

# 顶空气相色谱法测定硫黄熏蒸中药材中二氧化硫的残留量

郑征伟, 毛北萍, 苗 水, 毛秀红, 季 申\*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

关键词: 硫黄熏蒸; 顶空; 气相色谱; 二氧化硫

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2014) 02-0277-05

## Determination of sulfur dioxide residues in sulfur fumigated Chinese herbs with headspace gas chromatography

JIA Zheng-wei, MAO Bei-ping, MIAO Shui, MAO Xiu-hong, JI Shen\*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** This paper aims to establish a method for the determination of sulfur dioxide in sulfur fumigation Chinese herbs. Sample powder and hydrochloric acid solution were isolated by paraffin layer in order to avoid early reactions, with the generation of sulfur dioxide, headspace with airtight needle was used to transfer sulfur dioxide into gas chromatograph, and detected with thermal conductivity detector. The analytical performance was demonstrated by the analysis of 12 herbs, spiked at four concentration levels. In general, the recoveries ranging from 70% to 110%, with relative standard deviations (RSDs) within 15%, were obtained. The limit of detection (LOD) was below  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Standard addition can be used for low recovery samples. The method is simple, less time-consuming, specific and sensitive. Methods comparison revealed that gas chromatography is better than traditional titration in terms of method operability, accuracy and specificity, showing good application value.

**Key words:** sulfur fumigation; headspace; gas chromatography; sulfur dioxide

硫黄熏蒸作为一种贮藏养护手段在中药材及其饮片的加工过程中极为常见,该步骤不仅可以促进药材的干燥,同时还能防虫、防霉以及漂白增色等<sup>[1]</sup>。但熏蒸同时也会引起中药材有效成分的改变,且不规范使用易造成二氧化硫过度残留,对人体健康构成威胁。因此,国家食品药品监督管理局在 2004 年曾发文指出硫黄熏蒸的中药材为劣质药材。2005 年版《中国药典》(一部)也取消了山药、葛根等中药材的硫熏工艺,并在 2005 年版《中国药典》增补本中增加了二氧化硫残留量的检测方法。基于此,国家食品药品监督管理局于 2011 年组织制订了中药材及

其饮片的二氧化硫残留限量标准,规定山药、牛膝、粉葛等 11 种传统习用硫黄熏蒸的中药材及其饮片,二氧化硫残留量不得超过  $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;其他中药材及其饮片的二氧化硫残留量不得超过  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[2]</sup>。因此,有必要完善中药材中二氧化硫残留量检测方法以保障人民安全用药。

酸蒸馏-碘滴定法为现行中国药典收载的二氧化硫残留量的检测方法<sup>[3]</sup>。原理是通过样品与盐酸溶液反应,经蒸馏二氧化硫逸出,再用水溶液接收,并运用碘和亚硫酸钠的氧化还原反应进行滴定。该方法虽然操作设备简单、成本低,但存在假阳性、准确度差、精密度低、耗时长等问题。其他一些检测方法,如离子色谱法<sup>[4]</sup>,提升了方法的专属性,但仍无法避免蒸馏操作的弊端。因此,本课题根据二氧化硫的性质特

收稿日期: 2013-08-08; 修回日期: 2013-11-05.

基金项目: 科技部重大新药创制资助项目 (2009ZX09502-024).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-50798195, E-mail: jishen2013@163.com

点, 采用了与滴定法相同的反应原理, 研究建立了顶空气相色谱法测定中药材中二氧化硫残留量的方法。通过顶空进样系统将样品与盐酸溶液反应所产生的二氧化硫用气相色谱检测, 成为目前二氧化硫检测方法中最为直接的测定方法。该方法具有操作简单、耗时少、专属性强、灵敏度高、自动化程度高等优点。

由于中药材成分复杂, 不同基质会给测定带来不同程度的干扰, 造成方法的回收率降低, 影响结果的准确性<sup>[5]</sup>。为此, 研究中对不同的基质类型分别进行了考察, 分析影响方法回收率的各种因素。对于一些回收率偏低的样品通过采用标准加入法进行校正, 以保证检测结果的准确性。本研究建立的方法为快速、准确测定二氧化硫残留开拓了新的思路。弥补了常规检测方法的不足, 具有很好的应用价值。

## 材料与方法

**仪器** Agilent 7890A 气相色谱仪, 配 CTC 顶空进样系统和热导检测器 (美国 Agilent 公司)。Sartorius BS2202/TE-612-L/CP225D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

**材料** 所有的试剂和材料至少是分析纯。氯化钠、乙二胺四乙酸二钠、甘露醇和盐酸由国药集团化学试剂有限公司提供。带有磁性密封盖的 20 mL 棕色顶空进样瓶购自美国 Agilent 公司。固体石蜡 (熔点 52~56 °C) 和亚硫酸钠对照品 (纯度>98%) 购自美国 Sigma 公司。供方法学实验所用的中药材均由上海华宇药业有限公司提供。水为去离子水 (电阻率 18.2 MΩ·cm), 临用前需煮沸, 放冷。

**气相色谱条件** 色谱柱: Agilent GS-GASPRO 为固定相的毛细管柱 (柱长 30 m, 柱内径 0.32 mm); 进样口温度: 200 °C; 顶空进样, 采用气密针模式的顶空进样 (气密针温度为 105 °C), 顶空瓶的平衡温度为 80 °C (白芍样品需要的平衡温度为 100 °C), 平衡时间为 10 min。柱温箱: 采用程序升温, 初始 50 °C, 保持 2 min, 以 20 °C·min<sup>-1</sup> 的速率升温至 200 °C, 保持 2 min, 总运行时间 11.5 min; 载气: 高纯氮 (纯度>99.999%), 恒流: 2.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测器温度: 250 °C, 参比气流: 20.0 mL·min<sup>-1</sup>, 补充气: 7.0 mL·min<sup>-1</sup>。

**对照品溶液的制备** 精密称取亚硫酸钠对照品 500 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加入含 0.5% 甘露醇和 0.1% 乙二胺四乙酸二钠的混合溶液溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 制成 50.0 mg·mL<sup>-1</sup> 亚硫酸钠对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 0.1、0.2、0.4、1 和 2 mL, 置

10 mL 量瓶中, 用 0.5% 甘露醇+0.1% EDTA-Na<sub>2</sub> 水溶液分别稀释成亚硫酸钠 0.5、1、2、5 和 10 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品工作溶液。

分别准确称取氯化钠 1 g 和固体石蜡 1 g 于 20 mL 顶空进样瓶中, 精密加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 2 mL, 将顶空瓶置于 60 °C 水浴中, 待固体石蜡全部熔化后取出, 放冷至室温使固体石蜡重新凝固, 分别精密量取上述 0.5、1、2、5 和 10 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品工作溶液各 100 μL 置于石蜡层上方, 密封, 即得。

**供试品溶液的制备** 分别准确称取氯化钠 1 g 和固体石蜡 1 g 于 20 mL 顶空进样瓶中, 精密加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 2 mL, 将顶空瓶置于 60 °C 水浴中, 待固体石蜡全部熔化后取出, 放冷至室温使固体石蜡重新凝固, 取样品细粉约 0.2 g, 精密称定, 置于石蜡层上方, 密封, 即得。

## 结果

### 1 亚硫酸钠对照品溶液的稳定性

亚硫酸钠对照品在固态时较稳定, 而作为抗氧化剂, 一旦配成对照品溶液, 则易迅速氧化, 故需在对照品溶液中添加适量的抗氧化剂以阻止亚硫酸根的氧化<sup>[6]</sup>。分别以 0.5% 甘露醇溶液、0.1% 乙二胺四乙酸二钠溶液、0.5% 维生素 C 溶液和纯水溶液配制成 5 mg·mL<sup>-1</sup> 亚硫酸钠对照品溶液, 进样分析, 结果见图 1。

结果可见, 纯水配制的亚硫酸钠对照品溶液在 72 h 内迅速氧化, 而以甘露醇和乙二胺四乙酸二钠作为稳定剂可使亚硫酸钠对照品溶液在 0~24 h 内基本保持稳定, 但之后仍会缓慢降解, 故对照品溶液应临用时新配, 以 0.5% 甘露醇和 0.1% 乙二胺四乙酸二钠混合溶液作为对照品的配制溶液。

### 2 顶空平衡温度和时间

顶空进样系统中最基本的影响因素是顶空瓶的平衡温度和平衡时间。分别以亚硫酸钠对照品溶液、一个低含量的阳性样品山药和两个高含量的阳性样品白芍和金银花作为考察对象, 计算不同平衡温度 and 不同平衡时间下的二氧化硫含量。结果随着平衡温度的升高, 达到 80 °C 以后, 可以使样品中的二氧化硫基本反应完全, 而对于白芍样品, 则需要 100 °C 来释放结合状态的二氧化硫, 因为经熏蒸后的白芍样品中二氧化硫和芍药苷结合生成了芍药苷亚硫酸酯<sup>[7]</sup>。然而随着平衡温度的升高, 供试品色谱图中水峰会越来越高, 还会出现盐酸的峰, 不适合连续进样

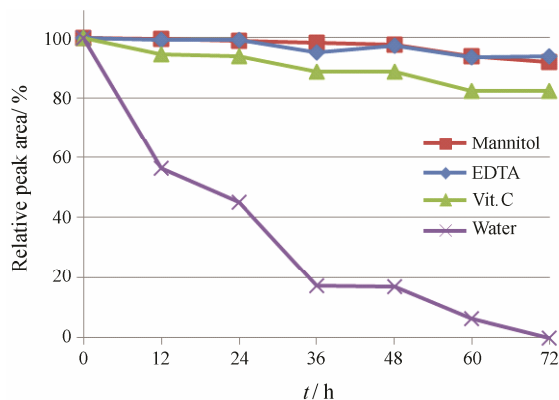


Figure 1 The effect of stabilizer for the reference solution

分析。而平衡时间对于测定结果的影响在各药材中基本表现一致。

综上, 选择 80 ℃作为顶空平衡温度 (白芍样品需要 100 ℃), 平衡时间为 10 min, 即可使样品中的二氧化硫反应达到最高, 处于平衡状态。同时将 CTC 气密针的温度设定为 105 ℃, 可避免大量的水气或盐酸进入气相色谱。

### 3 石蜡封层解决待测样品的稳定性

在前期的方法学考察中, 发现进样盘上等待中的顶空进样瓶内二氧化硫的含量逐渐下降, 如图 2 所示。除亚硫酸钠对照品外, 白芍、金银花和山药样品在 15 h 内的含量下降比较明显, 待测样品的稳定性只有约 2 h 左右。

为了充分发挥气相色谱自动化进样的优势, 对前处理方法作了一定的优化, 用石蜡封层来解决待测样品的稳定性。首先称取固体石蜡约 1 g 置于 20 mL 顶空瓶内, 加入氯化钠 1 g 和盐酸溶液 ( $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2 mL, 然后将顶空瓶置于 60 ℃的水浴中, 使固体石蜡熔化而浮于酸液层的上方。然后取出顶空瓶, 使固体石蜡重新凝固, 再将待测药材置于石蜡层的上方, 从而将药材和盐酸溶液分割开。当顶空瓶加热时, 石蜡层首先熔化, 药材再与酸液混合, 避免提前反应所造成的二氧化硫的损失。

### 4 方法学考察

**4.1 线性关系考察** 分别吸取各对照品溶液 (0.5、1、2、5、10、20 和  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 100  $\mu\text{L}$ , 顶空进样, 测定。以折和后的二氧化硫含量为横坐标 ( $X$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 绘制标准曲线, 进行回归分析。结果表明, 二氧化硫浓度在  $25 \sim 2\,500 \mu\text{g}$  内线性关系良好, 且向上有很好的延伸空间。

**4.2 精密度与重复性** 取  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  亚硫酸钠对照品溶液, 一式六份, 测定精密度。另取金银花样品,

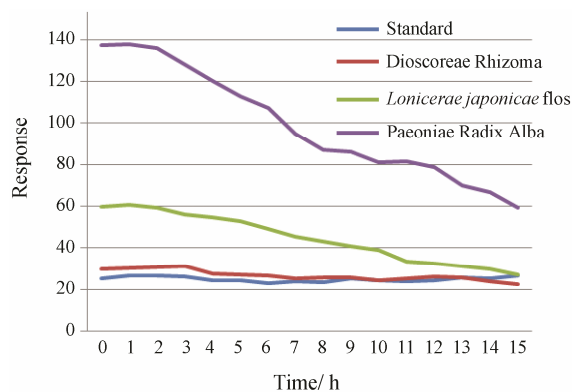


Figure 2 Stability of test samples

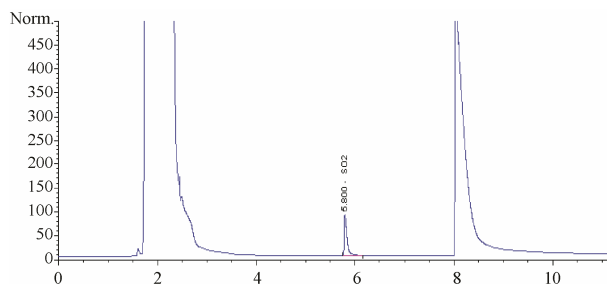


Figure 3 Gas chromatogram of sulfur dioxide

按供试品溶液制备方法平行实验 6 份, 测定。精密度与重复性 RSD 分别为 0.78% 和 1.92%。

**4.3 准确度实验与检测限** 取 12 种经常硫黄熏蒸的中药材样品, 各一式十二份, 以 3 份为一个单位, 分别添加 0.6、1.2、6 和  $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  亚硫酸钠对照品溶液 100  $\mu\text{L}$ , 制备供试品溶液, 进样分析。计算加样回收率, 如表 1 所示。

由于各药材样品在低浓度的添加回收率存在较大差异, 检测限大多在  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  左右, 金银花和甘遂等回收率较低的品种在  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  左右。

### 5 不同检测方法的比较

为了进一步验证方法的可行性, 以部分阳性样品比较滴定法和气相色谱法的测定结果。如表 2 所示, 金银花和山药样品的测定结果基本一致, 而白芍样品的气相法结果要高于滴定法结果, 可能的原因是气相色谱法能达到更高的平衡温度来释放结合态的二氧化硫。此外, 在苦杏仁和炮山甲样品中, 滴定法都存在不同程度的干扰, 而气相色谱法则没有干扰的存在。所以, 气相色谱法在准确性上要优于传统的滴定法, 而且能消除滴定法的一些假阳性干扰。

### 6 样品测定

采用气相色谱法对上海市药材市场上抽检的 97 批次中药材或饮片的二氧化硫残留量进行了检测。结果二氧化硫的检出率为 53%, 不合格率为 34%。部分

**Table 1** Results of accuracy test

Sample	Recovery			
	150 mg·kg <sup>-1</sup>	300 mg·kg <sup>-1</sup>	1 500 mg·kg <sup>-1</sup>	3 000 mg·kg <sup>-1</sup>
Bletilliae Rhizoma	76.2 %	75.8 %	81.6%	96.7%
Paeoniae Radix Alba	82.6%	93.1%	95.4%	98.3%
Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	65.9%	64.7%	73.9%	88.1%
Codonopsis Radix	51.1%	67.6%	77.4%	90.0%
Puerariae Lobatae Radix	80.7%	85.8%	93.9%	94.5%
Dioscoreae Rhizoma	81.1%	93.2%	96.1%	97.7%
Asparagi Radix	95.2%	95.8%	95.5%	101.1%
Trichosanthis Radix	83.1%	88.9%	93.3%	95.2%
Gastrodiae Rhizoma	85.2%	86.2%	87.6%	91.6%
Achyranthis Bidentatae Radix	69.7%	77.5%	93.2%	97.7%
Kansui Radix	31.4%	44.0%	83.7%	86.5%
Lonicerae Japonicae Flos	45.6%	56.2%	81.4%	88.5%

**Table 2** Comparison of results of different methods

Sample	Titration/mg·kg <sup>-1</sup>	GC/mg·kg <sup>-1</sup>
Lonicerae Japonicae Flos-1	76.25	78.40
Lonicerae Japonicae Flos-2	274.29	276.11
Dioscoreae Rhizoma-1	376.73	369.12
Dioscoreae Rhizoma-2	1 146.64	1 155.40
Paeoniae Radix Alba-1	318.68	376.53
Paeoniae Radix Alba-2	671.73	952.69
Armeniacae Semen Amarum-1	148	Not detected
Armeniacae Semen Amarum-2	440	Not detected
Armeniacae Semen Amarum-3	251	Not detected
Armeniacae Semen Amarum-4	308	Not detected
Manis Pentadactyla Linnaeus-1	>400	~250
Manis Pentadactyla Linnaeus-2	>400	~250

经常检出二氧化硫的药材品种有天麻、天冬、白芍、白术、白芨、党参、白芷、金银花等。

## 讨论

二氧化硫是酸性气体，易溶于水，室温下 1 L 水中可以溶解 40 L 二氧化硫。所以在加热状态下的顶空瓶内，二氧化硫在酸液和上层空气中存在动态平衡。为了减少二氧化硫在盐酸溶液中的溶解度，提高顶空的平衡温度而降低二氧化硫的溶解度是方法之一。其二，可以通过提高盐酸溶液的离子强度而减少二氧化硫在其中的溶解度，从而最大限度地提高检测灵敏度。为此，考察了氯化钠、氯化铵、磷酸二氢钠对于离子强度的影响，实验证明，添加 1 g 氯化钠时，离子强度对二氧化硫响应具有明显的促进作用。

在准确度实验中，部分药材在低添加浓度的回收率较低 (<50%)，可能的原因是药材中所含的成分与亚硫酸根或二氧化硫发生了反应。据文献<sup>[8]</sup>报道，

亚硫酸根作为一个很强的亲核试剂，能同含羰基的化合物发生亲核加成反应，这一反应可以被亚硫酸根与甲醛的反应所证实，两者可以结合生成羟甲基磺酸盐，即使加入过量的酸，也不会生成二氧化硫。此外，二氧化硫气体性质也较为活泼，它能和有机酚类化合物发生加成反应，硫黄熏蒸后的菊花、金银花等药材中黄酮类化合物的含量下降，也在一定程度上说明二氧化硫能同黄酮类化合物中的多元酚类结合。但有些结合反应在酸性条件会释放，而有些结合则不可逆。

目前的解决方法是采用标准加入法来校准低回收率的影响。取待分析的阳性样品，分别不作添加、添加 1 倍浓度、添加 2 倍浓度的亚硫酸钠对照品，绘制标准曲线交 X 轴的负截距即为样品中的实际含量。进行标准加入法时，添加的浓度要尽量接近样品中二氧化硫的预估值，这样才能减少低回收率的影响。

## References

- [1] Jiang YH, Liu W, Cao H, et al. Overview of sulfur fumigation of Chinese herbs [J]. Guide China Med (中国医药指南), 2010, 33: 38–40.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Public notification for the limitation of sulfur fumigation residues in Chinese herbal medicines and pieces [J]. Drug Standards China (中国药品标准), 2011, 12: 234.
- [3] State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. 2010 ed. Part I. Beijing: China Medical Science Press, 2010.
- [4] Sun L, Yue ZH, Chen J, et al. Determination of total sulfur dioxide in traditional Chinese medicinal materials by

- ion chromatography [J]. Chin Pharm Affairs (中国药事), 2011, 25: 336–338.
- [5] Zhao Q, Ma XL, Hao LJ, et al. Study of the impact of sulfur fumigation on the active ingredient content in chrysanthemum [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2010, 21: 1418–1420.
- [6] Shi Y, Zhan XC, Lü TP, et al. Determination of oxidation rate constants of antioxidants sodium sulfite, sodium bisulfite and sodium pyrosulfite [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 2006, 64: 496–500.
- [7] Huang SJ, Wang R, Shi HY, et al. Primary safety evaluation of sulfated Paeoniae Radix Alba [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 486–491.
- [8] Lang T. Determination of sulfite in foods by pararosaniline hydrochloride with non-mercury absorption treatment [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2009, 6: 348–350.

## 神威药业：现代中药领航者

神威药业集团创建于 1992 年，是以现代中药为主业的大型综合性企业集团，主营业务涵盖中药材种植、中成药科研、提取、生产、营销等上中下游产业链，拥有现代中药产业园和多个符合国家 GAP 规范的中药材种植基地，是现代中药注射液、软胶囊、颗粒剂专业制造商，产品主要针对中老年用药、儿童用药、抗病毒用药等高速增长的目标市场，下属神威药业有限公司、河北神威药业有限公司、神威药业（张家口）有限公司、神威药业（四川）有限公司、河北神威大药房连锁有限公司等多家子公司。销售网络覆盖全国 30 多个省、自治区、直辖市，产品批量出口。

神威药业集团专注发展现代中药，综合运用指纹图谱、超临界萃取、超微粉碎等新技术，中药动态逆流提取、注射液洗灌封联动生产线、软胶囊全自动包装线等领先工艺设备，广泛应用计算机控制技术，实现了中药生产的标准化、中药剂型的现代化、质量控制的规范化、生产装备的自动化，使神威现代中药产品达到了“安全、有效、稳定、可控”的现代标准。神威设有国家级企业技术中心和院士工作站，拥有通过 CNAS 的“国家实验室认可”质控中心，建成“中药制剂先进工艺集成及生产过程自动控制高技术产业化示范工程”和“中药注射液质量标准化示范工程”等国家高技术产业化示范项目，承担多项科技部课题，成为国家 863 成果产业化基地、国家中药制剂高技术产业化示范基地、国家知识产权试点单位，被国家人事部批准设立博士后科研工作站。

展望未来，神威药业集团将继续专注于现代中药的研发、生产和销售，着重培养以需求为导向的研发、以成本和质量为要求的精益生产、以传统渠道为依托以掌控终端为最终目的的营销、以及以严细求实为核心的神威文化等四个方面的核心竞争力，依托现代中药产业的品牌优势、资本市场优势、管理优势，提升神威现代中药的突出优势，打造国内一流的神威大健康产业园，成为中国最大、盈利能力一流的专业中药制造企业，引领现代中药，推进健康产业。