98.79	0.04
0.8	98.84	0.07
1.0	99.03	0.01
2.0	99.00	0.05

2.2.4 质谱图扫描张数

质谱图扫描张数对于丰度计算结果准确性也可能存在一定影响,对浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸进行同位素丰度分析,分别取包含峰顶点在内的不同时间窗口,如图 3 中所标识窗口,质谱图叠加进行同位素丰度计算,结果见表 3,不同时间窗口下同位素丰度计算值相对标准偏差为 0.02%,平均丰度为 99.08%,说明质谱图扫描张数对同位素丰度计算值的影响不大。田甜等^[22]研究表明,当质谱图分析数量为 10 时,结果的精密度和准确度可满足同位素丰度计算要求。因此本文中,质谱图选取条件为在包含峰顶点在内的时间窗口内随机取 10 张或以上质谱图进行叠加分析。

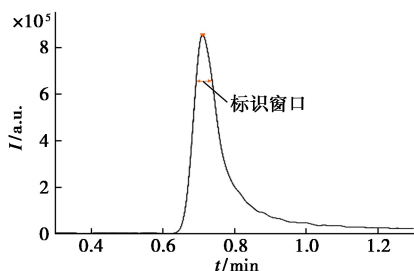


图 3 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸提取离子流图

Fig.3 Extraction ion chromatography of $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glycine

表 3 不同时间窗口下 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸丰度值

Tab.3 Isotope abundance of $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glycine within different time windows

	时间窗口/min	扫描张数	同位素丰度值/(atom%)
1	0.74	1	99.06
2	0.73~0.75	5	99.06
3	0.71~0.76	15	99.08
4	0.69~0.78	21	99.11
5	0.70~0.81	26	99.09
平均值/(atom%)			99.08
相对标准偏差/%			0.02

2.2.5 分子离子峰信号响应

各标记形式化合物的质谱峰强度与同位素丰度计算值的准确性密切相关,而质谱仪的质量歧视效应^[23]可能会导致某些标记形式化合物的分子离子峰强度降低或未检出,从而影响同位素丰度值计算。由于质量歧视效应客观存在且无法被消除,因此拟通过对 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸天然同位素(即 $M+1$, $M+2$)分子离子峰的理论峰强度占比和实测值的比较,间接考察了高分辨的质量歧视效应。如表 4 所示,理论同位素峰强度占比和实测值的偏差 $<5\%$,间接说明质谱仪器的质量歧视效应较小,对于同位素丰度的计算影响较小^[24]。因此,在同位素丰度计算时可忽略质量歧视效应,直接利用公式进行丰度计算。

表 4 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸天然同位素峰强度对比

Tab.4 Comparison of natural isotope peak intensities of $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glycine

精确 质量数	理论峰 强度	理论峰强度 占比/%	实测峰 强度	实测峰强度 占比/%	偏差/ %
79.043 1	100	99.10	100	99.14	—
80.048 8	0.62	0.61	0.59	0.59	3.28
81.047 8	0.29	0.29	0.28	0.28	3.45

2.2.6 方法精密度

对浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸重复进样 6 次进行同位素丰度计算考察方法的稳定性。结果如表 5 所示,计算得到 ^{13}C 丰度为 98.88%, ^{15}N 丰度为 99.30%, 相对标准偏差(RSD)均为 0.06%,总同位素丰度为 99.02%, RSD 为 0.05%,说明该方法精密度良好。

3 方法应用

为考察方法的普适性,还对标记形式更为复杂的 $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ -赖氨酸进行丰度计算。如表 6 所示,重复进样 3 次得到 ^{13}C 平均丰度为 99.17%,

表 5 $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -甘氨酸丰度值计算

Tab.5 Isotope abundance of $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glycine

分析次数	总丰度/ (atom%)	$^{13}\text{C}/$ (atom%)	$^{15}\text{N}/$ (atom%)
1	99.04	98.87	99.36
2	99.05	98.91	99.33
3	99.02	98.89	99.27
4	98.96	98.82	99.23
5	99.10	98.98	99.34
6	98.97	98.83	99.26
丰度平均值/(atom%)	99.02	98.88	99.30
相对标准偏差/%	0.05	0.06	0.06

^{15}N 平均丰度为 99.31%, 总同位素丰度为 99.21%, 与试剂同位素丰度标示值(同位素丰度值>99.2%)基本一致, 相对标准偏差<0.04%, 进一步说明方法具有较高的准确性和稳定性, 适用于双标记氨基酸的丰度计算, 也将为双标记同位素试剂提供了一种新的质量控制方法。

表 6 $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ -赖氨酸丰度值计算

Tab.6 Isotope abundance of $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ -Lysine

	总丰度/ (atom%)	$^{13}\text{C}/$ (atom%)	$^{15}\text{N}/$ (atom%)
1	99.20	99.16	99.32
2	99.19	99.17	99.27
3	99.23	99.19	99.34
丰度平均值/(atom%)	99.21	99.17	99.31
相对标准偏差/%	0.02	0.04	0.02

4 结论

本文建立了基于高分辨液质联用的双标记氨基酸同位素丰度检测方法;通过考察样品浓度、扫描张数、信号响应等条件,对同位素丰度的分析方法进行了系统研究,结果表明该方法具有良好的准确性和稳定性,适用于双标记氨基酸的丰度测定。此外,该方法所需样品用量少,无需衍生化等前处理,操作简便,可同时得到多种同位素丰度,对于稳定同位素试剂质量控制、同位素示踪技术研究等应用具有一定的指导作用。

参考文献:

[1] LIANG L, SUN F, WANG H, et al. Metabolomics metabolic flux analysis and cancer pharmacology [J]. *Pharmacol. Therapeut.*, 2021, **224**: 107-127.

[2] JANG C, CHEN L, RABINOWITZ J D. Metabolomics and isotope tracing [J]. *Cell*, 2018, **173**(4): 822-837.

[3] MULLEN A R, WHEATON W W, JIN E S, et al. Reduc-

tive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria [J]. *Nature*, 2012, **481**(7381): 385-388.

[4] KIM Y E, KIM E K, SONG M J, et al. SILAC-based quantitative proteomic analysis of oxaliplatin-resistant pancreatic cancer cells [J]. *Cancers*, 2021, **13**(4): 724.

[5] CHOI S, ENGELKE R, GOSWAMI N, et al. Proteomic profiling of metformin effects in 3T3-L1 adipocytes by SILAC-based quantification [J]. *Proteomics*, 2022, **22**(11/12): 2100-2106.

[6] KAMPHORST J J, CHUNG M K, FAN J, et al. Quantitative analysis of acetyl-CoA production in hypoxic cancer cells reveals substantial contribution from acetate [J]. *Cancer Metabol.*, 2014, **2**(1): 23.

[7] POILLET-PEREZ L, XIE X, ZHAN L, et al. Autophagy maintains tumour growth through circulating arginine [J]. *Nature*, 2018, **563**(7732): 569-573.

[8] LEBOEUF S E, WU W L, KARAKOUSHI T R, et al. Activation of oxidative stress response in cancer generates a druggable dependency on exogenous non-essential amino acids [J]. *Cell Metabol.*, 2020, **31**(2): 339-350.

[9] WANG Y, WONDISFORD F E, SONG C, et al. Metabolic flux analysis-linking isotope labeling and metabolic fluxes [J]. *Metabolites*, 2020, **10**(11): 447-467.

[10] WANG R, YIN Y, LI J, et al. Global stable-isotope tracing metabolomics reveals system-wide metabolic alterations in aging *Drosophila* [J]. *Nat. Commun.*, 2022, **13**(1): 3518.

[11] FERNANDEZ-GARCIA J, ALTEA-MANZANO P, PRANZINI E, et al. Stable isotopes for tracing mammalian-cell metabolism in vivo [J]. *Trend. Biochem. Sci.*, 2020, **45**(3): 185-201.

[12] DUCKER G S, CHEN L, MORSCHER R J, et al. Reversal of cytosolic one-carbon flux compensates for loss of the mitochondrial folate pathway [J]. *Cell Metabol.*, 2016, **23**(6): 1140-1153.

[13] MILLARD P, DELEPINE B, GUIONNET M, et al. IsoCor: Isotope correction for high-resolution MS labeling experiments [J]. *Bioinformatics*, 2019, **35**(21): 4484-4487.

[14] KNOLHOFF A M, CALLAHAN J H, CROLEY T R. Mass accuracy and isotopic abundance measurements for HR-MS instrumentation: Capabilities for non-targeted analyses [J]. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, 2014, **25**(7): 1285-1294.

[15] LLUFRIO E M, CHO K, PATTI G J. Systems-level analysis of isotopic labeling in untargeted metabolomic data

- by X^{13} CMS [J]. *Nat. Protocol*, 2019, **14**(7): 1 970-1 990.
- [16] 杜晓宁, 宋明鸣, 赵诚. 质谱检测用同位素 ^{15}N 标记样品的处理方法[J]. 原子能科学技术, 2009, **43**(z1): 59-63.
- [17] 雷雯, 侯捷, 张维冰, 等. 血液中 ^{15}N 标记氨基酸同位素丰度[J]. 分析化学, 2015, **43**(10): 1 465-1 471.
- [18] LI J, PANG Z, YANG G M, et al. Million-year-old groundwater revealed by krypton-81 dating in Guanzhong Basin [J]. *Chinese Sci. Bull.*, 2017, **62**(17): 1 181-1 184.
- [19] 郑波, 杜晓宁, 张维冰, 等. 美沙西汀-甲氧基- ^{13}C 的同位素丰度和化学纯度表征[J]. 山东化工, 2013, **42**(5): 27-31.
- [20] 盛立彦, 李美华, 杜晓宁. 敌百虫- D_6 同位素丰度的快速测定及计算[J]. 同位素, 2020, **33**(5): 304-311.
- [21] 范若宁, 赵雅梦, 王储尧, 等. 一种基于高分辨液质联用仪的 ^{13}C 标记葡萄糖同位素丰度检测方法[J]. 化学试剂, 2023, **45**(8): 122-126.
- [22] 田甜, 刘书好, 李双青, 等. 高分辨质谱测定氘标记化合物同位素分布与丰度的方法研究[J]. 分析化学, 2021, **49**(4): 563-570.
- [23] KNOLHOFF A M, CALLAHAN J H, CROLEY T R. Mass accuracy and isotopic abundance measurements for HR-MS instrumentation: Capabilities for non-targeted analyses [J]. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, 2014, **25**(7): 1 285-1 294.
- [24] KIND T, FIEHN O. Seven golden rules for heuristic filtering of molecular obtained by accurate mass spectrometry [J]. *BMC Bioinforma*, 2007, **8**(105): 1 471-1 491.

基于高光谱技术的穿心莲药材中穿心莲内酯类成分检测研究

肖丹¹, 王思曼¹, 张悦¹, 刘地发², 郝庆秀^{1,3}, 白瑞斌^{*1,3}, 杨健^{*1,3}

(1. 中国中医科学院 中药资源中心, 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700;

2. 江西青峰药业有限公司, 江西 赣州 341000; 3. 江西省道地药材质量评价研究中心, 江西 赣江新区 330000)

摘要: 基于高光谱技术结合化学计量学, 建立不同种质穿心莲药材中穿心莲内酯类成分含量的检测方法。采集穿心莲样品的高光谱信息, 获得原始光谱数据 (Raw Data)。采用一阶导数 (D1)、二阶导数 (D2)、SG 平滑 (SG)、乘性散射校正 (MSC) 对 Raw Data 预处理, 结合偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 建立分类模型, 结合偏最小二乘回归 (PLSR)、反向传播神经网络 (BPNN)、随机森林回归 (RFR) 建立回归模型。应用连续投影算法 (SPA) 简化模型。不同种质的穿心莲最佳分类模型为 D1-PLS-DA。穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯 4 种穿心莲内酯类化合物总含量的最佳回归模型分别为 SG-PLSR、MSC-PLSR、Raw Data-SPA-BPNN、MSC-SPA-BPNN 和 Raw Data-PLSR。应用高光谱技术可实现穿心莲品质的快速准确检测。

关键词: 高光谱成像技术; 化学计量学; 穿心莲; 预测模型; BP 神经网络; 偏最小二乘法; 随机森林回归

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283 (2024) 06-0089-10

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0018

Research on the Detection of Andrographolide Components in *Andrographis paniculata* Based on Hyperspectral Technology XIAO Dan¹, WANG Si-man¹, ZHANG Yue¹, LIU Di-fa², HAO Qing-xiu^{1,3}, BAI Rui-bin^{*1,3}, YANG Jian^{*1,3} (1. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Jiangxi Qingfeng Pharmaceutical Co. Ltd., Ganzhou 341000, China; 3. Evaluation and Research Center of Daodi Herbs of Jiangxi Province, Ganjiang New Area 330000, China)

Abstract: Based on hyperspectral technology combined with chemometrics, to establish a method for detecting the content of andrographolide components in different germplasm of *Andrographis paniculata*. The hyperspectral information of *Andrographis paniculata* samples was collected to obtain the raw spectral data (Raw Data). The Raw Data was preprocessed using first derivative (D1), second derivative (D2), savitzky-golay (SG), multiplicative scatter correction (MSC), and a classification model was established using partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Regression models were established using partial least squares regression (PLSR), back propagation neural network (BPNN), and random forest regression (RFR). The application of successive projection algorithm (SPA) simplified the model. The optimal classification model for different germplasm of *Andrographis paniculata* is D1-PLS-DA. The optimal regression models for andrographolide, neoandrographolide, deoxyandrographolide, dehydroandrographolide, and total content of the four andrographolide components mentioned are SG-PLSR, MSC-PLSR, Raw Data-SPA-BPNN, MSC-SPA-BPNN, and Raw Data-PLSR, respectively. The application of hyperspectral technology can achieve rapid and accurate detection of the quality of *Andrographis paniculata*.

Key words: hyperspectral imaging technology; chemometric; *Andrographis paniculata*; prediction model; backpropagation neural network; partial least squares method; random forest regression

穿心莲为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees 的干燥地上部分^[1]。目

前, 商用穿心莲药材的栽培地区主要集中在广东、福建、广西, 年产量占全国 90% 以上^[2]。但由于

收稿日期: 2024-01-08; 网络首发日期: 2024-03-29

基金项目: 中药全产业链质量技术服务项目 (2022-230-221); 江西省主要学科科学技术带头人培养计划-领军人才项目 (20225BCJ22018); 江西省创新联合体协同攻关项目 (20224BBG72001); 中国中医科学院基本科研业务费优秀青年科技人才培养专项项目 (ZZ16-YQ-040); 中国中医科学院中药资源中心自主选题研究项目 (ZZXT202208)。

作者简介: 肖丹 (2002-), 女, 苗族, 湖南邵阳人, 硕士生, 主要研究方向为中药品质评价研究。

通讯作者: 杨健, E-mail: yangchem2012@163.com; 白瑞斌, E-mail: bairuibin2022@163.com。

引用本文: 肖丹, 王思曼, 张悦, 等. 基于高光谱技术的穿心莲药材中穿心莲内酯类成分检测研究[J]. 化学试剂, 2024, 46(6): 89-98。

自然留种繁育、种植环境限制以及种植技术落后等原因,出现成分含量不稳定、不同批次的产品质量差异较大等问题,因此,种质资源的分类十分必要。

二萜内酯类成分是穿心莲的主要功效成分,具有抗炎、抗感染、抗肿瘤等药理作用^[3,4]。穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯占总二萜内酯类的 75% 以上^[4],为《中国药典(2020 版)》规定的定量成分^[1]。目前针对以上 4 种活性物质的含量测定主要采用高效液相色谱法和超高效液相色谱法^[5-7]。这些检测方法虽然选择性好、灵敏度高,但存在检测成本高、时间长、试剂消耗量大等缺点。因此,建立一种快速、准确、高通量、无污染的检测方法十分必要。

光谱检测技术是一种快速、无损的检测方法,它根据样品的发射、吸收、散射光谱谱系特征来鉴别物质、测量物质含量信息。常见的光谱技术有拉曼光谱技术、近红外光谱技术和高光谱成像技术等,其中,近红外光谱技术是一种行之有效的农产品和食品质量分析技术,它利用产品中氢键(如 C—H、O—H 和 N—H)的伸缩和弯曲振动来获取信息。赖秀娣等^[8]运用近红外光谱技术和化学计量学方法,建立了穿心莲中穿心莲内酯的含量预测模型,但仅测量穿心莲内酯的含量不足以反映穿心莲的品质,而且传统的近红外方法只从样品的一个点收集光谱数据,同时检测多个目标仍具有挑战性。

高光谱成像技术是一种非接触式的光谱分析方法,可以在光谱范围内采集大量的连续光谱数据,以获取中药材表面感兴趣区域的光谱信息。化学计量学是借助统计学、数学等学科方法探索化学系统的测量值与系统状态之间的联系。高光谱成像技术结合化学计量学可实现对中药材的定性判别和定量分析。张璐等^[9]运用高光谱成像技术,结合化学计量学,建立了 D2-PLS-DA 模型,实现了对不同产地酸枣仁的鉴别;史磊^[10]基于高光谱成像技术,运用最小二乘支持向量回归模型和优化算法,实现了对三七皂苷含量的检测。本研究基于高光谱成像技术,结合化学计量学方法,建立不同种质穿心莲药材的分类模型和穿心莲中穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯以及上述 4 种穿心莲内酯类化合物总含量的回归模型,为穿心莲品质的快速检测提

供新方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

ACQUITY UPLC™ I-Class 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);HySpex 系列高光谱成像光谱仪(挪威 Norsk Elektro Optikk 公司)。

对照品穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯(98%,北京倍特仁康生物医药科技有限公司);乙腈(色谱纯,美国默克公司);蒸馏水(北京屈臣氏蒸馏水有限公司)。

1.2 穿心莲样品

本研究团队前期基于系统选育方法从不同种质来源的穿心莲中选育出 6 个品系,按表型性状差异分别命名为 A-1~A-6,全部品系移栽至广东湛江栽培基地。所有样品于 2022 年 9 月采自广东湛江,包括 A-1(30 批次)、A-2(50 批次)、A-3(31 批次)、A-4(68 批次)、A-5(19 批次)和 A-6(11 批次)共 209 批次。所有样品经中国科学院中药资源中心杨健副研究员鉴定为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 的干燥茎叶,样品收集后常温保存并研磨成粉末,过 100 目筛,粉末密封在聚乙烯袋内并在 4℃ 下冷藏。各粉末样品用于高光谱数据采集,并按 7:3 的比例将样品随机分成训练集和预测集用于后续建模分析。

1.3 高光谱成像系统

高光谱成像设备,主要由 2 个高光谱相机、2 个 150 W/12 V 卤钨灯、1 个 CCD 探测仪、1 个移动平台和仪器自带计算机与内置软件组成。高光谱相机为光谱范围为 410~990 nm 的 SN0605 VNIR 可见-近红外相机和光谱范围为 950~2 500 nm 的 N3124 SWIR 短波红外相机,相机镜头的光谱分辨率为 6 nm,与样品的距离为 25 cm。平台移动速度为 1.5 nm/s。

1.4 高光谱图像采集、校正、兴趣区域数据提取

取约 2 g 穿心莲样品粉末于 35 mm×12 mm 一次性培养皿中,振荡,使粉末表面平整,均匀分布。依次取 5~10 个样品置于黑色水平移动平台上,同时放置 Teflon 白板,扫描,获得穿心莲粉末光谱数据。扫描过程中,SN0605 VNIR 可见-近红外相机镜头积分时间为 4 000 μs,帧时间为 19 000;N3124 SWIR 短波红外相机镜头积分时间

为 5 400 μs , 帧时间为 49 535。

为了消除图像采集过程中光源分布不均匀、照射不稳定和相机镜头暗电流等因素对样品数据的影响,需用仪器自带 RAD 校正软件对原始高光谱图像进行 RAD 校正。随后进行黑白校正,校正公式如(1)所示。

$$R = (R_{\text{raw}} - R_d) / (R_w - R_d) \quad (1)$$

式中, R 为校正后的光谱数据; R_{raw} 为原始光谱数据; R_w 为从反射率为 99% 的白板获得的白色参考数据; R_d 为关灯并遮挡相机镜头获得的暗参考数据。

校正后,采用 ENVI 5.3 软件进行兴趣区域提取,兴趣区域内的平均相对反射率即样品的 Raw Data。

1.5 含量测定

穿心莲样品中穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯含量参照《中国药典(2020 版)》^[1] 穿心莲项下含量测定方法并做适当改进。采用超高效液相色谱法,以 ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 为色谱柱;以水(A)-乙腈(B)为流动相,进行梯度洗脱(0~7.5 min, 20% B→25% B; 7.5~9 min, 25% B→28% B; 9~15 min, 28% B→32% B; 15~16 min, 32% B→35% B; 16~17 min, 35% B→90% B; 17~19 min, 90% B; 19~20 min, 90% B→20% B; 20~22 min, 20% B); 流速为 0.3 mL/min; 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 1.0 μL , 检测波长为 205 nm。

1.6 光谱数据预处理

为了减少背景、噪声以及其他因素引起的误差,提高模型预测能力及稳定性,采用成性散射校正(Multiplicative scatter correction, MSC)、一阶导数(First derivative, D1)、二阶导数(Second derivative, D2)、SG 平滑(Savitzky-Golay, SG)4 种方法对光谱数据进行预处理。

D1、D2 属于基线校正,可以扣除仪器背景或漂移对信号的影响,D1 用来扣除斜线和曲线背景;D2 可以提高光谱分辨率;MSC 属于散射校正,用来消除颗粒分布不均匀及颗粒大小差异产生的散射现象和光程变换对漫反射的影响;SG 属于平滑处理,对光谱曲线进行平滑,消除光谱信号中的随机噪声,提高样本信号的信噪比^[11]。

1.7 模型的建立

采用偏最小二乘判别分析(Partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)对不同种质

的穿心莲进行分类鉴别;采用偏最小二乘回归(Partial least squares regression, PLSR)、反向传播神经网络(Back propagation neural network, BPNN)、随机森林回归(Random forest regression, RFR)对穿心莲化学成分含量进行预测。

BPNN 是一种常用的人工神经网络模型,由输入层、隐藏层和输出层等 3 个或多个神经元组成。在分析过程中,每个神经元接收来自上一层神经元的输入,并通过激活函数将其转换为输出。通过多次迭代训练,调整神经元之间的权重,使得实际值与预测值尽可能接近^[12]。PLSR 是一种多元回归方法,PLS-DA 是一种分类方法,它们都是基于偏最小二乘法的统计分析技术。PLSR 模型能很好地解决自变量之间多重自相关性的问题,能提取出相对系统解释能力最强的变量,尽可能地排除无作用的信息^[13]。RFR 是一种基于 Bagging 技术和决策树的算法,对于某个实测样本,可构建含 K 棵决策树的 RFR 模型,每棵决策树分别输出预测结果,取 K 棵树的预测均值作为最终结果。RFR 模型并行建立 K 棵树,对于大样本数据集仍能快速处理^[14]。

1.8 模型的评估

采用模型准确率以及混淆矩阵对分类模型的性能进行评价。混淆矩阵是分类模型预测结果的评价方式,具体的评价指标包括准确率(Accuracy)、灵敏度(Sensitivity)和特异性(Specificity)^[15],各指标的计算公式如(2)所示:

$$\begin{aligned} \text{Accuracy} &= (\text{TP} + \text{TN}) / (\text{TP} + \text{FN} + \text{FP} + \text{TN}) \\ \text{Sensitivity} &= \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN}) \\ \text{Specificity} &= \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP}) \end{aligned} \quad (2)$$

式中,TP 为真阳性样本数;TN 为真阴性样本数;FP 为假阳性样本;FN 为假阴性样本数。

采用训练集和预测集的决定系数(Coefficient of determination, R^2)、均方根误差(Root mean squares error, RMSE)和预测集剩余预测残差(Residual predictive deviation, RPD)评估回归模型的性能。 R^2 越接近 1, RMSE 越小, RPD 越大,模型的性能越好^[16]。若 $0.60 < R^2 < 0.80$, $1.50 < \text{RPD} < 2.50$, 表明该模型可以用于预测;若 $0.81 < R^2 < 0.90$, $2.51 < \text{RPD} < 3.0$, 表明该模型具有良好的预测性能;若 $R^2 > 0.90$, $\text{RPD} > 3.0$, 表明该模型具有优异的预测能力。

1.9 数据处理及分析软件

图像校正软件为高光谱成像系统 HySpex

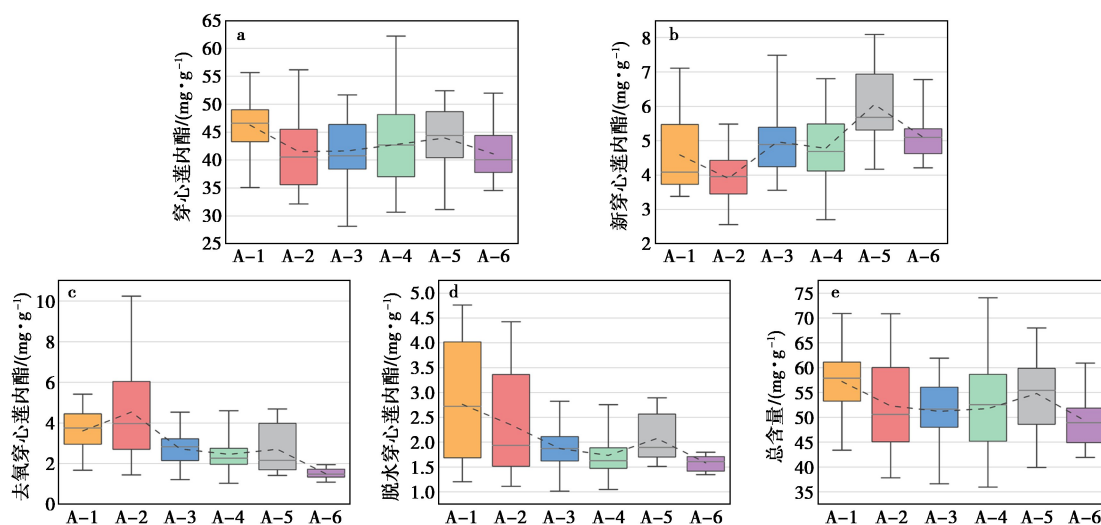
RAD 软件(挪威 Norsk Elektro Optikk 公司),黑白板校正和兴趣区域提取软件为 ENVI 5.3,光谱数据预处理及预测模型构建软件为 Matlab 2020a,脚本均为课题组自编。

2 结果与讨论

2.1 不同种质的穿心莲化学成分含量分析

不同种质的穿心莲样品含量如图 1 所示,穿心莲内酯的含量最高,范围为 28.16~62.19 mg/g,脱水穿心莲内酯的含量最低,范围为 1.01~4.76 mg/g,新穿心莲内酯和去氧穿心莲内酯的含量范

围分别为 2.56~8.09 mg/g、1.03~10.25 mg/g。不同种质的穿心莲样品穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量有差异,穿心莲内酯平均含量最高的为 A-1,其余种质的平均含量相差不大;新穿心莲内酯平均含量最高的为 A-5,最低的为 A-2;去氧穿心莲内酯中 A-1、A-2 的平均含量较高,A-6 的最低;脱水穿心莲内酯中 A-1、A-2 的平均含量高于其余种质的。就穿心莲内酯类总含量而言,A-1 的平均含量最高,A-5 次之,A-2、A-3 和 A-4 的相差不大,A-6 最低。



图中折线为化学成分含量的平均值连接线

a. 穿心莲内酯; b. 新穿心莲内酯; c. 去氧穿心莲内酯; d. 脱水穿心莲内酯; e. 穿心莲内酯类总含量

图 1 不同种质穿心莲样品化学成分含量的箱式图

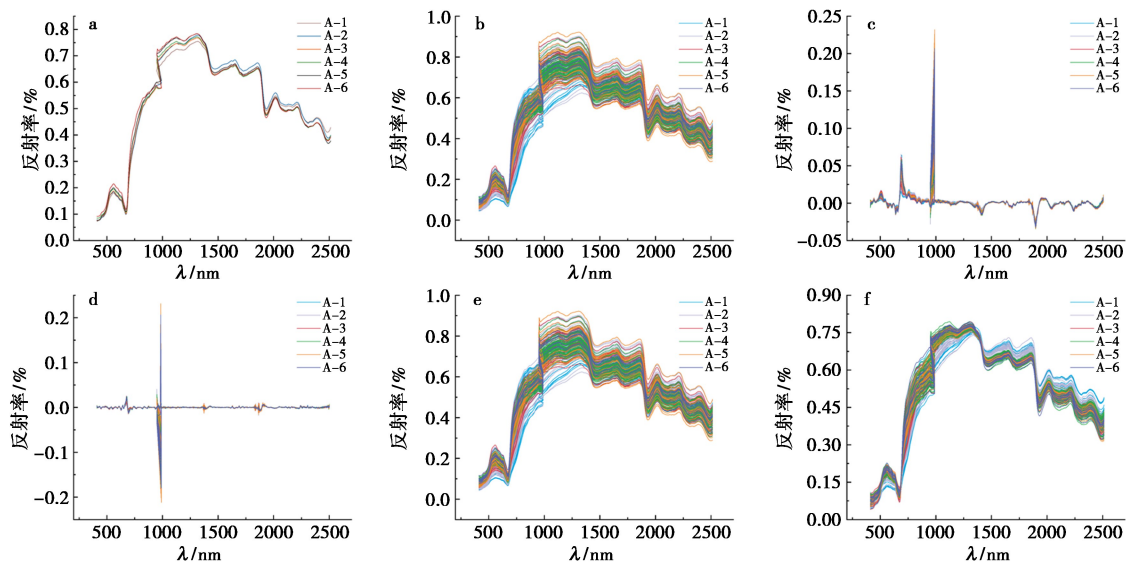
Fig.1 Box plot of chemical composition content in samples of different germplasms of *Andrographis paniculata*

2.2 光谱曲线分析

对不同种质的穿心莲样品 Raw Data 求平均值,绘制平均光谱曲线图(图 2a)。从总体上看,不同种质的穿心莲平均光谱曲线变化趋势较为相似。光谱曲线在 550 nm 处形成吸收峰,在 670~1 300 nm 内呈上升趋势,尤其是 670~960 nm,反射率急剧增大,在 1 300~2 500 nm 范围内呈波动下降趋势,有明显的吸收峰和吸收谷。对不同峰值进行归因,550 nm 附近的吸收峰对应 O—H 的第五泛音;840 nm 附近的吸收与 C=C—H 中 C—H 的第三泛音有关;970 nm 附近的吸收由 O—H 的第二泛音引起;1 120 nm 处的吸收峰和 1 300~1 400 nm 区域的吸收与 C—H 的第二拉伸泛音有关;1 470 nm 处的吸收对应 O—H 的第一泛音;1 600~1 700 nm 处的吸收与 C—H 的第一

泛音有关;1 950~2 000 nm 范围的吸收与酯键中 C=O 的第二拉伸泛音有关;在 2 000 nm 处的吸收峰与 O—H 伸缩振动和弯曲振动有关,2 200 nm 处是 C—H 和 C—O 的联合吸收峰;2 370 nm 附近的吸收对应 C—H 的第二泛音^[17-20]。不同种质的穿心莲吸收峰的位置具有较为相似的特征,但吸收强度存在差异,说明不同种质的穿心莲化学成分种类差异不大,但含量存在差异。

对 Raw Data 和预处理后的光谱数据绘图,结果见图 2b~2f。原始光谱图(图 2b)谱线重叠,基线漂移,难以直接观察吸收峰。经 D1、D2 预处理后,光谱曲线基线基本水平,吸收峰特征明显,尤其是 D2 预处理后,但也引入了噪声。与图 2b 相比,图 2e 光谱曲线更平滑,图 2f 光谱曲线间距明显缩小。



a.平均光谱;b.原始光谱;c.D1 预处理;d.D2 预处理;e.SG 预处理;f.MSC 预处理

图 2 不同种质穿心莲的平均光谱曲线、原始光谱曲线和预处理光谱曲线

Fig.2 Average spectral curve,original spectral curve,and preprocessed spectral curve of different germplasms of *Andrographis paniculata*

2.3 不同种质的穿心莲分类性能评估

将穿心莲样品 Raw Data 经 D1、D2、SG、MSC 预处理后,建立 PLS-DA 模型,结果见表 1。Raw Data 和不同预处理后的光谱数据建立的模型训练集和预测集准确率均大于 90%,经 D1、D2、MSC 预处理后,模型的训练集和预测集准确率分别提高 4.1%和 4.6%、4.1%和 2.7%、0.2%和 2.7%。D1-PLS-DA 模型的性能最好,预测结果的混淆矩阵如图 3 所示,不同种质的灵敏度均大于 90%,精确率均大于 75%。因此,对于不同种质的穿心莲样品,利用高光谱技术,结合有效的预处理方法,可建立 PLS-DA 模型加以鉴别。其原因可能是不同种质的穿心莲药材穿心莲内酯类成分含量差异较大。

表 1 不同种质的穿心莲在各种预处理方法下建立的 PLS-DA 模型的分​​类准确率

Tab.1 Classification accuracy of PLS-DA models established under various preprocessing methods for different germplasms of *Andrographis paniculata*

预处理	训练集	预测集
Raw Data	0.953	0.917
D1	0.994	0.963
D2	0.994	0.944
SG	0.953	0.900
MSC	0.955	0.944

预测值	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6
	7 13.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	100% 0.0%
	0 0.0%	11 20.4%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	100% 0.0%
	0 0.0%	0 0.0%	7 13.0%	1 1.9%	0 0.0%	87.5% 12.5%
	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	19 35.2%	0 0.0%	100% 0.0%
	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	5 9.3%	100% 0.0%
	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 1.9%	0 0.0%	3 5.6%
真实值						
	100% 0.0%	100% 0.0%	100% 0.0%	90.5% 9.5%	100% 0.0%	100% 0.0%
						96.3% 3.7%

图 3 不同种质的穿心莲 D1-PLS-DA 分类模型预测集预测结果的混淆矩阵

Fig.3 Confusion matrix of prediction results for D1-PLS-DA classification model prediction sets of different germplasms of *Andrographis paniculata*

2.4 穿心莲中 4 种穿心莲内酯类化合物的含量预测评估

2.4.1 基于全波长数据预测穿心莲中 4 种穿心莲内酯类化合物的含量

利用穿心莲样品 Raw Data,结合含量测定结果,分别建立穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和穿心莲内酯类总含量的 PLSR、BPNN、RFR 模型,结果见表 2。穿心莲内酯、新穿心莲内酯、穿心莲内酯类总含量的 PLSR 模型性能最好,BPNN 模型次之,去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的 BPNN 模型性能最好,PLSR 次之,除脱水穿心莲内酯外,其余 3 种穿心莲内酯类化合物及穿心莲内酯类总含量的 RFR

模型预测集 R^2 均小于 0.6, RPD 值均小于 1.5, 预测效果不理想。

表 2 穿心莲全波段 Raw Data 不同模型的预测结果

Tab.2 Prediction results of different models for the full band Raw Data of *Andrographis paniculata*

化学成分	模型	训练集		预测集		
		R^2	RMSE	R^2	RMSE	RPD
穿心莲内酯	PLSR	0.835	2.67	0.823	2.80	2.32
	BPNN	0.804	2.90	0.735	3.42	1.67
	RFR	0.761	3.21	0.195	5.97	0.54
新穿心莲内酯	PLSR	0.901	0.36	0.758	0.51	2.10
	BPNN	0.906	0.36	0.706	0.56	1.99
	RFR	0.681	0.65	0.004	1.03	0.55
去氧穿心莲内酯	PLSR	0.954	0.34	0.909	0.52	3.70
	BPNN	0.967	0.29	0.946	0.40	4.53
	RFR	0.832	0.65	0.546	1.17	1.14
脱水穿心莲内酯	PLSR	0.975	0.14	0.833	0.25	2.91
	BPNN	0.978	0.13	0.849	0.23	3.00
	RFR	0.897	0.28	0.625	0.37	1.92
穿心莲内酯类总含量	PLSR	0.903	2.54	0.853	3.06	2.74
	BPNN	0.800	3.65	0.818	3.39	2.08
	RFR	0.779	3.83	0.283	6.74	0.75

接着将经 D1、D2、SG、MSC 预处理的光谱数据结合含量测定结果分别建立 PLSR、BPNN 模型, 结果见表 3。在穿心莲内酯的含量预测中, 与 BPNN 模型相比, PLSR 模型性能更好, 具有更高的 R^2 和 RPD 值。其中, SG-PLSR 模型的训练集和预测集的 R^2 分别为 0.841 和 0.829, RPD 值为

2.36, 预测结果散点图如图 4a 所示, 斜率和 R^2 均大于 0.8, 表明 SG-PLSR 模型可用于穿心莲内酯的含量预测。在新穿心莲内酯的含量预测方面, 与 BPNN 模型相比, PLSR 模型也展现出更佳的性能, 其中 MSC-PLSR 模型的训练集和预测集的 R^2 分别为 0.895 和 0.783, RPD 值为 2.25, 预测结果散点图如图 4b 所示, 斜率为 0.933, R^2 为 0.806, 说明 MSC-PLSR 模型可用于新穿心莲内酯的含量预测。在去氧穿心莲内酯的含量预测中, 除 D2-PLSR 和 D2-BPNN 模型外, 其余模型的训练集和预测集 R^2 均大于 0.9, RMSE 值均趋近于 0, RPD 值均大于 3.0。其中, Raw Data-BPNN 模型性能最好, 预测结果散点图如图 4c 所示, 斜率接近 1, R^2 大于 0.9, 模型的预测值与参考值相差较小。在脱水穿心莲内酯的含量预测中, 除 D2-PLSR 和 D2-BPNN 模型外, 其余模型均具有良好的预测能力。其中, MSC-BPNN 模型的训练集和预测集 R^2 最大, RMSE 值最小, RPD 值最大。该模型的预测结果散点图如图 4d 所示, 斜率接近 1, R^2 大于 0.9, 模型的预测值与参考值的差值较小。在穿心莲内酯类总含量的预测方面, Raw Data-PLSR、SG-PLSR、D1-PLSR 模型的训练集和预测集 R^2 均大于 0.8, RPD 值均大于 2.5, 其中 Raw Data-PLSR 模型性能最好, 预测结果散点图如图 4e 所示, 斜率为 0.969, R^2 为 0.867。

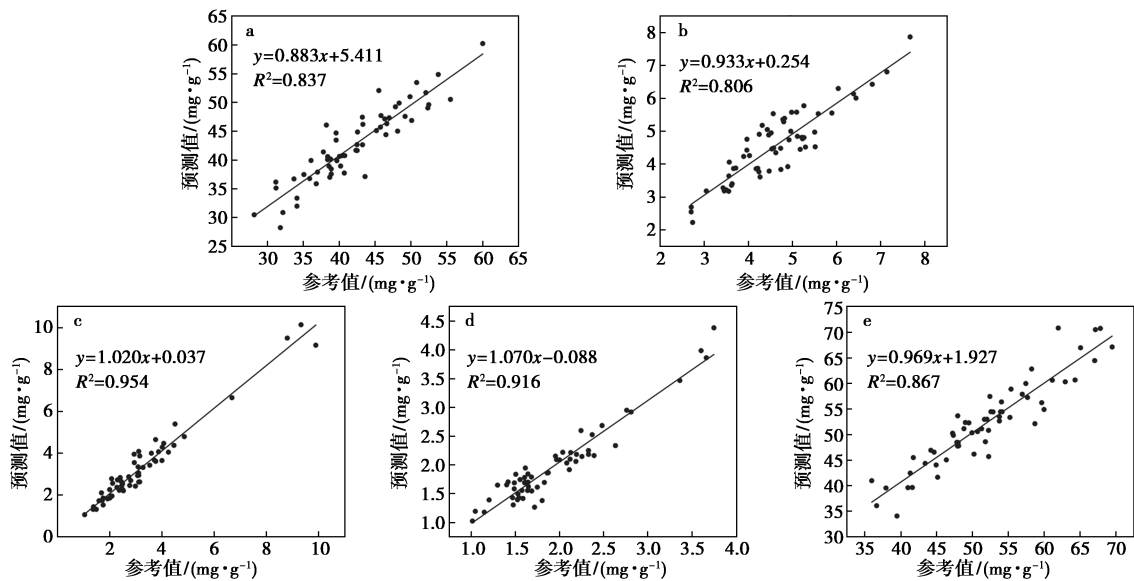
表 3 穿心莲全波段光谱数据经不同的方法预处理后建立的 PLSR 和 BPNN 模型的预测结果

Tab.3 Prediction results of PLSR and BPNN models established after preprocessing the full band spectral data of *Andrographis paniculata* using different methods

化学成分	预处理	PLSR					BPNN				
		训练集		预测集			训练集		预测集		
		R^2	RMSE	R^2	RMSE	RPD	R^2	RMSE	R^2	RMSE	RPD
穿心莲内酯	Raw Data	0.835	2.67	0.823	2.80	2.32	0.804	2.90	0.735	3.42	1.67
	D1	0.850	2.54	0.842	2.65	2.26	0.797	2.96	0.753	3.30	1.55
	D2	0.672	3.76	0.658	3.89	1.67	0.764	3.19	0.617	4.11	1.52
	SG	0.841	2.62	0.829	2.75	2.36	0.777	3.10	0.761	3.25	2.05
	MSC	0.833	2.69	0.854	2.55	2.25	0.835	2.67	0.709	3.59	1.78
新穿心莲内酯	Raw Data	0.901	0.36	0.758	0.51	2.10	0.906	0.36	0.706	0.56	1.99
	D1	0.865	0.42	0.604	0.65	1.58	0.888	0.39	0.417	0.79	1.42
	D2	0.830	0.48	0.541	0.70	1.38	0.705	0.63	0.538	0.70	1.18
	SG	0.900	0.36	0.770	0.50	2.20	0.823	0.49	0.622	0.64	1.64
	MSC	0.895	0.38	0.783	0.48	2.25	0.905	0.36	0.622	0.64	1.60
去氧穿心莲内酯	Raw Data	0.954	0.34	0.909	0.52	3.70	0.967	0.29	0.946	0.40	4.53
	D1	0.936	0.40	0.935	0.44	4.11	0.963	0.31	0.921	0.49	3.63
	D2	0.902	0.50	0.844	0.69	2.16	0.873	0.56	0.830	0.72	1.87
	SG	0.951	0.35	0.909	0.52	3.67	0.952	0.35	0.938	0.43	4.14
	MSC	0.948	0.36	0.905	0.54	3.48	0.965	0.30	0.905	0.54	3.66

续表

化学成分	预处理	PLSR					BPNN				
		训练集		预测集			训练集		预测集		
		R^2	RMSE	R^2	RMSE	RPD	R^2	RMSE	R^2	RMSE	RPD
脱水穿心莲内酯	Raw Data	0.975	0.14	0.833	0.25	2.91	0.978	0.13	0.849	0.23	3.00
	D1	0.970	0.15	0.820	0.25	2.76	0.974	0.14	0.858	0.23	2.70
	D2	0.936	0.22	0.790	0.28	2.34	0.873	0.31	0.694	0.33	1.99
	SG	0.984	0.11	0.854	0.23	3.16	0.979	0.13	0.872	0.22	3.20
	MSC	0.980	0.12	0.855	0.23	3.01	0.985	0.11	0.884	0.20	3.31
穿心莲内酯类总含量	Raw Data	0.903	2.54	0.853	3.06	2.74	0.800	3.65	0.818	3.39	2.08
	D1	0.886	2.76	0.853	3.06	2.51	0.898	2.60	0.712	4.28	1.68
	D2	0.852	3.13	0.754	3.95	2.05	0.680	4.61	0.671	4.57	1.14
	SG	0.886	2.75	0.849	3.10	2.59	0.839	3.27	0.810	3.47	2.21
	MSC	0.898	2.61	0.842	3.16	2.27	0.856	3.10	0.787	3.68	1.89



a.穿心莲内酯的 SG-PLSR 模型;b.新穿心莲内酯的 MSC-PLSR 模型;c.去氧穿心莲内酯的 Raw Data-BPNN 模型;
d.脱水穿心莲内酯的 MSC-BPNN 模型;e.穿心莲内酯类总含量的 Raw Data-PLSR 模型

图 4 基于全波长建立的穿心莲化合物含量的最佳预测模型的参考值和预测值的散点图

Fig.4 Scatter plots of reference and predicted values for the optimal prediction model of compound contents in *Andrographis paniculata* based on full wavelengths

综上所述,本研究分别建立了穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量预测模型,实现了对上述 4 种穿心莲内酯类化合物的含量预测。《中国药典(2020 版)》^[1]规定,穿心莲药材中含穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总量不得少于 1.5%,鉴于此,本研究建立了穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总含量的预测模型,为穿心莲品质快速检测提供新方法。

2.4.2 基于特征波长数据预测穿心莲中 4 种穿心莲内酯类化合物的含量

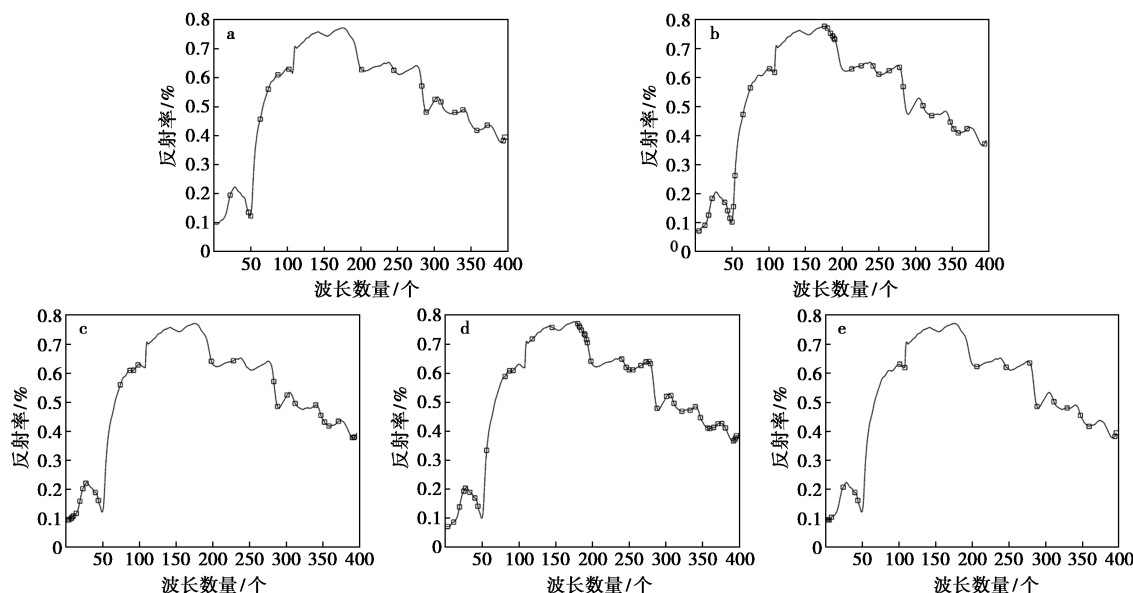
根据全波长的预测结果,进一步选取一些预测效果较好的模型结合 SPA 来选择特征波长。

具体选择的模型为:用于预测穿心莲内酯的 SG-PLSR 模型、预测新穿心莲内酯的 MSC-PLSR 模型、预测去氧穿心莲内酯的 Raw Data-BPNN 模型、预测脱水穿心莲内酯的 MSC-BPNN 模型和预测穿心莲内酯类总含量的 Raw Data-PLSR 模型。

SPA 筛选的特征波长如图 5 所示,这些特征波长大部分分布在吸收峰和吸收谷附近。穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和穿心莲内酯类总含量筛选出的特征波长数目分别为 19、34、29、49、19,波长数目分别减少为全波长的 4.80%、8.59%、7.32%、12.37%、4.80%。穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的结构相似,均含有—C=C—、—COOR 和—OH 官能团。结合图 2

可知,SPA 筛选的特征波长与 4 种穿心莲内酯类化合物的结构存在密切关系。在 410~670、900~1 000、1 470 nm 附近选择的特征波长可能与 4 种穿心莲内酯类化合物的—OH 有关,在 800~900 nm 附近选择的特征波长可能与 4 种穿心莲内酯类化合物的—C=C—有关,在 1 950~2 000、2 200 nm

区域选择的特征波长可能与 4 种穿心莲内酯类化合物的一COOR 有关,在 1 120、1 300~1 400、1 600~1 700、2 370 nm 附近选择的特征波长可能与 4 种穿心莲内酯类化合物的一CH、—CH₂、—CH₃ 有关。因此,可通过穿心莲的光谱信息分析其官能团信息,进而对穿心莲品质进行分析。



“□”即提取的特征波长

a.穿心莲内酯;b.新穿心莲内酯;c.去氧穿心莲内酯;d.脱水穿心莲内酯;e.穿心莲内酯类总含量

图 5 SPA 筛选特征波长

Fig.5 SPA filtering feature bands

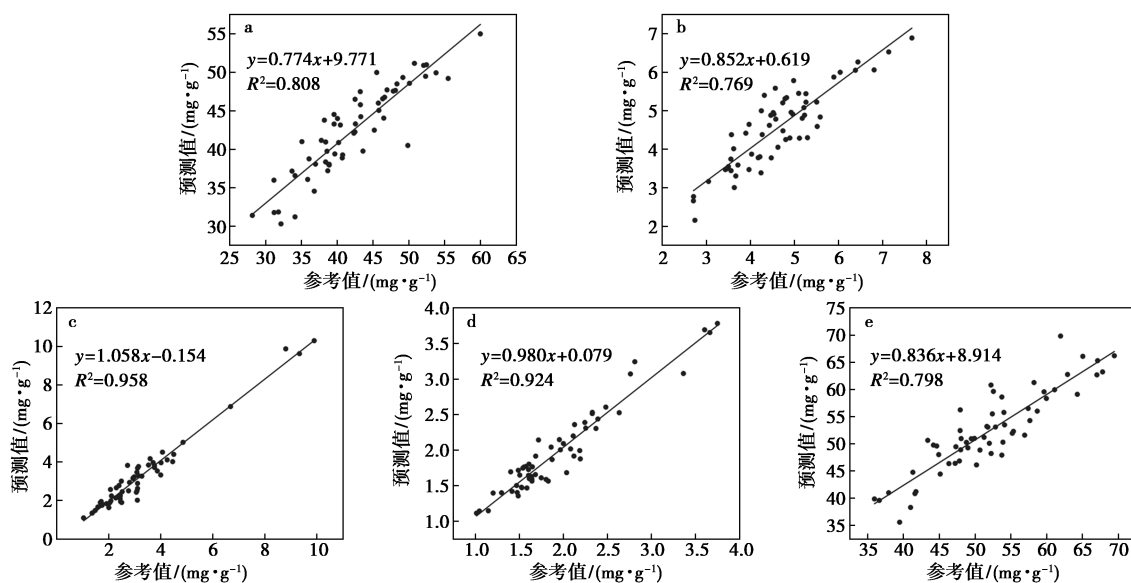
经 SPA 筛选后建模,预测结果见表 4。穿心莲内酯的 SG-SPA-PLSR 模型和新穿心莲内酯的 MSC-SPA-PLSR 模型的训练集和预测集 R^2 均大于 0.6,RPD 值均大于 1.5,预测结果散点图如图 6a 和 6b 所示,斜率和 R^2 均大于 0.75,说明经 SPA 提取特征波长后,降低了穿心莲内酯和新穿心莲内酯含量预测模型的复杂程度,在波长数量有限的情况下实现了含量预测。在去氧穿心莲内酯的含量预测中,与全波长 Raw Data-BPNN 模型相比,提取特征波长后建立的 Raw Data-SPA-BPNN 模型,RPD 值提高 4.42%,预测结果散点图如图 6c 所示,斜率接近 1, R^2 大于 0.9,模型的预测性能好。在脱水穿心莲内酯的含量预测中,与全波长 SG-BPNN 模型相比,筛选特征波长后建立的 SG-SPA-BPNN 模型,RPD 值提高 7.25%,预测结果散点图如图 6d 所示,斜率和 R^2 均大于 0.9,模型的预测值与参考值相接近。因此,在去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量预测中,SPA 提取特征波长后,剔除了不相关变量,简化了建模

过程,提高了模型的精度。在穿心莲内酯类总含量的预测方面,Raw Data-SPA-PLSR 模型的训练集和预测集 R^2 在 0.61~0.80 范围内,RPD 值大于 2.0,预测结果散点图如图 6e 所示,斜率大于 0.8,说明该模型可用于穿心莲内酯类总含量的预测。因此,SPA 筛选的特征波长可有效表征 4 种穿心莲内酯类化合物的光谱信息,简化模型,为后

表 4 穿心莲样品光谱数据经 SPA 筛选后不同组合模型的预测结果

Tab.4 Prediction results of different combination models for spectral data of *Andrographis paniculata* samples after SPA screening

化学成分	模型	特征波长个数	训练集		预测集		
			R^2	RMSE	R^2	RMSE	RPD
穿心莲内酯	SG-PLSR	19	0.784	3.05	0.805	2.93	1.97
新穿心莲内酯	MSC-PLSR	34	0.826	0.48	0.756	0.51	1.98
去氧穿心莲内酯	Raw Data-BPNN	29	0.961	0.31	0.947	0.40	4.73
脱水穿心莲内酯	MSC-BPNN	49	0.981	0.12	0.916	0.17	3.55
穿心莲内酯类总含量	Raw Data-PLSR	19	0.796	3.69	0.794	3.62	2.08



a. 穿心莲内酯的 SG-SPA-PLSR 模型; b. 新穿心莲内酯的 MSC-SPA-PLSR 模型; c. 去氧穿心莲内酯的 Raw Data-SPA-BPNN 模型; d. 脱水穿心莲内酯的 MSC-SPA-BPNN 模型; e. 穿心莲内酯类总含量的 Raw Data-SPA-PLSR 模型

图 6 基于特征波长建立的穿心莲化合物含量的最佳预测模型的参考值和预测值的散点图

Fig.6 Scatter plots of reference and predicted values for the optimal prediction model of compound contents in *Andrographis paniculata* based on the selected wavelengths

续穿心莲品质检测专属小型化高光谱设备的开发提供了方法参考。

2.5 分析与讨论

2.5.1 不同预处理方法对穿心莲中 4 种穿心莲内酯类化合物含量预测模型的影响

含量预测模型构建前,对 Raw Data 进行合适的预处理,可有效减少杂散光、噪声、基线漂移等因素的干扰,提高模型精度。在本研究中,采用了 D1、D2、MSC、SG 这 4 种预处理方法。其中,D1 是一种基线校正方法,通过对重叠光谱进行拆分,增大光谱曲线中波峰和波谷的特征,从而实现基线校正^[21]。在去氧穿心莲内酯的含量预测中,与 Raw Data-PLSR 模型相比,D1-PLSR 模型的 RPD 值提高了 11.08%,说明经 D1 预处理后,有效扣除基线漂移对信号的影响,提高模型精度。D2 也是一种基线校正方法,但在本研究中,4 种穿心莲内酯类化合物的 Raw Data 经 D2 预处理后建立的模型,精度均未提高,可能是在预处理过程中,对基线进行校正的同时,也放大了噪声。MSC 属于散射校正,在脱水穿心莲内酯的含量预测中,全波段 Raw Data 经 MSC 预处理后建模,无论是 PLSR 模型还是 BPNN 模型,RPD 值均提高,这可能是 MSC 消除了由于颗粒分布不均匀及颗粒大小不同所产生的散射对光谱的影响^[22]。SG 是一种平滑处理方法,在穿心莲内酯的含量预测中,最好的

模型即 SG-PLSR,这可能与 SG 可以减小随机误差,降低噪声,提高谱图信噪比有关^[22]。因此,合适的预处理方法,可以有效消除曲线漂移和散射效应,增大光谱数据的信噪比,从而提高模型的准确度和稳定性。

2.5.2 SPA 对穿心莲中 4 种穿心莲内酯类化合物含量预测模型的影响

高光谱数据庞大,其中包含了大量的冗余信息,数据间存在共线性和重叠问题,而且还可能存在与待测样品性质无关的变量,因此,本研究运用 SPA 筛选特征波长,减少数据的维度,简化模型。在去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量预测中,经 SPA 筛选后建立的模型,RPD 值分别增加 4.42% 和 7.25%,模型精度提高,这与 SPA 所选择的波长具有最小的冗余和包含最多的特征相关信息有关^[23]。在穿心莲内酯、新穿心莲内酯和 4 种穿心莲内酯类化合物总含量的预测模型构建中,经 SPA 筛选后建立的模型预测效果没有全波段的好,这可能是在降维过程中,损失了部分重要的光谱信息,导致模型精度有差距,但经 SPA 筛选后,减少了数据量,提高了运算效率,节省了运算时间。

3 结论

本实验以穿心莲为对象,研究了基于高光谱

技术的不同种质穿心莲药材的判别方法和穿心莲化学成分含量的检测方法。研究结果表明高光谱技术结合化学计量学方法可实现穿心莲品质的准确、快速检测。对于不同种质穿心莲的判别,建立 D1-PLS-DA 模型可获得较好的判别准确率。对于穿心莲内酯、新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和穿心莲内酯类总含量的检测,最佳性能的模型分别为 SG-PLSR、MSC-PLSR、Raw Data-SPA-BPNN、MSC-SPA-BPNN 和 Raw Data-PLSR。该研究可为不同种质穿心莲品质的快速准确检测提供方法和技术支持,但不足之处在于未能使用优化算法对分类模型和回归模型进行参数优化,后续将结合优化算法建立不同种质穿心莲品质检测的分类模型和回归模型,提高模型精度。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 陈东亮, 钟楚, 林阳. 药用植物穿心莲种质资源、育种及栽培研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, **48**(21): 34-40.
- [3] 周芳, 孙铭阳, 梅瑜, 等. 药用植物穿心莲研究进展[J]. 广东农业科学, 2021, **48**(1): 9-16.
- [4] 张晓, 唐力英, 吴宏伟, 等. 穿心莲现代研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, **24**(18): 222-234.
- [5] 肖传学, 孙玉侠, 耿晓梅, 等. 不同药用部位及产地穿心莲药材中 4 个二萜内酯类成分的研究[J]. 中国现代中药, 2017, **19**(5): 675-678.
- [6] 滕云霞, 张飞宇, 毛鑫, 等. 复方穿心莲片 HPLC 含量测定方法研究[J]. 广东化工, 2023, **50**(13): 201-204.
- [7] 李振雨, 赵书运, 刘晓霞, 等. 基于 UPLC 特征图谱和一测多评法的穿心莲药材质量研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, **30**(6): 141-147.
- [8] 赖秀娣, 林晓菁, 龚雪, 等. 近红外光谱法快速测定穿心莲中穿心莲内酯的含量[J]. 中国医药工业杂志, 2018, **49**(9): 1 300-1 305.
- [9] 张璐, 茹晨雷, 殷文俊, 等. 基于近红外高光谱成像结合分水岭算法鉴别酸枣仁药材的产地[J]. 药物分析杂志, 2021, **41**(4): 726-734.
- [10] 史磊. 基于高光谱成像技术的三七皂苷无损检测研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2023.
- [11] 李欣庭, 张峰, 冯洁. 卷积神经网络结合改进光谱处理方法用于马铃薯病害检测[J]. 光谱学与光谱分析, 2024, **44**(1): 215-224.
- [12] 谢潮勇. 基于可见/近红外光谱技术结合化学计量学测量土壤养分含量[D]. 上海: 华东交通大学, 2023.
- [13] 易翔. 基于无人机滴灌棉田氮营养监测与分区管理研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2023.
- [14] 韩宣宣. 多源无人机遥感影像的冬小麦长势监测及产量估算[D]. 合肥: 安徽大学, 2022.
- [15] 张悦, 周骏辉, 王思曼, 等. 基于可见光-近红外高光谱成像技术的陈皮陈化年份鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2023, **43**(10): 3 286-3 292.
- [16] 刘玲玲, 王游游, 杨健, 等. 基于高光谱技术的枸杞子化学成分含量快速检测技术研究[J]. 中国中药杂志, 2023, **48**(16): 4328-4336.
- [17] 张悦, 王游游, 张婷, 等. 高光谱结合图分割算法快速鉴别不同尺度产地陈皮[J]. 化学试剂, 2023, **45**(1): 136-143.
- [18] YOUYOU W, FENG X, YUE Z, et al. Application of hyperspectral imaging assisted with integrated deep learning approaches in identifying geographical origins and predicting nutrient contents of Coix seeds [J]. *Food Chem.*, 2023, **404**: 134 503-134 512.
- [19] QIN O, LI W, BOSOOON P, et al. Simultaneous quantification of chemical constituents in matcha with visible-near infrared hyperspectral imaging technology[J]. *Food Chem.*, 2021, **350**: 129 141-129 148.
- [20] ZHANG H, JIA B, LU Y, et al. Detection of aflatoxin B₁ in single peanut kernels by combining hyperspectral and microscopic imaging technologies [J]. *Sensors (Basel)*, 2022, **22**(13): 4 864-4 878.
- [21] 张恒, 梁太波, 宋效东, 等. 基于高光谱成像的烟田土壤 pH 估测研究[J]. 西南农业学报, 2023, **36**(12): 2 771-2 779.
- [22] 第五鹏瑶, 卞希慧, 王姿方, 等. 光谱预处理方法选择研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, **39**(9): 2 800-2 806.
- [23] 岳明慧, 张姗姗, 张静, 等. 基于高光谱成像技术的薯麦混合粉淀粉含量检测[J]. 中国粮油学报, 2023, **38**(12): 197-202.

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定牦牛肉中多种抗生素残留

李增明^{a,b}, 解玉龙^{*a,c}, 马春光^b

(青海民族大学 a.化学化工学院, b.西宁市疾病预防控制中心,

c.青海省纳米材料与技术重点实验室, 青海 西宁 810007)

摘要:建立了用氨基化多壁碳纳米管和 C18 作为净化剂,用超高效液相色谱-串联质谱法同时快速测定牦牛肉中四环素类、喹诺酮类和磺胺类等 31 种抗生素残留的方法,牦牛肉经过均质,然后用 2 mL (0.1 mol/L) Na₂EDTA-McIlvaine 试剂和 8 mL 乙腈超声提取,离心提取上清液后用 QuEChERS (氨基化多壁碳纳米管和 C18 作为净化剂) 法净化,浓缩定容后用 Waters ACQUITY UPLCTM BEH C18 柱分离,电喷雾正离子模式 (ESI⁺) 电离,多反应离子监测 (MRM) 采集信号,外标法定量。研究表明:31 种抗生素残留在 1~200 μg/kg 的线性范围内有良好线性关系 ($r>0.995\ 0$)。方法的检出限和定量限分别为 0.06~0.77 和 0.18~2.31 μg/kg。空白加标样品在 20、100 和 200 μg/kg 3 个浓度水平时,31 种兽药残留平均回收率为 63%~126%,相对标准偏差为 0.69%~11.5% ($n=6$),方法快捷简单,方法重现性好、准确度高,适合对牦牛肉中残留的 31 种抗生素进行分析检测。

关键词: 抗生素残留; QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱; 牦牛肉; 净化剂

中图分类号: O65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283 (2024) 06-0099-08

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0832

Determination of Veterinary Drug Residues in Yak Meat by QuEChERS-Ultra High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Li Zeng-ming^{a,b}, XIE Yu-long^{*a,c}, MA Chun-guang^b (a.School of Chemistry and Chemical Engineering, b.Xining Center for Disease Control and Prevention, c.Key Laboratory of Nanomaterials and Technology in Qinghai Province, Qinghai Minzu University, Xining 810007, China)

Abstract: An ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS) method was established for the simultaneous and rapid determination of 31 kinds of antibiotics residues of tetracycline, quinolone and sulfonamides in yak meat by using amination multi-wall carbon nanotubes and C18 as purification agent. Then, 2 mL (0.1 mol/L) Na₂EDTA-McIlvaine reagent and 8 mL acetonitrile were ultrasonically extracted, the supernatant was centrifuged and purified by QuEChERS (amination multi-wall carbon nanotubes and C18 as purification agent) method. After concentration and volume determination, the Water ACQUITY UPLCTM BEH C18 column was used for separation, electrospray positive ion mode (ESI⁺) ionization, multiple reactive ion monitoring (MRM) signals were collected and quantified by external standard method. The results showed that the residues of 31 antibiotics had a good linear relationship in the linear range of 1~200 μg/kg ($r>0.995\ 0$). The limits of detection and quantification were 0.06~0.77 and 0.18~2.31 μg/kg, respectively. The average recovery of 31 veterinary drugs was 63%~126% and the relative standard deviation was 0.69%~11.5% ($n=6$) at the concentration of 20, 100 and 200 μg/kg blank labeled samples. The method was fast and simple, with good reproducibility and high accuracy, which was suitable for the analysis and detection of 31 kinds of antibiotics in yak meat.

Key words: antibiotic residue; QuEChERS; ultra performance liquid chromatography-tandem mass (UPLC-MS); yak meat; purification agent

牦牛生活在青藏高原的高海拔地区,是高寒地区独有的畜牧品种^[1],我国是牦牛的发源地,也是世界上牦牛数量最多的国家^[2],分布在青海、西藏、四川、甘肃等地^[2],其肉具有“肉类之

收稿日期:2023-12-24;网络首发日期:2024-03-22

基金项目:青海省应用基础研究项目 (2024-ZJ-787)。

作者简介:李增明 (1991-),男,青海西宁人,硕士生,主管理化检验技师,主要研究方向为食品检测。

通讯作者:解玉龙, E-mail: yulongxie2012@126.com。

引用本文:李增明,解玉龙,马春光.QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定牦牛肉中多种抗生素残留[J].化学试剂,2024,46(6):99-106。

冠”的美称^[3],富含丰富的蛋白质和氨基酸,具有较高的食用品质和营养价值^[4]。因牦牛的栖息地生态自然环境好,污染较少,因此牦牛肉成为绝佳的“绿色健康食品”^[5]。随着当地畜牧业的发展,越来越多的人开始圈养牦牛^[6],饲养牦牛过程中为了提高出栏率,缩短饲养的周期,降低染病率,在养殖过程中大量使用抗生素,各种抗生素超标的事件层出不穷,滥用抗生素对人体健康带来显著的不良影响^[7]。

QuEChERS 前处理是在分散固相萃取技术基础上发展起来的一种新型前处理方法^[8],具有经济环保、快速简单、安全可靠等优点^[9]。随着技术的发展,改良后的 QuEChERS 法广泛应用于农药和兽药残留的分析与检测^[10]。由于样品中基质的干扰因素与目标化合物物理化学性质各异,合理地选用和开发不同的基质吸附剂是重点研究对象。

目前在农药和兽药残留检测中较为成熟的基质净化剂主要有 C18^[11]、PSA^[12]、NH₃^[13]和碳纳米材料^[14]等。其中,碳纳米管及其复合材料因其优异的吸附性能和较高的比表面积被广泛应用于农药残留及兽药残留的净化过程^[15]。碳纳米管有多壁碳纳米管和单壁碳纳米管,其中氨基化多壁碳纳米管具有特殊的性质^[16],大量微小的空腔管道状结构,展现出强大的吸附性能^[17]。利用氨基化多壁碳纳米管预处理加快了样品制备过程,可实现高通量分析,已广泛应用于残留分析领域^[18]。

本文采用超高效液相色谱串联质谱法对牦牛肉中的 4 种四环素类抗生素、12 种喹诺酮类抗生素、15 种磺胺类抗生素进行测定。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

XEVO-TQS Cronos 型超高效液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司);DCY 型氮吹仪(北京安博科技有限公司);120S 型电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-800KDE 型数控高功率超声波清洗器(昆山仪器超声有限公司);5910R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);VORTEX3 型漩涡振荡仪(德国 IKA 公司);0.22 μm 微孔滤膜(安捷伦科技有限公司);5 mL 无菌注射器(圣光医用制品股份有限公司)。

四环素类、喹诺酮类、磺胺类标准品(上海安

谱标准品技术服务公司);甲醇、乙腈(色谱纯,德国默克公司);无水硫酸钠、无水硫酸镁、氯化钠、柠檬酸、磷酸氢二钠、Na₂EDTA·2H₂O(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);氨基化多壁碳纳米管(纯度 99%,直径 8~20 nm,管长 5~20 nm,广州宏武新材料科技有限公司);甲酸(色谱纯)、PSA 粉、C18、NH₃ 吸附剂(北京迪马科技有限公司);超纯水(美国 Millipore 公司)。

牦牛肉来自实验室日常检测样本。

1.2 方法

1.2.1 基质匹配标准曲线的制备

100 μg/mL 混合标准储备溶液制备:分别精确称取 1 mg 31 种目标化合物,在 10 mL 棕色容量瓶中用甲醇定容至刻度线,摇匀即可。

1 000 μg/L 混合标准中间液制备:准确吸取 1 mL(100 μg/mL)标准储备溶液,在 100 mL 棕色容量瓶中用甲醇定容至刻度线,摇匀即可。

200 μg/L 混合标准使用液制备:准确吸取 2 mL(1 000 μg/L)混合标准中间液在 10 mL 棕色容量瓶中用初始流动相定容至刻度线,摇匀即可。

空白基质制备:将 1 份未含目标化合物的样品提取净化后制得。

初始流动相:95% A(0.1%甲酸水)+5% B(含 0.1%甲酸的 V(甲醇):V(乙腈)=2:8)。

空白基质标准系列配制:准确吸取 5、50、100、250、400、500、750 和 1 000 μL(200 μg/L)混合标准使用液于 1 mL 进样小瓶中,把 1 mL 提取后的空白基质分别加入到进样小瓶中,然后在 45 °C 水浴条件下氮气吹干,加 1 mL 初始流动相,涡旋溶解震荡混匀后即得到 1、10、20、50、80、100 和 200 μg/L 的空白基质标准溶液。

1.2.2 样品的制备及提取

称取 2.0 g 经过匀浆后的牦牛肉样品于 50 mL 离心管中,然后加入 2 mL(0.1 mol/L) Na₂EDTA-McIlvaine 试剂,涡旋 30 s,加入 8 mL 乙腈,加入 4 g 无水硫酸钠和 1 g 氯化钠,迅速涡旋 5 min,超声 20 min(温度不超过 40 °C),速率 5 000 r/min,温度低于 5 °C 离心 10 min,按以上步骤重复提取一次合并上清液,待净化。

1.2.3 样品的净化

氨基化多壁碳纳米管对四环素类和喹诺酮类有吸附,因此分两组净化,A1 组:四环素类和喹诺酮类,移取 5 mL 上清液于 15 mL 含 200 mg C18、150 mg 无水硫酸钠的离心管中,涡旋 10 min,超

声 20 min,以 4 000 r/min 离心 15 min,准确移取 5 mL 上清液,在 40 ℃ 水浴条件下氮气吹干。A2 组:磺胺类,移取 5 mL 上清液于 15 mL 含 150 mg 无水硫酸镁、100 mg 氨基化多壁碳纳米管的离心管中,涡旋 10 min,超声 20 min,以 4 000 r/min 离心 15 min,准确移取 5 mL 上清液,在 40 ℃ 水浴中用氮气吹干。两组样品分别用 0.5 mL 初始流动相超声溶解,过 0.22 μm 滤膜后在超相液相色谱串联质谱仪上机测定。

1.2.4 色谱及质谱条件

1.2.4.1 色谱条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLCTM BEH C18 柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);流速:0.3 mL/min;柱温:30 ℃;进样体积:10 μL;流动相:A:0.1%甲酸水,B:含 0.1%甲酸的 V(甲醇):V(乙腈)=2:8 梯度洗脱,梯度列表见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab.1 Mobile phase gradient elution procedure		
时间/min	A 相/%	B 相/%
0	95	5
2.0	85	15
5.0	60	40
7.0	5	95
7.1	95	5
9.0	95	5

1.2.4.2 质谱条件

离子化模式:电喷雾正离子模式(ESI⁺);质谱扫描方式:多反应离子检测(MRM);毛细管电压:2.0 kV;离子源温度:150 ℃;脱溶剂气温度:450 ℃;脱溶剂气流量:800 L/Hr;其他质谱参数见表 2。

表 2 31 种抗生素残留药物主要参考质谱参数

Tab.2 Main reference mass spectrum parameters of 31 residual antibiotics					
序号	化合物名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/V	锥孔电压/V
1	四环素	445.1	428.3 410.3	15 15	20
2	金霉素	479.1	444.2 462.2	20 25	25
3	土霉素	461.1	426.3 443.2	15 10	25
4	多西环素	445.1	428.2 410.2	15 15	25
5	培氟沙星	320.1	302.2 233.2	10 10	10

续表

序号	化合物名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/V	锥孔电压/V
6	环丙沙星	332.1	314.2 245.2	20 25	30
7	洛美沙星	352.1	265.2 308.3	20 15	30
8	恩诺沙星	360.2	316.3 342.3	20 15	35
9	达氟沙星	358.2	96.05 340.3	15 15	35
10	氧氟沙星	362.1	261.2 318.3	20 15	20
11	氟甲喹	262.0	202.0 244.0	15 25	20
12	诺氟沙星	332.1	231.2 203.2	30 35	30
13	二氟沙星	400.2	356.2 299.2	20 25	20
14	磺胺甲噁唑	254.0	92.0 108.0	25 25	20
15	磺胺二甲嘧啶	279.0	124.0 186.1	25 15	20
16	磺胺甲基嘧啶	265.0	156.0 92.0	15 30	20
17	磺胺间二甲氧嘧啶	311.0	156.0 92.0	20 30	20
18	磺胺间甲氧嘧啶	281.0	156.0 92.0	15 30	20
19	依诺沙星	321.1	303.2 234.0	15 20	20
20	麻保沙星	363.1	72.0 320.0	20 10	20
21	沙拉沙星	386.2	342.2 299.1	15 25	30
22	磺胺甲噻二唑	271.0	92.0 156.0	30 10	25
23	磺胺二甲异噁唑	268.0	92.0 156.0	25 10	25
24	磺胺苯吡唑	315.0	158.0 92.0	25 30	25
25	磺胺氯哒嗪	285.0	156.0 92.0	10 30	25
26	磺胺甲氧哒嗪	281.0	156.0 92.0	10 30	25
27	苯酰磺胺	277.0	108.0 156.0	20 10	25
28	磺胺噻唑	256.0	92.0 156.0	20 10	25

续表

序号	化合物名称	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞 能量/V	锥孔 电压/V
29	磺胺吡啶	250.0	156.0 108.0	10 25	25
30	磺胺对甲氧嘧啶	281.0	92.0 156.0	30 15	20
31	磺胺嘧啶	251.0	92.0 156.0	25 15	15

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的选择和优化

2.1.1 提取剂的选择

本研究中涉及的 31 种抗生素包含四环素类、喹诺酮类、磺胺类等化合物,种类多,化学性质和结构差异较大。乙腈是一种常用的提取试剂,对于目标化合物有较高的提取效率^[19],由于四环素类目标化合物在乙腈中的溶解效率比较差,用乙腈提取后其回收率均小于 15%^[20]。通常在酸性条件下用 $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ ^[21] 试剂提取喹诺酮类化合物和四环素类化合物提取效率将会升高^[22]。经过多次的实验后发现乙腈与 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 缓冲溶液以一定的比例混合后,提取效率升高。在本实验中对提取试剂缓冲溶液和乙腈的比例的不同和回收率进行了对比,结果发现 $V(0.1 \text{ mol/L } \text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine 试剂}):V(\text{乙腈}) = 1:16$ 时,四环素类化合物的回收率 <40%;在 $V(\text{缓冲溶液}):V(\text{乙腈}) = 2:16$ 时,四环素类化合物的回收率能提高到 85% 以上;缓冲溶液和乙腈的体积比升高到 3:16 和 4:16 时,四环素类化合物回收率和 2:16 时无明显差别。加入的 $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 试剂过多,对后续净化过程中的除水工作增加困难,导致目标化合物的回收率减少,因此本研究选择 16 mL 乙腈和 2 mL (0.1 mol/L) $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 试剂混合溶液作为提取剂。

2.1.2 除水剂的选择

本实验中使用的除水剂分别为无水硫酸镁、无水硫酸钠、氯化钠。四环素类化合物容易与金属阳离子 Mg^{2+} 结合而形成配合物^[23],因此,在检测四环素类化合物时,不采用无水硫酸镁进行除水。氯化钠能分层去除水分^[24],四环素类化合物易溶于水,导致回收率降低。在振荡混合后无水硫酸钠用量小于 6 g 时,出现分层现象,四环素类

化合物、喹诺酮类化合物等水溶性化合物的回收率有所降低。当无水硫酸钠的用量减少时,分层较为明显,目标化合物回收率降低,无水硫酸钠用量增加时,目标化合物回收率升高。当无水硫酸钠用量为 8 g 时,可脱除约 75% 的水分。再增加无水硫酸钠的用量,目标化合物的回收率无明显变化。第一步除水后,离心所得上清液各取 5 mL 分两组净化,A1 组净化四环素类化合物和喹诺酮类化合物,用 150 mg 无水硫酸钠即可除去大部分的水。A2 组净化磺胺类化合物,用 150 mg 无水硫酸镁可基本去除全部的水分。

2.1.3 净化剂的选择

本研究对比了氨基化多壁碳纳米管、PSA、C18 和 NH_3 这 4 种净化剂对 31 种目标化合物的净化效果。通过前处理步骤获得待净化的提取液,用该溶液配制 40 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液,各取 5 mL,分别加入 25、50、100、150、200 和 300 mg 上述净化剂,净化后取样进行液相色谱-串联质谱检测。 NH_3 净化剂有较好的净化效果,但是同时会在磺胺类药物中引入新的干扰峰,对目标化合物的定性产生影响,因此可以排除。氨基化多壁碳纳米管加入 50 mg 时,四环素类和喹诺酮类化合物回收率均 <50%,加入 100 mg 时四环素类和喹诺酮类回收率仅为 10%~25%,磺胺类平均回收率高达 85%,C18 能够吸附脂肪等强疏水性干扰物,研究表明 C18 加入量为 50 mg 时磺胺类药物的回收率仅为 10%~30%,加入量为 100 mg 时,四环素类和喹诺酮类平均回收率为 75%,加入 200 mg 时四环素类和喹诺酮类平均回收率为 84%,PSA 粉能够去除一些极性干扰物质^[25],加入量为 100 mg 时即对 3 类化合物有明显的吸附作用,吸附剂为 100 mg 时的平均提取回收率如图 1 所示。

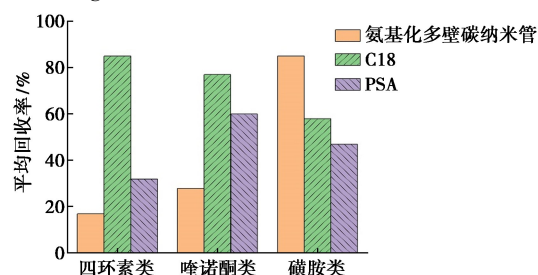
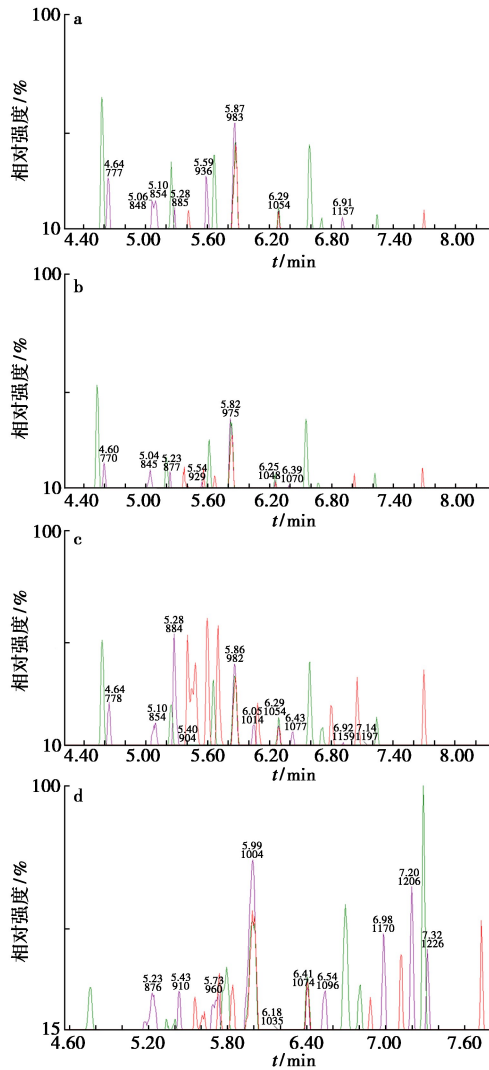


图 1 3 种净化剂平均提取回收率

Fig.1 Average extraction recovery of 3 kinds of adsorbents

综上所述,可以分组进行净化,A1 组:200 mg 的 C18+150 mg 无水硫酸钠净化,A2 组:100 mg

氨基化碳纳米管+150 mg 无水硫酸镁净化,各净化剂净化总离子流图如图 2 所示。



a.PSA 粉净化总离子流图;b.200 mg C18 净化总离子流图;
c.100 mg 氨基化碳纳米管净化总离子流图;
d.分组净化合并后总离子流图

图 2 不同净化试剂总离子流图

Fig.2 Total ion flow diagram of different purification reagents

2.2 方法确认

2.2.1 线性关系及检出限

采用样品空白基质和标准工作液进行标准曲线的制作。以目标化合物定量离子的峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标绘制空白基质曲线,得到线性回归方程。所有目标化合物相关系数 $r > 0.9950$,表明目标化合物在相应的浓度范围内线性关系良好。31 种抗生素的检出限为 $0.06 \sim 0.77 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $0.18 \sim 2.31 \mu\text{g}/\text{kg}$ (表 3)。

表 3 31 种目标化合物线性关系、检出限及定量限

Tab.3 Linear relationships, detection limits and quantitative limits of 31 target compounds

序号	抗生素名称	线性回归方程	相关系数 (r)	检出限/定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
1	四环素	$y = 199.532x + 1959.61$	0.999 6	0.53	1.60
2	金霉素	$y = 56.5841x - 35.371$	0.999 3	0.53	1.58
3	土霉素	$y = 137.464x + 164.985$	0.998 3	0.37	1.12
4	多西环素	$y = 235.237x + 1150.99$	0.999 2	0.45	1.36
5	培氟沙星	$y = 141.584x + 311.883$	0.998 7	0.24	0.72
6	环丙沙星	$y = 93.6484x + 108.127$	0.996 3	0.70	2.09
7	洛美沙星	$y = 329.817x + 2290.45$	0.997 4	0.17	0.51
8	恩诺沙星	$y = 198.4x + 2987.97$	0.997 8	0.66	1.97
9	达氟沙星	$y = 128.936x + 349.911$	0.998 4	0.43	1.30
10	氧氟沙星	$y = 354.29x + 2442.47$	0.996 1	0.52	1.55
11	氟甲喹	$y = 419.619x + 1795.67$	0.996 5	0.24	0.72
12	诺氟沙星	$y = 255.65x - 169.385$	0.997 6	0.32	0.97
13	二氟沙星	$y = 100.03x + 1247.44$	0.996 7	0.52	1.55
14	磺胺甲噁唑	$y = 362.265x + 5600.4$	0.996 3	0.18	0.54
15	磺胺二甲嘧啶	$y = 675.785x + 239.296$	0.997 4	0.16	0.47
16	磺胺甲基嘧啶	$y = 358.753x + 47.004$	0.997 1	0.36	1.07
17	磺胺间二甲氧嘧啶	$y = 850.035x + 310.86$	0.998 3	0.08	0.25
18	磺胺间甲氧嘧啶	$y = 916.864x + 659.178$	0.996 5	0.11	0.33
19	依诺沙星	$y = 168.172x - 28.6865$	0.998 1	0.52	1.55
20	麻保沙星	$y = 545.184x + 2106.7$	0.997 2	0.29	0.88
21	沙拉沙星	$y = 149.433x + 937.447$	0.999 3	0.34	1.03
22	磺胺甲噻二唑	$y = 277.862x + 184.279$	0.996 0	0.14	0.41
23	磺胺二甲异噁唑	$y = 483.882x + 101.792$	0.998 4	0.06	0.19
24	磺胺苯吡唑	$y = 391.784x + 225.999$	0.997 8	0.09	0.26
25	磺胺氯哒嗪	$y = 442.306x - 150.996$	0.996 4	0.07	0.21
26	磺胺甲氧哒嗪	$y = 879.36x + 84.6367$	0.998 4	0.23	0.70
27	苯酰磺胺	$y = 730.934x + 256.819$	0.998 0	0.40	1.19
28	磺胺噻唑	$y = 305.426x - 59.4893$	0.997 0	0.77	2.30
29	磺胺吡啶	$y = 398.752x - 80.8133$	0.998 4	0.77	2.31
30	磺胺对甲氧嘧啶	$y = 1009.35x + 339.909$	0.999 6	0.06	0.18
31	磺胺嘧啶	$y = 319.414x + 94.5187$	0.995 5	0.44	1.31

2.2.2 回收率及精密度

在牦牛肉空白样品中分别添加 20、100 和 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 水平的标准物质,分别进行 6 次平行添加回收试验,以标准曲线定量,结果见表 4,四环素类的回收率范围为 $67.0\% \sim 126.0\%$,相对标准偏差范围为 $2.11\% \sim 10.10\%$,喹诺酮类的回收率为 $63.0\% \sim 111.0\%$,相对标准偏差范围为 $0.69\% \sim$

11.50%,磺胺类的回收率为 64.4%~111.0%,相对标准偏差范围为 1.44%~8.71%,结果表明该方法具有良好的回收率和重复性。

表 4 目标化合物加标回收率及精密度

Tab.4 Recovery rate and precision of target compounds

序号	抗生素名称	加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均 回收率/%	RSD/ %
1	四环素	20	106.0	5.52
		100	78.9	5.83
		200	80.3	4.78
2	金霉素	20	97.0	10.10
		100	70.7	6.22
		200	73.3	5.99
3	土霉素	20	126.0	8.29
		100	74.7	5.60
		200	67.0	5.09
4	多西环素	20	100.0	7.55
		100	69.6	6.82
		200	69.6	2.11
5	培氟沙星	20	100.0	9.10
		100	83.2	9.99
		200	82.8	3.14
6	环丙沙星	20	92.6	12.50
		100	70.6	6.95
		200	88.1	3.18
7	洛美沙星	20	95.9	6.00
		100	84.0	3.72
		200	88.5	1.18
8	恩诺沙星	20	82.4	10.40
		100	73.7	3.23
		200	84.0	7.22
9	达氟沙星	20	90.8	11.50
		100	88.3	8.58
		200	100.0	4.49
10	氧氟沙星	20	83.8	7.08
		50	91.3	3.57
		100	93.0	2.91
11	氟甲喹	20	87.0	10.00
		100	109.0	4.54
		200	90.0	5.63
12	诺氟沙星	20	96.4	8.40
		100	78.5	2.87
		200	88.4	3.91
13	二氟沙星	20	87.1	10.60
		100	78.1	9.82
		200	84.6	4.18
14	磺胺甲噁唑	20	111.0	5.44
		100	97.5	3.93
		200	71.3	3.71
15	磺胺二甲嘧啶	20	109.0	3.47
		100	99.5	3.23
		200	66.4	2.33

续表

序号	抗生素名称	加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均 回收率/%	RSD/ %
16	磺胺甲基嘧啶	20	112.0	7.84
		100	82.6	8.71
		200	64.4	4.13
17	磺胺间二甲氧嘧啶	20	104.0	4.34
		100	97.4	2.40
		200	72.0	2.49
18	磺胺间甲氧嘧啶	20	111.0	5.75
		100	90.9	5.15
		200	65.4	3.80
19	依诺沙星	20	98.2	9.69
		100	63.0	0.69
		200	80.4	3.03
20	麻保沙星	20	106.0	6.10
		100	86.8	6.83
		200	71.8	2.88
21	沙拉沙星	20	93.3	3.62
		100	89.2	5.16
		200	66.9	3.83
22	磺胺甲噻二唑	20	109.0	3.45
		100	76.3	8.02
		200	129	3.07
23	磺胺二甲异噁唑	20	106.0	2.58
		100	99.5	6.75
		200	75.4	3.01
24	磺胺苯吡唑	20	96.6	4.65
		100	84.2	5.55
		200	72.8	5.41
25	磺胺氯哒嗪	20	100.0	2.88
		100	73.0	6.36
		200	68.8	2.21
26	磺胺甲氧哒嗪	20	105.0	7.33
		100	78.6	3.39
		200	69.7	1.49
27	苯酰磺胺	20	107.0	3.66
		100	95.7	1.33
		200	70.3	1.47
28	磺胺噻唑	20	84.9	4.79
		100	83.7	3.00
		200	75.3	3.15
29	磺胺吡啶	20	80.3	3.60
		100	75.5	1.44
		200	75.1	8.10
30	磺胺对甲氧嘧啶	20	102.0	2.47
		100	77.8	1.79
		200	73.5	3.55
31	磺胺嘧啶	20	79.4	5.78
		100	77.3	2.44
		200	77.7	1.62

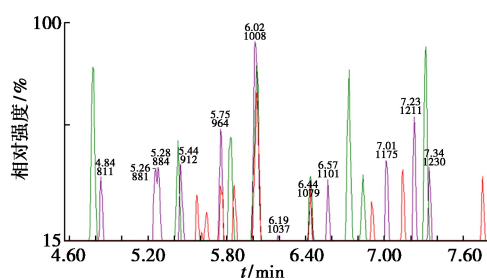


图 3 加标 20 µg/kg 样品总离子流图

Fig.3 Total ion flow of the sample labeled 20 µg/kg

2.3 实际样品的检测

本研究采集了 50 份牦牛肉作为实际样品,牦牛肉均采自于西宁市四区的各大农贸市场,同时作空白样品加标样(100 µg/kg)进行质量控制,结

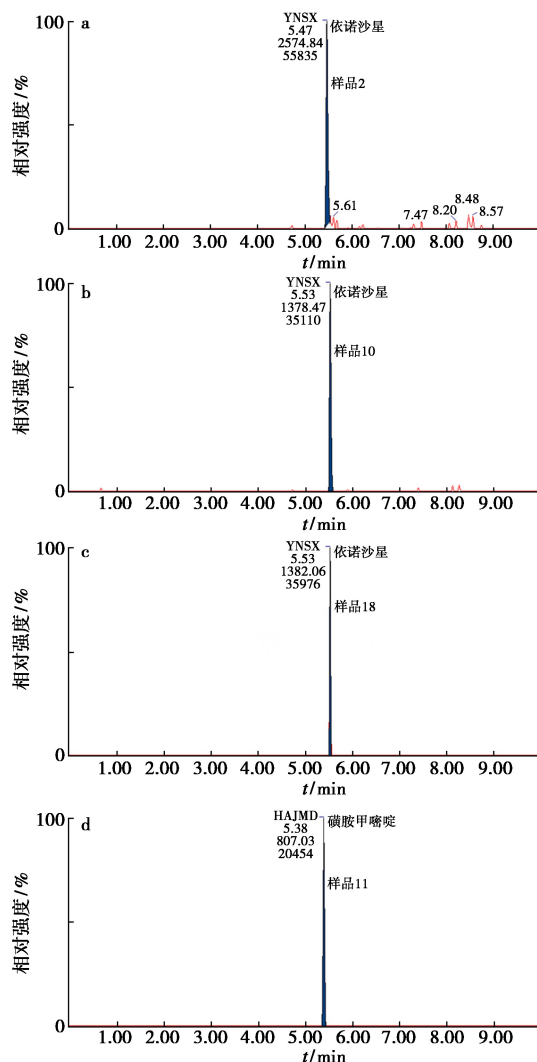
果显示 2、10、18 号样品依诺沙星为 15.5、8.4、8.4 µg/kg,11 号样品磺胺甲噁唑 2.1 µg/kg,阳性样本碎片离子色谱图如图 4 所示,根据国标 GB 31650—2019《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》^[26]均小于国家限量。

3 结论

本研究建立了基于氨基化多壁碳纳米管的 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱技术测定牦牛肉中 31 种抗生素残留的方法,具有样品前处理快速简捷、检测分析结果灵敏度高,准确度高,适用于牦牛肉中多种兽药残留的检测。该方法能够满足牦牛肉中兽药残留相关安全检测要求,为动物源食品兽药残留检测提供方法参考。

参考文献:

- [1] 张强, 俄广鑫, 平措占堆, 等. 中国牦牛资源开发利用研究进展[J]. 动物营养学报, 2023, **35**(12): 7492-7518.
- [2] 黄纯, 阎萍, 梁春年. 中国牦牛种业现状与发展方向[J]. 中国畜禽种业, 2023, **19**(7): 121-127.
- [3] 周莉. 青藏高原草原畜牧业绿色发展研究[D]. 成都: 四川大学, 2022.
- [4] 加拉. 西藏农牧区牦牛疫病防控对策[J]. 中兽医学杂志, 2022, (7): 37-39.
- [5] 张雪丹. 青海雪多牦牛乳的营养成分及特殊功能性组分研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022.
- [6] 廖阳慈, 李蕊蕊, 索朗斯珠, 等. 西藏自治区牦牛生产现状和趋势分析[J]. 中国畜禽种业, 2023, **19**(6): 72-79.
- [7] 农业农村部. 四川省兽用抗菌药使用减量化行动实施方案(2021—2025 年)[J]. 四川畜牧兽医, 2022, **49**(1): 56-59.
- [8] CARVALHO D M, LUIZ N P, SMGUIURA C E, et al. Pesticide residues in dry herbs used for tea preparation by UHPLC-MS/MS: Method validation and analysis[J]. *J. Food Compos. Anal.*, 2024, **125**: 85-93.
- [9] ALKA K, BHASWATI B, TRIPTI A, et al. Method development and validation for acrylamide in potato cutlet by UHPLC-MS/MS[J]. *Food Control*, 2023, **151**: 116-128.
- [10] 赵广丽, 张悦, 孙大妮, 等. 分子印迹技术用于抗生素残留检测的研究进展[J]. 化学试剂, 2022, **44**(9): 1350-1359.
- [11] 杨松, 刘尚可, 张俊杰, 等. 新型介孔材料-QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法检测茶叶中 10 种农药



a. 2 号样品依诺沙星片段离子色谱图; b. 10 号样品依诺沙星片段离子色谱图; c. 18 号样品依诺沙星碎片离子色谱图; d. 11 号样品依诺沙星碎片离子色谱图

图 4 阳性样品碎片离子色谱图

Fig.4 Ion chromatogram of positive sample fragments

- 残留[J].分析化学,2021,**49**(5):830-837.
- [12] YAN D, SUPTA D, JOHN P, et al. Simultaneous detection of pesticides and pharmaceuticals in three types of bio-based fertilizers by an improved QuEChERS method coupled with UHPLC-q-TOF-MS/MS[J]. *J. Hazard. Mater.*, 2023, **458**: 131 992-131 992.
- [13] XIANG S Z, DAN L, LEI Z, et al. Development and optimization of a method based on QuEChERS-dSPE followed by UPLC-MS/MS for the simultaneous determination of 21 mycotoxins in nutmeg and related products[J]. *Microchem. J.*, 2021, **168**: 143-151.
- [14] 许芮菡, 谢倩文, 李旭军, 等. 基于多壁碳纳米管改进 QuEChERS 法结合气相色谱-串联质谱检测茶叶中 10 种拟除虫菊酯类农药残留[J]. 色谱, 2022, **40**(5): 469-476.
- [15] MIN L, PENG X W, XU Z, et al. Development of a modified QuEChERS method based on magnetic multi-walled carbon nanotubes as a clean-up adsorbent for the analysis of heterocyclic aromatic amines in braised sauce beef[J]. *Foods*, 2022, **12**(1): 138-146.
- [16] 陈泽宇, 刘静, 蒲春生, 等. 表面活性剂分散多壁碳纳米管机理及性能评价[J]. 精细化工, 2022, **39**(2): 269-275; 410.
- [17] 赵兴兴, 于水利, 王哲. 氧氟沙星在碳纳米管上的吸附机制研究[J]. 环境科学, 2014, **35**(2): 663-668.
- [18] HAO Z, MEI Y Z, QIAN Q C, et al. Determination of amphenicol antibiotic residues in aquaculture products by response surface methodology modified QuEChERS method combined with UPLC-MS/MS[J]. *Microchem. J.*, 2023, **190**: 68-76.
- [19] 郭添荣, 吴文林, 万渝平, 等. HLB 净化/高分辨液质联用法快速筛查动物肝脏中 45 种兽药残留[J]. 中国食品学报, 2022, **22**(7): 287-299.
- [20] 郭海霞, 肖桂英, 张喜庆, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测猪肉中 121 种兽药[J]. 色谱, 2015, **33**(12): 1 242-1 250.
- [21] 杨艳梅, 李晋栋, 秦曙. QuEChERS/超高效液相色谱-串联质谱法同时检测土壤中的农药及抗生素残留[J]. 分析测试学报, 2023, **42**(7): 808-816.
- [22] 王立丹. QuEChERS 结合超高效液相色谱-高分辨质谱法测定畜禽产品中兽药残留的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- [23] 马凯, 杨昌彪, 崔姗姗, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定豆芽中 96 种药物残留[J]. 食品与发酵工业, 2023, **49**(12): 251-261.
- [24] 洪妍妍, 陈海玲, 王翠玲, 等. 样品前处理 QuEChERS 法及新型吸附材料在水产品中抗生素残留分析中的应用进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, **13**(21): 6 898-6 906.
- [25] 连玉晶, 周一冉, 孙欣, 等. 基于胺基功能化磁性纳米粒子改进 QuEChERS 方法结合 GC-MS/MS 检测果蔬中 7 种农药残留[J]. 食品科学, 2021, **42**(4): 297-304.
- [26] 王鹤佳, 郝利华, 谷红, 等. 《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》(GB 31650—2019) 的解读[J]. 中国兽药杂志, 2021, **55**(10): 64-72.

离子色谱法测定 9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖中碘化钠残留量

朱向国,王立勇,张晓康,马庆华*,郑佳
(北京智飞绿竹生物制药有限公司,北京 100176)

摘要:建立检测 9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖中碘化钠残留量的离子色谱方法,并进行验证。以 Dionex IonPac AS11-HC 阴离子交换层析柱为分析柱,Dionex IonPac AG11-HC 阴离子交换柱为保护柱;采用低浓度氢氧化钠溶液为淋洗液等度洗脱,以电化学检测器进行检测。碘化钠的质量浓度在 0.01~1.00 $\mu\text{g/mL}$ 的范围具有良好的线性关系,决定系数 R^2 可达到 0.999 9,检出限为 0.002 $\mu\text{g/mL}$,定量限为 0.010 $\mu\text{g/mL}$ 。3 个型别肺炎球菌多糖在低、中、高 3 个加标水平下的平均回收率为 94.40%~103.91%,相对标准偏差(RSD)为 0.17%~1.71%,均满足检测要求。方法无需复杂的样品前处理过程,测定快速,灵敏度高,结果准确,重复性好,可用于 9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖中痕量碘化钠残留的检测。

关键词:肺炎球菌多糖;离子色谱;电化学检测器;碘化钠;残留检测

中图分类号:O65 文献标识码:A 文章编号:0258-3283(2024)06-0107-05

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0012

Determination of Sodium Iodide Residue in the Type 9V, 11A or 19A Pneumococcal Polysaccharides by Ion Chromatography ZHU Xiang-guo, WANG Li-yong, ZHANG Xiao-kang, MA Qing-hua*, ZHENG Jia (Beijing ZhifeiLvzhu Biopharmaceutical Co., Ltd., Beijing 100176, China)

Abstract: An ion chromatography method was developed for the determination of sodium iodide in the serotype 9V, 11A or 19A pneumococcal polysaccharides. In the proposed method, a Dionex IonPac AS11-HC anion exchange chromatography column and a Dionex IonPac AG11-HC anion exchange column was used as analytical column and guard column, isocratic elution was performed with low-concentration sodium hydroxide solution, and a sodium iodide was quantitatively detected with an electrochemical detector. Good linear relation ship was found to sodium iodide in the range of 0.01~1.00 $\mu\text{g/mL}$ with a coefficient (R^2) at 0.999 9. The limit of detection was 0.002 $\mu\text{g/mL}$ and the limit of quantitation was 0.010 $\mu\text{g/mL}$. The recoveries at low, medium and high spiking levels ranged from 94.40%~103.91%, with the relative standard deviations of 0.17%~1.71%. The method was proved as simple, rapid, sensitive, accuracy and repeatable, which is suitable for the determination of trace sodium iodide in the serotype 9V, 11A or 19A pneumococcal polysaccharides.

Key words: pneumococcal polysaccharides; ion chromatography; electrochemical detector; sodium iodide; residue detection

肺炎链球菌是一种兼性厌氧的革兰阳性致病细菌,广泛分布于自然界,可引起脑膜炎、肺炎、中耳炎、鼻窦炎等肺炎链球菌疾病^[1,2]。肺炎球菌多糖是存在于肺炎链球菌表面的主要毒力因子之一,由于其高度抗原特异性而成为生产各种肺炎类疫苗的基本成分^[3]。目前市面上常见的肺炎球菌多糖制备工艺,大多是使用乙醇沉淀核酸,再利用苯酚抽提法去除蛋白完成肺炎球菌多糖的精制,工艺过程中引入的乙醇和苯酚等危险、高毒性物质残留会影响产品的安全性^[4]。北京智飞绿竹生物制药有限公司对肺炎球菌多糖的生产工艺进行技术创新,采用十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)沉淀、氯化钠解离、碘化钠沉淀以及超滤、层析等一系列过程来完成肺炎球菌多糖的制备与纯化,

以获得安全高效且免疫原性优良的肺炎球菌多糖疫苗^[5]。

碘化钠(Sodium Iodide)作为 CTAB 沉淀剂而被引入到肺炎球菌多糖的生产工艺中。碘化钠溶液通过电离产生碘离子,降低 CTAB 的临界胶束浓度而使其沉降析出,而残余的 CTAB 与碘化钠可采用超滤纯化技术去除。目前对碘离子检测的

收稿日期:2024-01-06;网络首发日期:2024-04-03

作者简介:朱向国(1984-),男,山东济宁人,学士,中级工程师,主要从事生物制品质量控制工作。

通讯作者:马庆华, E-mail: maqinghua@zhifeishengwu.com。

引用本文:朱向国,王立勇,张晓康,等.离子色谱法测定 9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖中碘化钠残留量[J].化学试剂,2024,46(6):107-111。

方法有滴定法^[6]、分光光度法^[7,8]及电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)^[9-13]等。其中滴定法的检测限和定量限较低,不适用于碘化钠残留量的检测;由于肺炎球菌多糖里的糖类物质与碘化钠的紫外吸收波长接近^[8],使用分光光度法检测容易造成测定结果偏高,不建议用于肺炎球菌多糖中碘化钠的检测;ICP-MS作为近年来新发展起来的检测碘离子重要分析方法,虽然具有高灵敏度和高通量的优势,但由于样品制备困难而使其难以推广^[14-16]。相比上述几种检测方法,离子色谱法具有较高的分离效率和精密度,无需复杂的样品前处理,即可完成对碘化钠残留量的测定。

本研究旨在建立检测 9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖中碘化钠含量的离子色谱方法,并对该方法进行理论验证,以验证的离子色谱法对上述型别肺炎球菌多糖中碘化钠残留量进行痕量分析。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

ICS-6000 型离子色谱仪、Multifuge X4R Pro 型台式离心机(美国赛默飞世尔科技公司);MSA225P-1CE-DI 十万分之一型电子天平(德国赛多利斯公司);Dionex IonPac AS11-HC 型阴离子交换层析柱(4×250 mm)、Dionex IonPac AG11-HC 阴离子交换保护柱(4×50 mm)(美国戴安公司);Macrosep 型离心过滤器(10 KD,美国颇尔公司);0.45 μm 水系滤膜(上海泰欧生物科技有限公司)。

氢氧化钠溶液(质量分数 50%,阿法埃沙(中国)化学有限公司);无水碘化钠(≥99.0%,国药集团化学试剂有限公司)。

9V 型肺炎球菌多糖(批号:层析前 20230901T9V)、11A 型肺炎球菌多糖(批号:层析前 20231001T11A)、19A 型肺炎球菌多糖(批号:层析前 20230901T19A)、肺炎球菌多糖溶液(北京智飞绿竹生物制药有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

1.2.1.1 淋洗液配制

40 mmol/L 氢氧化钠溶液配制:量取 13 mL 50%氢氧化钠溶液并用超纯水定容至 1 L,置于 22~42 kPa 的氮气环境保存。

1.2.1.2 对照品溶液配制

碘化钠对照品溶液的配制:精确称取 0.1 g

无水碘化钠粉末置于 100 mL 容量瓶中,淋洗液定容并摇晃均匀,配成质量浓度为 1 000 μg/mL 的碘化钠对照品储备液。

碘化钠标准曲线工作液的配制:取一定量的碘化钠对照溶液,用淋洗液逐级稀释,配制成终浓度为 0.01、0.04、0.06、0.10、0.40、0.60、1.00 μg/mL 的工作液,现配现用。

1.2.2 供试品处理

将 9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖溶液置于离心过滤器中,以 8 500 r/min 的转速离心 1 h,收集滤出液,以 0.45 μm 水系滤膜过滤后,待测。

1.2.3 色谱条件

色谱柱:Dionex IonpacAS11-HC 型阴离子层析柱(4×250 mm)、Dionex IonPac AG11-HC 型保护柱(4×50 mm);淋洗液:40 mmol/L 氢氧化钠溶液;进样体积:25 μL;流速:1.5 mL/min;柱温:30 ℃;检测时间:20 min;检测器:安培检测器(Ag 电极,Ag/AgCl 参比电极);电位波形:积分脉冲安培检测,波形条件见表 1。

表 1 检测电位波形

Tab.1 Detector of potential waveforms

序号	时间/s	电压/V	积分
1	0.000 0	-0.100 0	关闭
2	0.200 0	-0.100 0	开启
3	0.900 0	-0.100 0	关闭
4	0.910 0	-1.000 0	关闭
5	0.930 0	-0.300 0	关闭
6	1.000 0	-0.300 0	关闭

1.2.4 数据处理

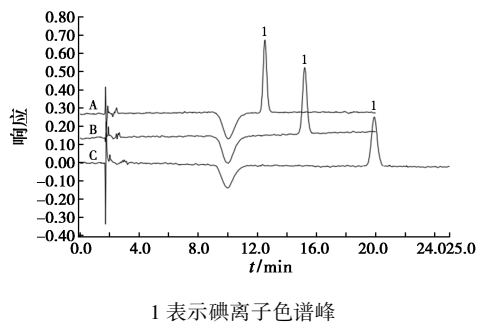
使用 Chromeleon 7 软件处理结果图谱,采用 Excel 进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 淋洗液浓度的选择

离子色谱测定 9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖中碘化钠含量时,分别采用 30、40 和 50 mmol/L 3 种不同浓度的氢氧化钠溶液对碘离子出峰情况进行考察,色谱图结果如图 1 所示。

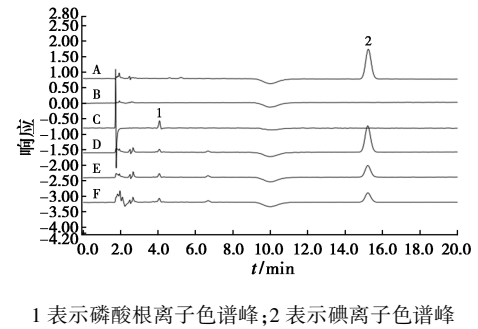
结果表明,当淋洗液浓度为 50 mmol/L 时,碘离子的出峰位置附近存在水负峰而影响碘离子的积分;当淋洗液浓度降到 30 和 40 mmol/L 时,水负峰已不能干扰碘离子的出峰,综合考虑分离效果和检测时间,选择 40 mmol/L 氢氧化钠作为碘离子检测的淋洗液浓度。



1 表示碘离子色谱峰
A、B、C 分别为 30、40、50 mmol/L 氢氧化钠溶液
图 1 不同浓度氢氧化钠淋洗液的出峰结果比较
Fig.1 Comparison of chromatographic peaks of different concentrations elutions of sodium hydroxide

2.2 方法的专属性

以 40 mmol/L 氢氧化钠作为空白对照,按 1.2.3 色谱条件,分别对 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液、碘化钠对照品溶液及各型供试品溶液进行测定,色谱图结果如图 2 所示。



1 表示磷酸根离子色谱峰;2 表示碘离子色谱峰
A:0.1 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液;B:空白对照;C:5 mmol/L 磷酸盐缓冲液;D:9V 型肺炎多糖溶液;E:11A 型肺炎多糖溶液;
F:19A 型肺炎多糖溶液
图 2 专属性验证色谱图

Fig.2 Chromatogram for verification of specificity

结果表明,碘化钠溶液、9V 型肺炎多糖溶液、11A 型肺炎多糖溶液、19A 型肺炎多糖溶液在相应位置均出现明显的碘离子色谱峰,而磷酸盐缓冲液和空白对照无对应色谱峰出现,并且磷酸根离子不影响目标离子出峰,表明该方法专属性良好。

2.3 方法的线性及范围

按 1.2.1 配制碘化钠标准曲线工作液,按照确定的色谱条件进样,平行检测 6 次,考察方法的线性和范围。以样品的质量浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,进行线性回归,计算决定系数 (R^2),结果见表 1。

结果表明,碘化钠在 0.01~1.00 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。在稀释剂的选择上,相较于去离子水,选择 40 mmol/L 的

表 2 线性回归方程及决定系数

Tab.2 Linear regression equation and correlation coefficient (n=6)

序号	线性方程	决定系数 (R^2)	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	$Y=3.434\ 3X-0.004\ 0$	1.000 0	0.01~1.00
2	$Y=3.417\ 7X-0.003\ 6$	1.000 0	0.01~1.00
3	$Y=3.513\ 2X-0.006\ 6$	0.999 9	0.01~1.00
4	$Y=3.442\ 3X-0.004\ 1$	0.999 9	0.01~1.00
5	$Y=3.457\ 7X-0.003\ 1$	0.999 9	0.01~1.00
6	$Y=3.294\ 3X-0.001\ 5$	0.999 9	0.01~1.00

氢氧化钠作为稀释剂,可以得到决定系数 R^2 更大的对照品标准曲线, R^2 可达到 0.999 9,大大提高了测量值的可信程度,这可能是由于氢氧化钠提供的 OH^- 离子可抑制碘离子的氧化所致。

2.4 方法的检出限及定量限

逐步稀释 1.2.1.2 配制的 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的碘化钠对照品储备液,按确定的色谱条件进样,以碘离子色谱峰信噪比 (S/N) ≥ 3 确定检出限, $S/N \geq 10$ 确定定量限,见表 3。

表 3 检出限及定量限测定结果

Tab.3 Determination results of the detection limit and the quantitation limit (n=6)

碘离子浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	S/N					
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 6 次
0.002	3.2	3.3	3.3	3.2	3.2	3.1
0.010	13.0	23.6	14.1	13.0	16.9	10.9

结果显示,6 份 0.002 及 0.010 $\mu\text{g/mL}$ 对照品平行检测的 S/N 范围分别为 3.1~3.3 和 10.9~23.6,确定方法的检出限及定量限分别为 0.002 和 0.010 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 方法的准确度和精密度

精确称取 9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖溶液离心滤出液,进行 3 水平加标回收实验,加标含量分别为 0.01、0.05、0.10 $\mu\text{g/mL}$,每个水平做 3 次平行实验,记录色谱图,测得量与理论值的比值即为回收率,结果如表 4~6 所示。

表 4 9V 型肺炎球菌多糖的准确度与精密度验证结果

Tab.4 Validation results of accuracy and precision of serotype 9V pneumococcal polysaccharide (n=3)

本底值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测得量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.042 5	0.01	0.050 9	96.85	98.27	1.34
		0.052 3	99.45		
		0.051 8	98.51		

续表

本底值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测得量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.042 6	0.05	0.088 9	96.00	95.67	0.58
		0.088 8	95.97		
		0.088 0	95.03		
0.042 3	0.10	0.134 4	94.47	94.40	0.17
		0.134 1	94.22		
		0.134 5	94.51		

表 5 11A 型肺炎球菌多糖的准确度与精密度验证结果

Tab.5 Validation results of accuracy and precision of serotype 11A pneumococcal polysaccharide ($n=3$)

本底值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测得量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.0199	0.01	0.030 6	102.65	102.59	1.71
		0.031 1	104.31		
		0.030 1	100.80		
0.0200	0.05	0.068 4	97.77	98.02	0.21
		0.068 7	98.14		
		0.068 7	98.14		
0.0200	0.10	0.115 6	96.41	96.46	0.38
		0.116 2	96.84		
		0.115 3	96.12		

表 6 19A 型肺炎球菌多糖的准确度与精密度验证结果

Tab.6 Validation results of accuracy and precision of serotype 19A pneumococcal polysaccharide ($n=3$)

本底值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测得量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.016 9	0.01	0.027 9	103.70	103.91	0.65
		0.027 8	103.37		
		0.028 2	104.67		
0.016 7	0.05	0.066 7	99.93	100.66	0.63
		0.067 4	101.02		
		0.067 4	101.02		
0.016 9	0.10	0.116 6	99.71	99.88	0.34
		0.117 2	100.28		
		0.116 5	99.66		

结果表明,9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖溶液的相对标准偏差均小于 2%,平均回收率为 94.22%~104.67%,符合分析要求,证明该方法准确、可靠、精密度高。

2.6 方法的耐用性

采用 Dionex IonpacAS11-HC 型阴离子层析柱(4×250 mm)和 Dionex IonPac AG11-HC 型保护柱(4×50 mm),取同一份供试品溶液,平行测试 3 次,考察该方法在(30±5)℃的柱温条件下的耐用性,计算 RSD 和相对误差(RE),结果见表 7~9。

表 10 方法的初步应用

Tab.10 Preliminary application of developed method

样品	碘化钠含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						RSD/%
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 6 次	
9V 型肺炎多糖	0.089 0	0.088 8	0.089 3	0.088 4	0.088 8	0.088 4	0.42
11A 型肺炎多糖	0.041 6	0.041 2	0.041 3	0.041 0	0.041 9	0.041 9	0.89
19A 型肺炎多糖	0.033 2	0.033 1	0.033 6	0.033 5	0.033 3	0.033 6	0.55

表 7 9V 型肺炎球菌多糖的耐用性验证结果^注Tab.7 Validation results for durability of serotype 9V pneumococcal polysaccharides ($n=3$)

柱温/℃	检测值/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	RE/%
25	0.086 1	2.33	2.66
	0.086 2		
	0.085 8		
30	0.088 3		
	0.088 4		
	0.088 8		
35	0.090 7		
	0.091 3		
	0.090 2		

注:柱温均为(30±5)℃。

表 8 11A 型肺炎球菌多糖的耐用性验证结果^注Tab.8 Validation results for durability of serotype 11A pneumococcal polysaccharides ($n=3$)

柱温/℃	检测值/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	RE/%
25	0.040 8	2.93	3.34
	0.040 9		
	0.040 7		
30	0.041 7		
	0.042 2		
	0.041 9		
35	0.043 7		
	0.043 3		
	0.043 8		

注:柱温均为(30±5)℃。

表 9 19A 型肺炎球菌多糖的耐用性验证结果^注Tab.9 Validation results for durability of serotype 19A pneumococcal polysaccharides ($n=3$)

柱温/℃	检测值/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	RE/%
25	0.032 7	2.63	2.46
	0.032 1		
	0.032 0		
30	0.033 7		
	0.034 3		
	0.033 7		
35	0.034 1		
	0.033 6		
	0.034 1		

注:柱温均为(30±5)℃。

结果表明,色谱柱温度(30±5)℃的 RSD 和 RE 分别小于 3%与 4%,证明本方法的耐用性良好。

2.7 方法的初步应用

用建立的方法分别测定其他批次 9V、11A、19A 型肺炎多糖供试品中碘化钠含量,每种型别制备 6 份平行样品,计算 RSD 值,结果见表 10。

结果显示,对 9V、11A、19A 这 3 种型别肺炎多糖供试品溶液连续检测 6 次,检测结果适应内控要求,RSD 均小于 1%,符合中国药典收录的分析方法指导原则中的数值偏差要求,证明北京智飞绿竹生物制药有限公司研发的肺炎球菌多糖生产工艺技术稳定、质量优良。

3 结论

碘化钠作为一种新型的 CTAB 沉淀剂,优化至肺炎球菌多糖疫苗的生产工艺中,避免了危险性有机乙醇和高毒性苯酚的使用,因此可以得到更为安全有效的肺炎球菌多糖抗原原液。虽然通过后续的超滤工艺理论上可以除去绝大部分碘化钠,但仍需一种准确高效的检测方法来对肺炎球菌多糖中残留的碘化钠含量进行测定以监测多糖质量,但目前尚无针对肺炎球菌多糖中残留碘化钠检测的成熟方法。

本研究建立了离子色谱法检测 9V、11A、19A 型肺炎球菌多糖中碘化钠残留量的方法,使用超滤离心管离心除去分子量较大的多糖与蛋白质,避免大分子物质对 AS11-HC 柱造成损伤,实现大批量肺炎球菌多糖中碘化钠的同时检测。中国 2010 版《药品生产质量管理规范》质量管理的原则中明确要求保证药品的安全、有效和质量可控,肺炎球菌多糖中碘化钠残留量检测方法的建立一方面满足了药品注册的要求,即对所有工艺杂质都能有效监控,另一方面,作为过程控制指标,能够在日常生产或是与工艺有关的验证活动中提供准确的数据,有利于衡量判定生产工艺的稳定性和一致性,对提高产品质量控制能力提供方法基础。

参考文献:

- [1] 李亨,邓文君,张景锋,等.幼儿园儿童年龄与肺炎链球菌疫苗覆盖率间的剂量-反应关系[J].中国当代儿科杂志,2023,25(10):1 059-1 065.
- [2] 宗克强,罗树权,谭小梅.肺炎链球菌荚膜多糖纯化及质量控制方法的研究现状[J].微生物学免疫学进展,2021,49(3):82-87.
- [3] 齐秋焕,黄春华,郑学学,等.顶空气相色谱法测定 6B 型肺炎球菌精制多糖中乙醇、丙酮残留量[J].中国医药导报,2023,20(18):10-14.
- [4] 武晗燕,李文东,赵璇.HPLC 测定肺炎球菌多糖疫苗中的苯酚[J].华西药理学杂志,2023,38(3):329-331.
- [5] 北京智飞绿竹生物制药有限公司,重庆智飞生物制品股份有限公司,安徽智飞龙科马生物制药有限公司.一种 23 价肺炎球菌多糖疫苗的生产工艺:CN202111317637.X[P].2022-03-01.
- [6] 国家药典委员会.中国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [7] 杨小骏,李红.紫外分光光度法测定碘化钠注射液的含量[J].现代应用药学,1995,(4):50.
- [8] 李学枚.亚甲蓝反萃取分光光度法测定碘化物的探讨[J].中国公共卫生,1990,6(9):413-414.
- [9] LIU L J, LI X W, WANG H Y, et al. Reduction of iodate in iodated salt to iodide during cooking with iodine as measured by an improved HPLC/ICP-MS method[J]. *Nat. Clim. Change*, 2017, 7(9):95-100.
- [10] 马康,宋增良,巢静波,等.高效液相色谱串联等离子体发射质谱分析食用色素赤藓红中痕量碘化钠[J].计量学报,2012,33(4):368-371.
- [11] PICOLATO R S, DONEDA M, FLORES E L M, et al. Simultaneous determination of bromine and iodine in milk powder for adult and infant nutrition by plasma based techniques after digestion using microwave-induced combustion[J]. *Spectrochim. Acta B*, 2015, 107:86-92.
- [12] BARBOSA J T P, SANTOS C M M, BISPO L D S, et al. Bromine, chlorine, and iodine determination in soybean and its products by ICP-MS after digestion using microwave-induced combustion[J]. *Food Anal. Method.*, 2013, 6(4):1 065-1 070.
- [13] LISARB O D, ANGELICA C, FROHLIC H, et al. Determination of bromine and iodine in edible flours by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion[J]. *Microchem. J.*, 2017, 133:246-250.
- [14] GUILLERMO G, JUAN M, MARGARETHA D L, et al. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry[J]. *Spectrochim. Acta B*, 2013, 86:42-49.
- [15] MESKO M F, COSTA V C, PICOLATO R S, et al. Halogen determination in food and biological materials using plasma-based techniques: Challenges and trends of sample preparation[J]. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2016, 31(6):1 243-1 261.
- [16] 任倩倩,李瑜哲,艾波,等.ICP-MS 检测三氟化硼-苯甲醚配合物中 11B 同位素的丰度[J].化学试剂,2022,44(1):123-127.

标准物质与标准品

氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质的研制

夏春,汪圣甲,王海燕,杨倩,李剑*
(青岛市计量技术研究院,山东 青岛 266101)

摘要:介绍了氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质的研制过程。以高纯一氧化氮气体、高纯二氧化硫气体、高纯一氧化碳气体、高纯氮气为原料,采用称量法制备了氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质,采用与同基体国家一级标准物质比较的方法定值。对原料气中的杂质进行了分析,基于傅里叶变换红外光谱分析仪建立了分析方法,对制备的气体标准物质进行了均匀性和稳定性考察。结果表明:研制的氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质均匀性和稳定性良好,浓度特征量值范围为:一氧化氮:200~1 000 $\mu\text{mol/mol}$ 、二氧化硫:200~1 000 $\mu\text{mol/mol}$ 、一氧化碳:1 000~5 000 $\mu\text{mol/mol}$,相对扩展不确定度为 1.5% ($k=2$)。

关键词:一氧化氮;二氧化硫;一氧化碳;标准物质;不确定度;比较法

中图分类号:0657.71 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)06-0112-07

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0819

Preparation of Gas Reference Material For Nitric Oxide, Sulfur Dioxide and Carbon Monoxide in Nitrogen XIA Chun, WANG Sheng-jia, WANG Hai-yan, YANG Qian, LI Jian* (Qingdao Institute of Measurement Technology, Qingdao 266101, China)

Abstract: Preparation of gas reference material of nitric oxide, sulfur dioxide and carbon monoxide mixed in nitrogen was reported. Using high-purity nitric oxide gas, high-purity sulfur dioxide gas, high-purity carbon monoxide gas and high-purity nitrogen as parents gases, the gas reference materials were prepared by gravimetric method, and the values were determined by comparison method. The impurities in the parent gases were analyzed. The comparison method was established based on the Fourier Transform Infrared Spectrometer. The homogeneity and stability of the prepared gas reference materials were investigated. The results showed the homogeneity and stability of the gas reference materials were well. The ranges of property values of nitric oxide, sulfur dioxide and carbon monoxide were 200~1 000 $\mu\text{mol/mol}$, 200~1 000 $\mu\text{mol/mol}$, 1 000~5 000 $\mu\text{mol/mol}$ respectively, with the relative expanded uncertainty 1.5% ($k=2$) for all.

Key words: nitric oxide; sulfur dioxide; carbon monoxide; reference material; uncertainty; comparison method

随着工业经济的发展,工业废气成为环境污染的重要因素之一,在石油石化、冶金等行业生产过程产生的工业废气,含有氮氧化物、二氧化硫和一氧化碳等,容易引发酸雨和光化学烟雾,对环境污染造成严重影响^[1-4]。GB 3095—2012《环境空气质量标准》^[5]规定了氮氧化物、二氧化硫、一氧化碳为大气污染物的监测项目,目前环境监测站、废气排放企业等主要采用在线烟气监测系统对大气污染物进行实时监测,从而为环境评估提供数据基础。在线烟气监测系统测得的数据是否准确是实施有效监测的前提,与日常校准密切相关^[6]。在实际工作中,在线烟气监测系统通常同时测量 NO、SO₂、CO 这 3 种大气污染物,目前主要采用单组分气体标准物质进行校准^[7,8],操作

反复而繁琐,消耗大量的人力和时间。氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳 3 组分气体标准物质可以实现对在线烟气监测系统中多种气体的同步校准,减少工作量,提高工作效率,节约成本。

本文基于经典称量法^[9-11]原理,研制了氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质,基

收稿日期:2023-12-19;网络首发日期:2024-03-22

基金项目:山东计量测试学会科技项目(2022KJ46)。

作者简介:夏春(1967-),男,山东青岛人,学士,研究员,主要研究方向为气体分析计量。

通讯作者:李剑,E-mail:373852865@qq.com。

引用本文:夏春,汪圣甲,王海燕,等.氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质的研制[J].化学试剂,2024,46(6):112-118。

于傅里叶变换红外光谱仪^[12-14]建立了分析方法,并对制备的气体标准物质进行了均匀性和稳定性考察。结果表明所研制的气体标准物质量值准确度高,具有良好的均匀性和稳定性,能够满足固定污染源在线监测系统、烟气分析仪等环境监测仪器检定校准的需求。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

气体充装装置、气瓶混匀装置、XPR15002L 型精密天平(瑞士梅特勒公司);MG6030 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 MKS 公司);8L 铝合金气瓶(抚顺洁能科技有限公司)。

高纯一氧化氮气体(>99.99%)、高纯二氧化硫气体(>99.99%)、高纯一氧化碳气体(>99.995%) (大连大特气体有限公司);高纯氮气(99.999%,液化空气(青岛)有限公司);氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体国家一级标准物质(GBW08807,中国计量科学研究院)。

1.2 气体标准物质的制备

氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质按照 GB/T 5274.1—2018《气体分析校准用混合气体的制备 称量法》^[15] 制备。在称量过程中,采用充装气瓶和参比气瓶交替称量的方法,减小天平系统误差的影响。采用两步稀释的方法制备目标浓度的气体标准物质。标准物质特性量值的浓度范围分别是:一氧化氮:200~1 000 $\mu\text{mol/mol}$ 、二氧化硫:200~1 000 $\mu\text{mol/mol}$ 、一氧化碳:1 000~5 000 $\mu\text{mol/mol}$,在此范围内制备低、中、高 3 个浓度点的氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质,其中低浓度气体标准物质:一氧化氮:200 $\mu\text{mol/mol}$ 、二氧化硫:200 $\mu\text{mol/mol}$ 、一氧化

碳:1 000 $\mu\text{mol/mol}$,中浓度气体标准物质:一氧化氮:500 $\mu\text{mol/mol}$ 、二氧化硫:500 $\mu\text{mol/mol}$ 、一氧化碳:2 500 $\mu\text{mol/mol}$,高浓度气体标准物质:一氧化氮:1 000 $\mu\text{mol/mol}$ 、二氧化硫:1 000 $\mu\text{mol/mol}$ 、一氧化碳:5 000 $\mu\text{mol/mol}$ 。具体制备流程见图 1。

1.3 测量及定值方法

基于傅里叶变换红外光谱分析仪建立了一套气体分析系统,可以同时测量混合气体中的 3 个组分。根据一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳红外吸收峰的位置不同,分别测量出不同气体的浓度,而且能够监测出在配制过程中极易产生的二氧化氮杂质。采用与浓度值相近的同基体一级标准物质比较的方法对混合气体进行定值,按照“a-b-a-b”的方式依次将制备的混合气体和国家一级标准物质通入傅里叶变换红外光谱分析仪中,混合气体的浓度值按公式(1)计算。

$$C_i = (x_{\text{混}}/x_{\text{标}})C_0 \quad (1)$$

式中, C_i 为混合气体浓度, $\mu\text{mol/mol}$; C_0 为气体标准物质浓度, $\mu\text{mol/mol}$; $x_{\text{标}}$ 为气体标准物质仪器响应值; $x_{\text{混}}$ 为混合气体仪器响应值。

分析仪每隔 30 s 显示 1 次测量值,读取连续 10 次测量值,取平均值作为分析仪的响应值。

由于采用单点比较法定值,根据 ISO 12963:2017 对于单点校准法中的要求,当标准气体与被测混合气体浓度有较大差异时,要考虑非线性等因素产生的偏差及不确定度贡献。被测混合气体浓度测得值的不确定度直接来源于参考标准的不确定度,按公式(2)计算。

$$u^2(C_i) = u^2(C_0) + (C_0^2/x_{\text{标}}^2)[u^2(x_{\text{标}}) + u^2(x_{\text{混}})] \quad (2)$$

根据傅里叶变换红外光谱分析仪的测量结果,各组分的 $u_r(x_{\text{标}})$ 、 $u_r(x_{\text{混}})$ 均小于 0.1%,远小于标准气体引入的不确定度 $u_r(C_0)$,可认为 $u(C_i) \approx u^2(C_0)$,非线性等因素产生的偏差及不确定度贡献忽略不计,其中 $u_r(x_{\text{标}})$ 、 $u_r(x_{\text{混}})$ 、 $u_r(C_0)$ 为 $u(x_{\text{标}})$ 、 $u(x_{\text{混}})$ 、 $u(C_0)$ 的相对量。

1.4 傅里叶变换红外光谱图

气体标准物质的测试图如图 2 所示,选取 1 705~1 990 cm^{-1} 为一氧化氮的积分区间,1 035~1 412 cm^{-1} 为二氧化硫的积分区间,2 146~2 160 cm^{-1} 为一氧化碳的积分区间。

1.5 气体制备安全性评估

一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳均属于有毒气

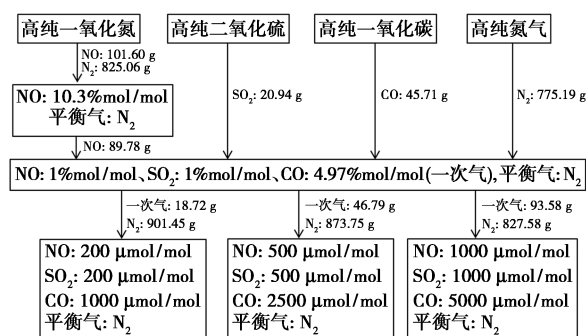


图 1 混合气体制备流程图

Fig.1 Chart of preparation for gas mixtures

表 3 低浓度点 SO₂ 放压试验结果

Tab.3 Results of pressure releasing test of low concentration SO₂

[illegible]

表 4 低浓度点 CO 放压试验结果

Tab.4 Results of pressure releasing test of low concentration CO

[illegible]

表 5 中浓度点 NO 放压试验结果

Tab.5 Results of pressure releasing test of middle concentration NO

[illegible]

表 6 中浓度点 SO₂ 放压试验结果

Tab.6 Results of pressure releasing test of middle concentration SO₂

[illegible]

表 7 中浓度点 CO 放压试验结果

Tab.7 Results of pressure releasing test of middle concentration CO

[illegible]

表 8 高浓度点 NO 放压试验结果

Tab.8 Results of pressure releasing test of high concentration NO

余压/MPa	10	8	6	4	2	1	0.5
$x_{ij}/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	1 001.8	1 002.0	1 002.1	1 002.3	1 002.3	1 002.2	1 002.3
	1 002.0	1 002.1	1 002.1	1 002.1	1 002.2	1 002.3	1 002.2
	1 002.2	1 002.2	1 002.3	1 002.2	1 002.1	1 002.2	1 002.4
$\bar{x}_j/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	1 002.0	1 002.1	1 002.2	1 002.2	1 002.2	1 002.2	1 002.3
$\bar{x}/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	1 002.2						
统计结果: $s_1^2:0.028\ 3, s_2^2:0.013\ 8, \nu_1:6, \nu_2:14, F:2.05, F_{0.05,(6,14)}:2.85$							
标准不确定度 $u_{\text{ps}}:0.070\ \mu\text{mol}/\text{mol}$, 相对标准不确定度 $u_{\text{ps},\text{r}}:0.01\%$							

表 9 高浓度点 SO₂ 放压试验结果Tab.9 Results of pressure releasing test of high concentration SO₂

余压/MPa	10	8	6	4	2	1	0.5
$x_{ij}/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	997.5	997.4	997.2	997.4	997.2	997.3	997.2
	997.4	997.3	997.3	997.5	997.4	997.2	997.3
	997.4	997.5	997.4	997.3	997.2	997.4	997.2
$\bar{x}_j/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	997.4	997.4	997.3	997.4	997.3	997.3	997.2
$\bar{x}/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	997.3						
统计结果: $s_1^2:0.017\ 8, s_2^2:0.008\ 6, \nu_1:6, \nu_2:14, F:2.07, F_{0.05,(6,14)}:2.85$							
标准不确定度 $u_{\text{ps}}:0.055\ \mu\text{mol}/\text{mol}$, 相对标准不确定度 $u_{\text{ps},\text{r}}:0.01\%$							

表 10 高浓度点 CO 放压试验结果

Tab.10 Results of pressure releasing test of high concentration CO

余压/MPa	10	8	6	4	2	1	0.5
$x_{ij}/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	4 980. 7	4 980. 5	4 980. 6	4 980. 3	4 980. 5	4 979. 8	4 980. 3
	4 980. 5	4 979. 7	4 980. 3	4 980. 6	4 980. 1	4 980. 3	4 980. 5
	4 980. 2	4 980. 1	4 980. 7	4 980. 7	4 980. 2	4 979. 7	4 979. 9
$\bar{x}_j/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	4 980. 5	4 980. 1	4 980. 5	4 980. 5	4 980. 3	4 979. 9	4 980. 2
$\bar{x}/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$	4 980. 3						
统计结果: $s_1^2:0.158, s_2^2:0.079, \nu_1:6, \nu_2:14, F:2.01, F_{0.05,(6,14)}:2.85$							
标准不确定度 $u_{\text{res}}:0.162\ \mu\text{mol/mol}$, 相对标准不确定度 $u_{\text{res},r}:0.01\%$							

2.2 长期稳定性考察

采用经典稳定性研究方法(趋势分析)对配制的混合气体进行长期稳定性考察。评估混合气体的量值是否随时间有显著变化,选择 t 检验进行判断,每个浓度点的混合气体各选 1 瓶进行考察。基于先密后疏的原则,共进行了 6 个月的稳定性考查,其稳定性变化及统计检验结果见图 3~5。结果显示,在考察的 6 个月内,各浓度点混合气体中各组分的浓度值均无明显变化趋势,相对标准不确定度见表 11。

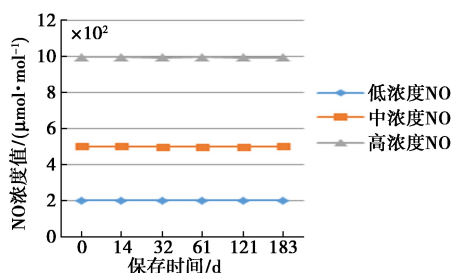


图 3 NO 组分各浓度点长期稳定性分析结果

Fig.3 Results of long term stability test of concentrations NO

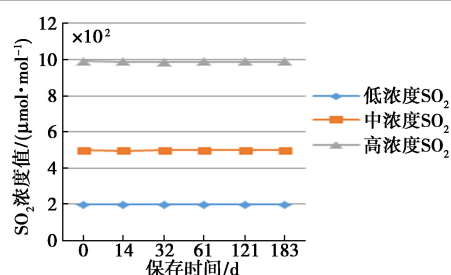
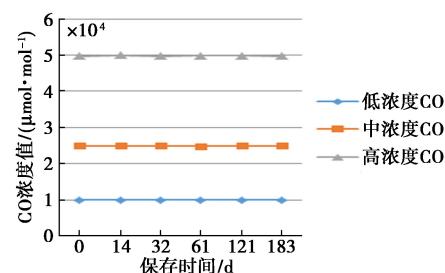
图 4 SO₂ 组分各浓度点长期稳定性分析结果Fig.4 Results of long term stability test of concentrations SO₂

图 5 CO 组分各浓度点长期稳定性分析结果

Fig.5 Results of long term stability test of concentrations NO

表 11 长期稳定性对混合气体各组分特性量值的
相对标准不确定度贡献

Tab.11 Contribution of long term stability to
relative standard uncertainty of characteristic values of
components in gas mixture (%)

混合气体	相对标准不确定度贡献		
	NO	SO ₂	CO
低浓度点	0.10	0.27	0.05
中浓度点	0.18	0.08	0.15
高浓度点	0.21	0.11	0.05

2.3 定值过程引入的不确定度

根据 1.3 中定值方法公式(1),定值过程引入的相对标准不确定度: $u_{\text{anal},r} = u_r(C_i) = \sqrt{u_r^2(x_{\text{标}}) + u_r^2(x_{\text{混}}) + u_r^2(C_0)}$ 。对于相对不确定度 $u_r(x_{\text{标}})$ 、 $u_r(x_{\text{混}})$,可以分别采用 $x_{\text{标}}$ 、 $x_{\text{混}}$ 的相对标准偏差估计,以测量结果的重复性 RSD 表示。 $u_r(C_0)$ 可以引用国家一级标准物质给出的不确定度表示。标准物质和混合气体重复测量 10 次,计算相对不确定度 $u_r(x_{\text{标}})$ 、 $u_r(x_{\text{混}})$,各浓度点不确定度汇总如表 12 所示。

表 12 定值过程中不确定度分量汇总

Tab.12 Summary of uncertainty components
of the fixed value process (%)

混合气体	组分	$u_r(x_A)$	$u_r(x_B)$	$u_r(C_0)$	$u_{\text{anal},r}$
低浓度点	NO	0.03	0.04	0.5	0.51
	SO ₂	0.04	0.03	0.5	0.51
	CO	0.05	0.02	0.5	0.51
中浓度点	NO	0.02	0.02	0.5	0.51
	SO ₂	0.03	0.02	0.5	0.51
	CO	0.03	0.04	0.5	0.51
高浓度点	NO	0.02	0.02	0.5	0.51
	SO ₂	0.03	0.03	0.5	0.51
	CO	0.02	0.05	0.5	0.51

2.4 不确定度汇总

根据 JJF 1344—2012^[16]中要求,气体标准物质定值的不确定度考虑 3 个方面的因素:定值过程引入的不确定度 $u_{\text{anal},r}$ 、均匀性引入的不确定度 $u_{\text{prs},r}$ 、稳定性引入的不确定度 $u_{\text{lis},r}$ 。最终定值的不确定度可以通过公式(3)、(4)获得,各浓度点不确定度汇总见表 13。

相对标准不确定度:

$$u_{\text{CRM},r} = \sqrt{u_{\text{anal},r}^2 + u_{\text{prs},r}^2 + u_{\text{lis},r}^2} \quad (3)$$

相对扩展不确定度:

$$U_{\text{CRM},r} = k \times u_{\text{CRM},r} \quad (4)$$

由表 13 可知,研制的氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质相对扩展不确定度均不大于 1.2%,保守估计确定其相对扩展不确定

度为 1.5%。

表 13 气体标准物质特性量值的不确定度汇总

Tab.13 Uncertainty for characteristic values of
gas standard materials (%)

混合气体	组分	$u_{\text{anal},r}$	$u_{\text{prs},r}$	$u_{\text{lis},r}$	$u_{\text{CRM},r}$	$U_{\text{CRM},r}(k=2)$
低浓度点	NO	0.51	0.02	0.10	0.52	1.1
	SO ₂	0.51	0.02	0.27	0.58	1.2
	CO	0.51	0.01	0.05	0.51	1.1
中浓度点	NO	0.51	0.01	0.18	0.54	1.1
	SO ₂	0.51	0.01	0.08	0.52	1.1
	CO	0.51	0.01	0.15	0.53	1.1
高浓度点	NO	0.51	0.01	0.21	0.55	1.1
	SO ₂	0.51	0.01	0.11	0.52	1.1
	CO	0.51	0.01	0.05	0.51	1.1

3 结论

本文介绍了氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质的研制过程。采用两步称量法制备高中低 3 个浓度点的混合气体标准物质,建立了基于傅里叶变换红外光谱分析仪的分析方法,采用比较法定值,并考察了气体标准物质的均匀性和长期稳定性。结果表明:研制的氮中一氧化氮、二氧化硫、一氧化碳气体标准物质均匀性和稳定性良好,浓度特征量值范围为:一氧化氮:200~1 000 μmol/mol、二氧化硫:200~1 000 μmol/mol、一氧化碳:1 000~5 000 μmol/mol,相对扩展不确定度为 1.5%($k=2$)。能够满足固定污染源在线监测系统、烟气分析仪等环境监测仪器检定校准的需求。

参考文献:

- [1] 楚芳婕,孙爽,李令军,等.2018~2020 年北京市交通监测站点大气污染特征分析[J].中国环境科学,2021,41(12):5 548-5 560.
- [2] 李勇华.大气中二氧化硫和氮氧化物的污染及防治方法[J].资源节约与环保,2015,(12):140.
- [3] 薛文博,武卫玲,雷宇,等.中国高分辨率近地面 NO₂ 浓度反演[J].中国环境监测,2015,31(2):153-156.
- [4] 李名升,任晓霞,周磊,等.中国大气 SO₂ 污染与排放的空间分离分析[J].环境科学学报,2013,33(4):1 150-1 157.
- [5] 环境保护部,国家质量监督检验检疫总局.环境空气质量:GB 3095—2012[S].北京:中国标准出版社,2012-02-29.
- [6] 杨婧,吕怡兵,姜文娟,等.环境空气气态污染物(CO、SO₂、NO)标准气体质量评估[J].中国环境监测,2021,

- 37(6):178-185.
- [7]董璇.环境空气在线监测气体分析仪的校准方法研究[J].计量与测试技术,2021,48(6):85-87;90.
- [8]周泽义,周云畅,郭亮,等.环境空气监测气体分析仪在线校准装置研制[J].化学分析计量,2022,31(3):78-82.
- [9]张体强,胡树国,周枫然,等.机动车排放监测用四元气体标准物质的研制[J].化学试剂,2023,45(1):150-156.
- [10]高冰,王帅斌,杨静,等.纳摩尔级一氧化氮标准气体的制备技术研究[J].化学试剂,2023,45(2):155-160.
- [11]王德发,张体强,韩桥,等.二氧化碳中全氟异丁腈气体标准物质的研制[J].计量学报,2021,42(1):123-128.
- [12]李剑,王德发,夏春,等.傅里叶变换红外光谱法同步测量气体污染物的研究[J].计量技术,2018,(4):6-9.
- [13]王德发,周枫然,叶菁,等.FT-IR 在气体标准物质研究中的应用[J].计量科学与技术,2021,65(5):67-76.
- [14]韦云娇,韦欣仪,韦春雨,等.COF/CdS 复合材料的制备及其可见光催化性能研究[J].化学试剂,2022,44(11):1 619-1 626.
- [15]中国国家标准化管理委员会.气体分析校准用混合气体的制备 称量法:GB/T 5274.1—2018[S].北京:中国标准出版社,2018-09-17.
- [16]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.气体标准物质研制(生产)通用技术要求:JJF 1344—2012[S].北京:中国质检出版社,2012-04-17.