β-环糊精增敏三维荧光法鉴别真伪五指毛桃

陈立弟，文震，陈庆，何红霞，郑宗坤

(深圳大学化学与环境学院食品科学与工程系，广东深圳 518060)

摘要：为建立药食同源五指毛桃真伪品的三维荧光快速鉴别方法，研究 β-环糊精(β-CD)对五指毛桃提取液的荧光增强作用。五指毛桃提取液在弱酸性条件下与 β-CD 形成主客体超分子化合物，提高了约一个数量级的荧光强度，为五指毛桃的荧光测定创造了条件。考察了五指毛桃与 β-CD 质量比 m[(五指毛桃):m(β-CD)]、敏化体系 pH 值、敏化时间和温度等因素对五指毛桃/β-CD 体系荧光光谱的影响，正交实验确定了敏化最佳条件，即 m(五指毛桃):m(β-CD)=1:10，敏化时间 1 h，pH 值为 4.25，敏化温度 60 ℃。在优化 β-CD 敏化条件下，三维荧光等高线图谱特征、荧光峰位置、强度作为五指毛桃指纹识别的参考依据。建立了 β-CD 敏化三维荧光光谱法鉴定五指毛桃的方法，灵敏度高，重现性好，可应用于五指毛桃的真伪品的快速鉴别。

关键词：三维荧光；五指毛桃；β-环糊精；敏化

文章篇号：1673-9078(2017)5-293-297 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.047

Identification of *Radix Fici hirtae* and Its Adulterants by β-cyclodextrin-sensitized Three-dimensional Fluorescence Spectroscopy

CHEN Li-di, WEN Zhen, CHEN Qing, HE Hong-xia, ZHENG Zong-kun

(Department of Food Science and Engineering, College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: To establish an identification method for *Radix Fici hirtae* (RFH)-a homology of medicine and food—and its adulterants by using three-dimensional fluorescence spectroscopy, the effect of β-cyclodextrin (β-CD) on the enhancement of the fluorescence intensity of RFH extracts was studied. A new supramolecular host-guest compound was formed by β-CD and RFH extracts in a weak-acid medium, and the fluorescence intensity of RFH extracts was improved by an order of magnitude, creating conditions for the determination of the fluorescence of RFH. The influences of mass ratio of RFH to β-CD [m(RFH):m(β-CD)], pH value of the sensitization medium, and sensitization time and temperature on the fluorescence spectra of the RFH/β-CD system were assessed. The optimal sensitization conditions were determined through orthogonal test, and they were as follows: m(RFH):m(β-CD)= 1:10, sensitization time=1 h, pH value= 4.25, and temperature= 60 °C. Under the optimized sensitization conditions, the characteristics of three-dimensional fluorescence contour spectra, characteristic fluorescence peak position, and fluorescence intensity were used as references for the fingerprint identification of RFH. A method to identify RFH using β-CD-sensitized fluorescence spectroscopy was established. This method has a high sensitivity and good reproducibility and can be applied for rapid identification of RFH and its adulterants.

Key words: three-dimensional fluorescence spectroscopy; *Radix Fici hirtae*; β-cyclodextrin; sensitization

五指毛桃(*Radix Fici Hirtae*，RFH)为桑科植物粗叶榕（*Ficushirta Vahl.*）的干燥根，称之为“南芪”，为广东道地中药材，味辛，性甘平，有指健脾补肺、利湿舒筋功能[1]。五指毛桃又是一种食药同源的食材，具有保护胃粘膜，促进微循环的作用，国家卫计委批准将其用作有传统食用习惯的普通食品[2]。五指毛桃药膳味道鲜美，营养丰富，并能产生特殊的椰香，特别是对胃痛、慢性胃炎、支气管炎、气虚贫血及产后少乳等病症都有一定的食疗作用，在华南、东南亚和海外华人区广受欢迎[3,4]。

近年来，由于五指毛桃食品身份认定，市场需求大增。但因五指毛桃生物资源的日益枯竭，市场上出现了“三指毛桃”和“四指毛桃”等不同属种植物，在外观上与五指毛桃很难分辨，质量参差不齐，影响了五指毛桃的食疗作用。由于五指毛桃尚无定量指标，且缺少质量控制标准，需要确定一种快速、简便的五指毛桃鉴别方法。

收稿日期：2016-06-07

基金项目：国家自然科学基金面上项目（21276160）；广东省自然科学基金项目（2015A030313540）；深圳市基础研究项目（JCYJ20150525092941062）

作者简介：陈立弟（1986-），男，硕士生，研究方向：药食同源

通讯作者：文震（1977-），男，博士，教授，研究方向：药食同源

荧光法是中药材有效的鉴别方法，但传统二维荧光光谱不能完整描述物质荧光特性。三维荧光光谱能够获得物质在激发波长和发射波长同时改变情况下的荧光强度，较完整表达药材的指纹光谱信息[5,6]。研究证实，五指毛桃中的补骨脂素、芹菜素、佛手柑内酯等香豆素及黄酮类成分为其主要有效活性成分群，具有荧光特征，但荧光强度弱，难以直接分析[7,8]。β-CD具有内疏水的刚性结构，能与客体分子形成包合物，增强体系的荧光强度[9,10]。本文研究了β-CD对五指毛桃提取液的荧光增强作用，确定了β-CD敏化条件，建立了三维荧光鉴别五指毛桃的方法，样品不需前处理，操作简便、灵敏度高、选择性好，并具有指纹识别功能，为五指毛桃的快速、准确鉴别提供了一种新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料

五指毛桃药材：来源于广东不同地区品种，由深圳海王集团严启新副主任中药师提供并鉴定，对照药材（中国食品药品检定研究院）批号：121486-201202，β-CD，上海阿拉丁生化科技公司，甲醇、磷酸、硼酸、醋酸、氢氧化钠，均为分析纯，天津市永大化学试剂有限公司。Britton-Robinson缓冲溶液：pH 1.8~11.9，由100 mL H_3PO_4-HAc-H_3BO_3三酸混合液（浓度均为0.04 mol/L）加入指定体积的0.2 mol/L的NaOH在酸度计上调准配制。

1.1.2 主要仪器

F-7000型荧光光谱仪（日本日立公司）；PT-10酸度计（德国赛多利斯公司）；电子分析天平（德国赛多利斯公司）；KQ-100DB数控超声波清洗器（昆山市超声仪器公司）。

1.2 实验方法

精密称取中药材五指毛桃粉末0.0500 g，置于25 mL棕色容量瓶中，加入甲醇至刻度，摇匀，超声波提取30 min，0.45 μm滤膜过滤，滤液作为供试样品溶液，使用时加以稀释。准确称取适量β-CD，超声处理30 min，配制成浓度为0.01 mol/L的水溶液。按与药材一定质量比在一系列10 mL容量瓶里分别加入五指毛桃浸提液、β-CD、Britton-Robinson缓冲溶液，定容至刻度，摇匀，测定介质pH值，扫描荧光光谱。

1.3 分析方法

将五指毛桃待测液置于比色皿中，放置在荧光光谱仪中测定。仪器参数设置如下：激发波长(λ_{ex})为200~400 nm，发射波长(λ_{em})为290~550 nm，PMT电压为600 V，扫描光谱进行仪器自动校正，绘制三维等高线荧光光谱图。

2 结果与讨论

2.1 β-CD对五指毛桃荧光强度的增强作用

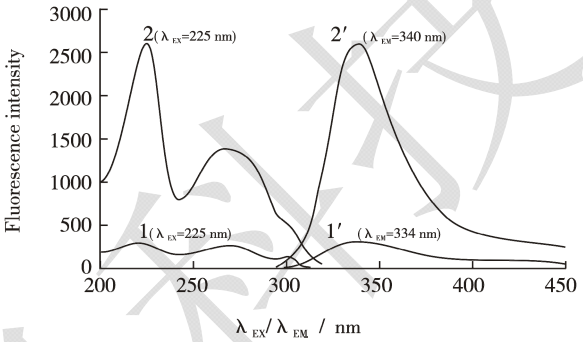


图1 五指毛桃(1，1')与β-CD敏化体系(2，2')的荧光图谱

Fig.1 Fluorescence spectra of RFH (1, 1') and RFH/β-CD complex (2, 2') at pH 4.25

对五指毛桃浸提液与五指毛桃/β-CD包合物的激发与发射光谱进行扫描，荧光光谱如图1所示。五指毛桃提取液具有多个荧光特征发射峰，最大激发波长($\lambda_{ex,\,max}$)在225 nm处，最大发射波长($\lambda_{em,\,max}$)为340 nm（图1）。五指毛桃中主要有效成分为补骨脂素和佛手柑内酯等香豆素等成分，其分子结构含有共轭双键体系，具有荧光特征(图1，1')，但因含量低，荧光强度较弱，跟准确分析带来了难度。

加入β-CD后，五指毛桃浸提液发射波长红移至340 nm，表明形成了五指毛桃/β-CD超分子包合物体系[11]。香豆素进入β-CD空腔形成包合物后，β-CD的供电子效应增大了香豆素苯环分子共轭体系的电子云密度，吸光后产生π→π1*电子跃迁，从而增大了其荧光强度[12]。另一方面，在疏水作用、范德华力及氢键力等非共价力驱动下，补骨脂素、佛手柑内酯等香豆素成分向β-CD的窄口端接近，其疏水性酯基及其酚烃基进入β-CD空腔，空腔内结合的水分子被置换出来，使β-CD空腔极性降低，极性头基-O-与β-CD伯羟基形成氢键，在β-CD窄口端形成氢键“封盖”。连接酯基的苯环覆盖在β-CD窄腔口处，其余部分则覆盖到β-CD极性较强的外表面上，从而为空腔中的香豆素分子提供了更为疏水的微环境。β-CD空腔内香豆素分子的运动自由度及水分子的松弛效应大大降低，阻止了碰撞失活，屏蔽了氧的碎灭，从而更加有效地

保护了香豆素分子电子激发态，使体系荧光强度显著增强[13]。增敏后荧光强度提高 10 倍，为五指毛桃分析创造了条件。

2.2 β-CD 敏化影响因素

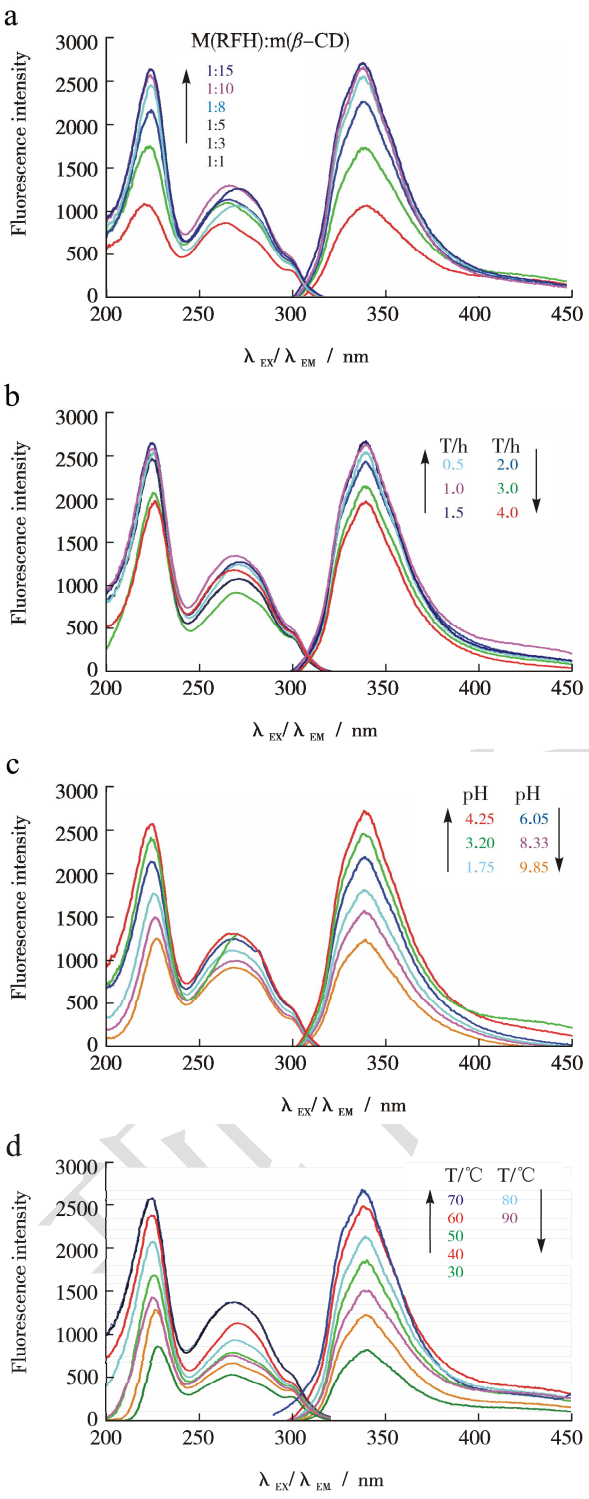


图 2 不同敏化条件下五指毛桃/ β-CD 包合物的荧光光谱

Fig.2 Fluorescence spectra of RFH/β-CD complexes under different sensitization conditions

注: a, m(RFH):m(β-CD); b, Sensitization time; c, pH values; d, Temperatures。

五指毛桃与 β-CD 质量比、pH 值、时间和温度是影响敏化的主要因素，在不同敏化条件下扫描荧光光谱，因素对荧光强度的影响见图 2。随着 β-CD 与五指毛桃质量比[m(五指毛桃):m(β-CD)]的增大，激发、发射峰位置不变，荧光强度逐渐增强。当五指毛桃与 β-CD 与质量比增加到 1:10 时候，荧光强度几乎没有增加，故选择质量比为 1:5~1:10 之间，荧光强度较高且基本稳定(图 2a)。

五指毛桃/β-CD 包合物在敏化 0.5 h 即可达到较大荧光强度，并在 1.5 h 时达到最大。2 h 后包合物体系不稳定而趋于离解，削弱了了 β-CD 疏水性空腔对其药物分子激发态的屏蔽保护作用，荧光强度反而下降，故敏化时间选择在 0.5~1.5 h 为宜(图 2b)。

pH 值对五指毛桃 β-CD 体系的荧光影响较为复杂，在酸性介质中，随 pH 升高，荧光强度逐渐增大，而在中性和碱性条件下，香豆素及其内酯成分随着 pH 的增大发生水解，荧光强度急剧下降。而在 pH=3.20~6.05 弱酸性介质时荧光较强，可满足分析需要（图 2c)。

温度对荧光影响存在转折点，当敏化温度在 30~70 ℃时，随着温度升高，有效成分及其 β-CD 主客体分子运动加剧，更多的成分被 β-CD 包合形成包合物，荧光也随之增强。而随着温度的进一步增加，香豆素及其内酯等有效成分在高温下稳定性下降，体系荧光强度反而呈下降趋势。因此，选择温度为 50~70 ℃，体系达到较为稳定的荧光特性（图 2d)。

2.3 β-CD 敏化条件优化

表 1 五指毛桃/ β-CD 敏化条件正交实验结果

Table 1 Results of the orthogonal experiments for RFH/β-CD complexes

序号	因素				荧光强度/F
	M(RFH):m(β-CD) (a)	pH 值(b)	时间(c)/h	温度(d)/℃	
1	1:5	3.20	0.5	60	1480
2	1:5	4.25	1.0	70	1575
3	1:5	6.05	1.5	80	1238
4	1:8	3.20	1.0	80	1854
5	1:8	4.25	1.5	60	2010
6	1:8	6.05	0.5	70	1984
7	1:10	3.20	1.5	70	2356
8	1:10	4.25	0.5	80	2450
9	1:10	6.05	1.0	60	2590

转下页

接上页

K_1	1431.00	1896.67	1971.33	2026.67
K_2	1949.33	2011.67	2006.33	1971.67
K_3	2465.33	1937.33	1868.00	1847.33
R	1034.33	115.00	138.33	179.33

在已确定的 β-CD 敏化因素范围的基础上，设计四因素三水平的正交试验。以荧光强度为评价指标，确定 β-CD 敏化测定五指毛桃的最优条件，正交结果与方差分析分别见表 1 与表 2。

根据极差与方差结果可知，敏化因素对荧光强度的影响次序为 A>D>C>B，即质量比>温度>时间>pH 值，其中五指毛桃与 β-CD 质量比、温度影响非常显著（p<0.01）。经过方差与极差分析，确定 β-CD 敏化分析五指毛桃的最佳条件为 $A_3B_2C_2D_1$，即 m(五指毛桃):m(β-CD)=1:10，敏化时间 1 h，pH 值为 4.25，敏化温度 60 ℃。

表 2 五指毛桃/ β-CD 敏化条件正交实验方差分析

Table 2 Analysis of orthogonal experiment results for RFH/β-CD complexes

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比值	F_a	显著性（p）
A	1604770.89	2	3.761		<0.01
B	20404.22	2	0.048		>0.05
C	31038.89	2	0.073	$F_{0.01}(2, 2)=99.0$，$F_{0.05}(2, 2)=25.0$	>0.05
D	50644.22	2	0.119		<0.01
误差	1706858.22	8			

2.4 β-CD 增敏三维荧光法鉴别五指毛桃

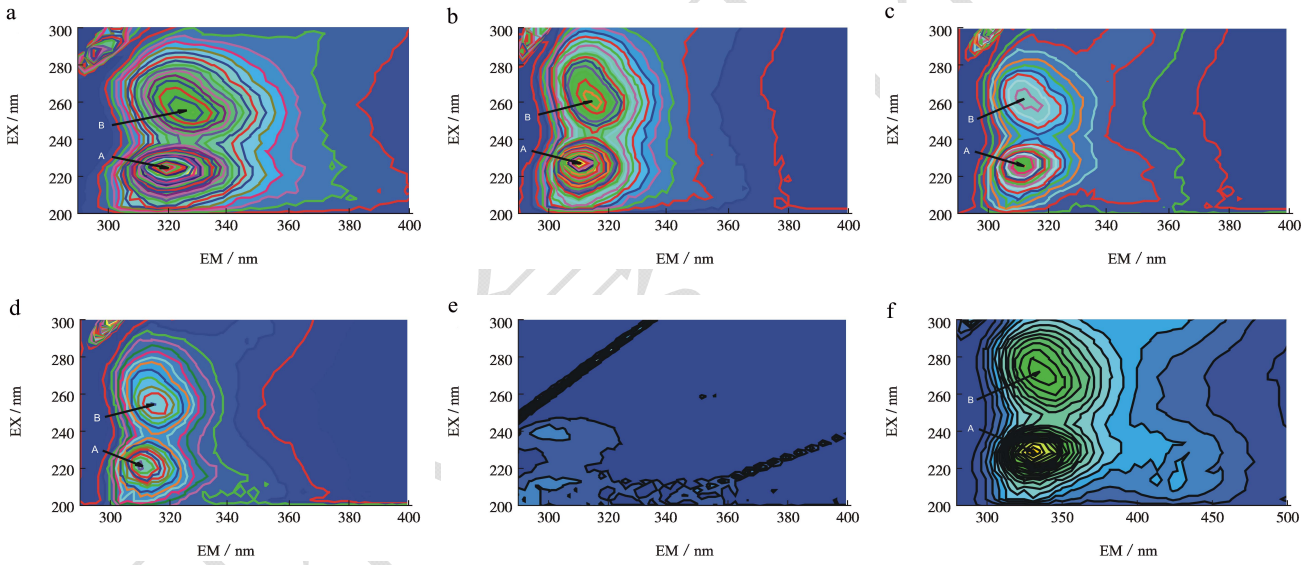


图 3 不同产地五指毛桃的 β-CD 增敏三维等高荧光光谱

Fig.3β-CD-sensitized three-dimensional fluorescence spectra of RFH samples from different origins

注：a，河源；b，揭西；c，化州；d，韶关；e，伪品；f，对照药材。

在所确定的 β-CD 敏化条件下处理不同产地的五指毛桃及其伪品，三维荧光扫描光谱（图 3）。

三维荧光等高线图直观地展现对照药材、不同产地五指毛桃及其伪品的荧光特征。特征荧光峰 A(λ_{ex}，λ_{em})、B(λ_{ex}，λ_{em})及其荧光强度可作为五指毛桃指纹图谱鉴定的参考依据。不同产地五指毛桃的荧光特征峰与对照药材特征峰一致，但荧光强弱有所区别，河源地区的荧光强度最大，这与产自河源的五指毛桃是道地药材，品质最佳有关。而品种VI没有五指毛桃的特征峰，表明是一种伪品，这也与生药学鉴定的结果一致。研究结果表明，三维荧光光谱技术是一种快速鉴别五指毛桃的分析方法，亦可以表征广东不同产地五指毛桃的差异，并达到迅速区分不同品种五指毛桃伪劣的目的。

3 结论

3.1 五指毛桃提取液在弱酸性条件下可以和 β-CD 形成超分子包合物，增强了五指毛桃约 10 倍的荧光强度，为五指毛桃的荧光测定创造了条件。考察了主客体质量比、酸度、反应时间和温度等因素对五指毛桃

-β-CD敏化体系的影响，确定了敏化最佳条件，即m(五指毛桃):m(β-CD)=1:10，敏化时间1 h，pH值为4.25，敏化温度60 ℃。

3.2 基于三维等高线图谱特征、特征荧光峰位置、荧光强度作为五指毛桃指纹图谱鉴定的参考依据，建立了β-CD敏化三维荧光光谱法鉴定五指毛桃的方法。该方法不需对五指毛桃进行复杂的前处理，灵敏度高，重现性好，可应用于五指毛桃真品与伪品的快速鉴别。

参考文献

[1] 刘文啟,严华,李韦,等.五指毛桃生药学研究[J].中草药,2014,45(7):1011-1015
LIU Wen-qi, YAN Hua, LI Wei, et al. Pharmacognostic study on *Ficushirta* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(7): 1011-1015

[2] 国家卫生计生委办公厅.关于五指毛桃有关问题的复函,国卫办食品函〔2014〕205号

[3] 石添香,林玉雅,罗明,等.五指毛桃入药膳的HPLC特征指纹图谱研究[J].现代食品科技,2013,29(2):401-404
SHI Tian-xiang, LIN Yu-ya, LUO Ming, et al. HPLC fingerprint of *Radix Fici* in medicated diet [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(2): 401-404

[4] 邬伟魁,陈繁华,严倩茹,等.梅州客家民间医药研究概述[J].中国中药杂志,2013,38(22):3984-3987
WU Wei-kui, CHEN Fan-hua, YAN Qian-ru, et al. Study on folk medicine used by Hakka in Meizhou [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(22): 3984-3987

[5] Fan Y C, Li Y, Cai H X, et al. Three-dimensional fluorescence characteristics of white chrysanthemum flowers [J]. Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, 130(17): 411-415

[6] 牟新利,高鹏,付川,等.三维荧光中药指纹图谱研究[J].光谱实验室,2010,27(1):180-183
MOU Xin-Li, GAO Peng, Fu Chuan, et al. Study on fingerprint of traditional chinese medicine by three-dimensional fluorescence [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2010, 27(1): 180-183

[7] 杨燕军,代军.HPLC 法测定五指毛桃中补骨脂素、佛手柑内酯、芹菜素的含量[J].南方医科大学学报,2010,11(30):2565-2567
YANG Yan-jun, DAI Jun. High-performance liquid chromatography for determination of psoralene，bergapten and apigenin in *FicushirtaVahl* [J]. Journal of Southern Medical University, 2010, 11(30): 2565-2567

[8] 轧霁,张晓琦,王英,等.五指毛桃黄酮和香豆素类成分研究[J].林产化学与工业,2008,28(6):49-52
YA Ji, ZHANG Xiao-qi, WANG Ying, et al. Studies on flavonoids and coumarins in the roots of *Ficushirtavahl* [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2008, 28(6): 49-52

[9] Fisli H, Bensouilah N, Abdaoui M, et al. Spectrofluorimetric determination of the antineoplastic agent lomustine based on the sensitizing effect of cyclodextrin [J]. Luminescence, 2016, 31(3): 871-880

[10] Ren Q Y, Zhu X S. Methyl-beta-cyclodextrin/cetyltrimethyl ammonium bromide synergistic sensitized fluorescence method for the determination of levofloxacin [J]. Journal of Fluorescence, 2016, 26(2): 671-677

[11] Fumes B H, Guzzo M R, Machado A E H, et al. Study of the mode of inclusion for 7-hydroxyflavone in beta- cyclodextrin complexes [J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2016, 27(2): 382-384

[12] Natesan S, Sowrirajan C, Dhanaraj P, et al. Capping of silybin with beta-cyclodextrin influences its binding with bovine serum albumin: a study by fluorescence spectroscopy and molecular modeling [J]. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2014, 35(7): 2114-2122

[13] Trencanova M G, Jane E, Szocs V, et al. Fluorescence dynamics of monocyclodextrin- and bis(thiol-cyclodextrin)-coumarin C153 complexes [J]. Chemphyschem, 2015, 16(11): 2466-2473