

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.60123

基于香豆素类荧光探针可视化检测食品中氰化物

胡小军¹ 李 政¹ 汪霞丽¹ 张 新¹ 何青科¹ 刘 湘²

(1. 湖南省产商品质量检验研究院, 湖南 长沙 410117; 2. 湖南师范大学, 湖南 长沙 410000)

摘要: [目的] 建立一种基于新型荧光探针的食品中氰化物检测方法。[方法] 基于氰化物的强亲核性, 合成一种新型的反应型香豆素类荧光探针, 分析探针与氰化物的响应机理、反应速率、选择性以及线性关系, 并进行实际样品验证。[结果] 该探针对于氰化物具有优异的选择性, 对氰化物的响应速度较快, 能在 1 min 内反应完全。当探针浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 氰化物的线性范围为 5~90 $\mu\text{mol/L}$, 线性方程 $Y=11.645\ 45+7.014\ 55X$, 检测限为 0.065 $\mu\text{mol/L}$ 。实际样品检测时, 加标回收率为 97.9%~105.0%。[结论] 该探针能够快速、准确检测氰化物。

关键词: 荧光探针; 食品; 氰化物; 香豆素

Visual detection of cyanide in food based on coumarin fluorescent probe

HU Xiaojun¹ LI Zheng¹ WANG Xiali¹ ZHANG Xin¹ HE Qingke¹ LIU Xiang²

(1. Hunan Provincial Institute of Product and Goods Quality Inspection, Changsha, Hunan 410117, China;

2. Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410000, China)

Abstract: [Objective] To develop a method for detecting cyanide in food based on a novel fluorescent probe. [Methods] Based on the strong nucleophilicity of cyanide, a novel reactive coumarin fluorescent probe is synthesized. The response mechanism, reaction rate, selectivity, and linear relationship between the probe and cyanide are analyzed and validated using real samples. [Results] The probe has excellent selectivity for cyanide and demonstrates a rapid response to cyanide, able to complete the reaction within 1 minute. At a probe concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$, the linear range of cyanide detection is 5~90 $\mu\text{mol/L}$, with a linear equation of $Y=11.645\ 45+7.014\ 55X$ and a detection limit of 0.065 $\mu\text{mol/L}$. In actual sample testing, the recovery rate of spiked samples is 97.9%~105.0%. [Conclusion] This probe can quickly and accurately detect cyanide.

Keywords: fluorescent probe; food; cyanide; coumarin

氰化物是一种危害性极强的物质, 极易通过呼吸系统和消化系统被人体吸收, 在人体内易与细胞色素酶中的三价铁结合, 导致细胞组织中氧气传递受阻, 使人体发生中枢性的呼吸性衰竭死亡^[1-3]。世界卫生组织 (WHO) 建议, 饮用水中氰离子浓度上限为 1.9 $\mu\text{mol/L}$ ^[4]。氰化物作为一种重要的化工材料, 在实际生产过程中被广泛应用^[5-6]。随着工业含氰废水废气的随意排放, 人类生存环境被严重破坏。此外, 日常生活中一些食品如木薯、苦杏仁、蒸馏酒及其配制酒等样品中的氰化物对人类健康也存在较大的安全隐患^[7-8]。目前, 常见的氰化物检测方法主要有滴定分析法^[9]、气相色谱法^[10]、高效液相色谱

法^[11]、离子色谱法^[12]、电化学法^[13]、比色法^[14]等, 这些方法操作复杂, 耗时且基质干扰大。相比于这些传统检测方法, 荧光探针^[15-17]因其快速、灵敏度高、操作简便、成本低等优点备受青睐。

目前, 氰化物荧光探针主要包括置换型氰化物荧光探针^[18-20]和化学计量型氰化物荧光探针^[21-24]。面对基质复杂的样品时, 这些荧光探针存在反应速度慢、选择性差、灵敏度不够等缺点。基于氢键作用型和去质子型氰化物荧光探针^[25]往往会受到 F^- 、 OAc^- 等碱性离子的干扰而选择性差, 且难在水中进行检测。

香豆素类衍生物因其特有的结构性质, 表现出优异

基金项目: 湖南省市场监督管理局科技计划项目 (编号: 2024KJJH12)

通信作者: 李政 (1983—), 男, 湖南省产商品质量检验研究院工程师, 硕士。E-mail: 420691653@qq.com

收稿日期: 2024-08-11 **改回日期:** 2024-12-06

引用格式: 胡小军, 李政, 汪霞丽, 等. 基于香豆素类荧光探针可视化检测食品中氰化物[J]. 食品与机械, 2025, 41(3): 45-49.

Citation: HU Xiaojun, LI Zheng, WANG Xiali, et al. Visual detection of cyanide in food based on coumarin fluorescent probe[J]. Food & Machinery, 2025, 41(3): 45-49.

的光学性质,被广泛应用于分析检测领域。研究拟基于氰化物对碳碳双键的亲核加成反应,合成一种新型的香豆素类氰化物荧光探针。以香豆素为荧光基团,在 C=C 双键上引入一个拉电子基团氰基,右侧苯环上引入两个强拉电子基团三氟甲基,通过反应前后的荧光强度变化,实现对食品中氰化物的快速检测,从而为食品安全监管提供有效的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

4-(二乙氨基)水杨醛、3,5-双(三氟甲基)苯乙腈:分析纯,上海安耐吉化学有限公司;

丙二酸、冰醋酸、乙醇、*N,N*-二甲基甲酰胺、三氯氧磷、哌啶、乙腈、石油醚、乙酸乙酯、四氢呋喃等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

水中氰标准溶液:50.0 $\mu\text{g/mL}$,北方伟业计量集团有限公司;

试验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

核磁共振波谱仪:Bruker AVANCE-500 MHz 型,德国 Bruker 公司;

紫外可见分光光度计:UV-2600 型,日本 Shimadzu 公司;

荧光分光光度计:RF-5301PC 型,日本 Shimadzu 公司;

高分辨液相色谱串联质谱仪:Q Exactive Focus/U3000Rs UPLC 型,美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 方法

1.3.1 荧光探针(Z)-2-(3,5-双(三氟甲基)苯基)-3-(7-(二乙氨基)-2-氧代-2H-色烯-3-基)丙烯腈(DCVP-CF₃)的合成 参照文献[26]的方法并修改。分别称取 304 mg 3,5-双(三氟甲基)苯乙腈和 245 mg 7-(二乙氨基)-3-甲酰基香豆素,加入 12 mL 乙腈,加入 3~4 滴哌啶,84 $^{\circ}\text{C}$ 回流 12 h,待反应液冷却后,放入冰箱冷却 30 min,抽滤,用乙腈和温水洗涤,产物为絮状物。初产物进行色谱柱纯化,淋洗剂为石油醚—乙酸乙酯溶液($V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=5:1$),得 246 mg 暗红色絮状物。

1.3.2 产物表征 采用核磁共振氢谱(¹H NMR)、碳谱(¹³C NMR)进行产物表征,以氘代氯仿为溶剂,TMT 为内标物,室温扫描。

1.3.3 荧光光谱试验 将探针溶于 THF 中,制成浓度为 10 mmol/L 的探针储备液,并稀释至 1 mmol/L 工作液。其他阴离子用水配制成 10 mmol/L 的储备溶液;在 THF-H₂O ($V_{\text{THF}}:V_{\text{H}_2\text{O}}$ 为 1:1, 10 mmol/L PBS, pH 7.4)体系中进行荧光光谱试验,探针的最终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,荧光光谱仪激发波长 365 nm,狭缝宽度 10/5 nm。

1.3.4 荧光探针检出限的确定 在不加 CN⁻ 情况下,重

复测试探针溶液 20 次,按式(1)计算该探针的检出限。

$$r = 3\sigma/S, \quad (1)$$

式中:

r ——检出限, $\mu\text{mol/L}$;

σ ——20 次空白溶液的标准偏差, $\mu\text{mol/L}$;

S ——标准曲线方程斜率。

1.4 数据处理

采用 Origin 软件进行数据处理及绘图。

2 结果与分析

2.1 荧光探针 DCVP-CF₃ 的表征

由图 1~图 2 可知,¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.81 (s, 1H), 8.08 (s, 2H), 8.01 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.45 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J=9.0, 2.4$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 3.49 (q, $J=7.1$ Hz, 4H), 1.27 (t, $J=7.1$ Hz, 6H), 氢的种类和数量与荧光探针的一致。¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 161.65, 157.25, 152.77, 142.06, 138.27, 136.79, 133.07, 132.80, 132.53, 132.26, 131.35, 126.27, 125.70, 125.67, 124.09, 122.27, 122.24, 122.21, 121.92, 119.75, 117.57, 112.48, 110.12, 108.49, 105.97, 97.23, 45.25, 12.51, 碳的种类和数量与荧光探针的一致。3,5-双(三氟甲基)苯乙腈上的亚甲基作为一个活泼亚甲基与 7-(二乙氨基)-3-甲酰基香豆素上的醛基发生脱水缩合反应,形成一个 C=C 双键。核磁共振氢谱与碳谱充分证明,通过图 3 合成路线顺利合成了 DCVP-CF₃ 探针分子,该试验线路具有可行性。

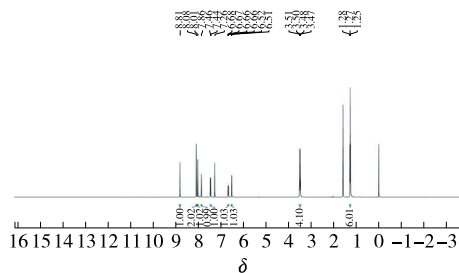


图 1 荧光探针氢谱

Figure 1 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) spectrum of fluorescent probe

2.2 识别机理

由图 4 和图 5 可知,探针本身母离子质谱峰 m/z 481.106 9 和探针与 CN⁻ 反应后的母离子质谱峰 m/z 507.133 0 的差值为 26,正好为一个 CN⁻ 的相对分子质量。其原因在于:探针 DCVP-CF₃ 由香豆素醛与活性亚甲基发生缩合反应得到一个 CN⁻ 的识别位点 C=C 双键,在右边 C=C 双键上的碳上引入一个拉电子基团氰基,苯环上引入两个强拉电子基团三氟甲基,导致左边 C=C 双键上的碳带正电,有利于强亲核试剂 CN⁻ 的进攻,加快了反应速

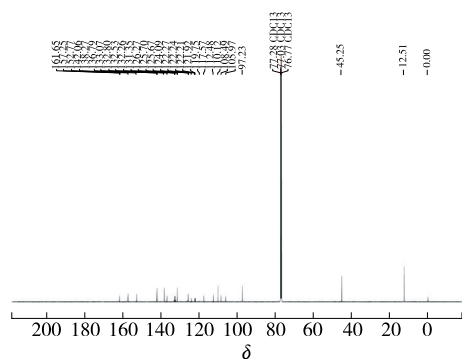


图2 荧光探针碳谱

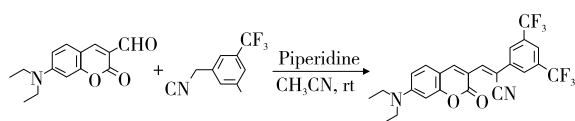
Figure 2 ^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3) spectrum of fluorescent probe

图3 荧光探针合成路线

Figure 3 Synthetic route of fluorescent probe

率。探针本身在 451 nm 处没有荧光,与 CN^- 响应后, 451 nm 处荧光恢复,充分证明该检测机理与图 6 所示响应机理一致。

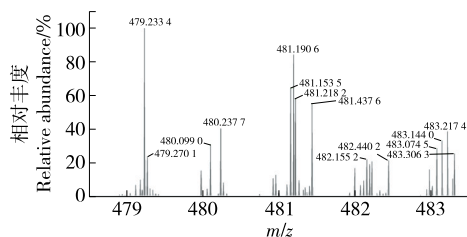
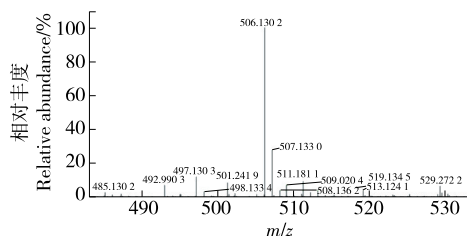


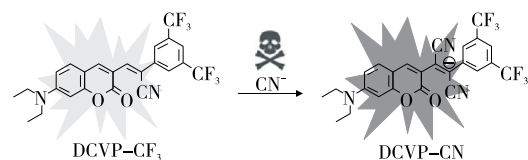
图4 探针质谱图

Figure 4 Mass spectrum of probe

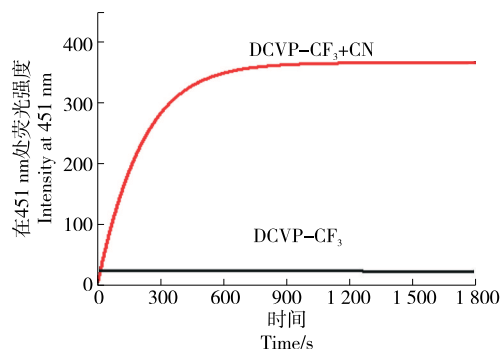
图5 探针与 CN^- 反应后质谱图Figure 5 Mass spectrum of probe after reaction with CN^-

2.3 探针与 CN^- 响应的的时间

由图 7 可知,当探针浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,静止状态下,向 THF 和 PBS 缓冲溶液的混合溶液中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 CN^- ,随着溶液之间的相互渗透,反应持续进行,荧光强度逐渐增强,在 600 s 左右可达平衡。在没有 CN^- 存在

图6 探针与 CN^- 响应机理Figure 6 Reaction mechanism between CN^- and probe

的情况下,探针的荧光强度未发生变化。当探针浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,向 THF 和 PBS 缓冲溶液的混合溶液中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 CN^- ,摇晃一下,溶液立马反应完全,且在 1 min 内达到平衡,说明试验反应迅速,可以使用该探针快速检测 CN^- 。

图7 荧光探针对于 CN^- 的响应时间Figure 7 Response time of fluorescent probe to CN^-

2.4 探针对于 CN^- 的选择性

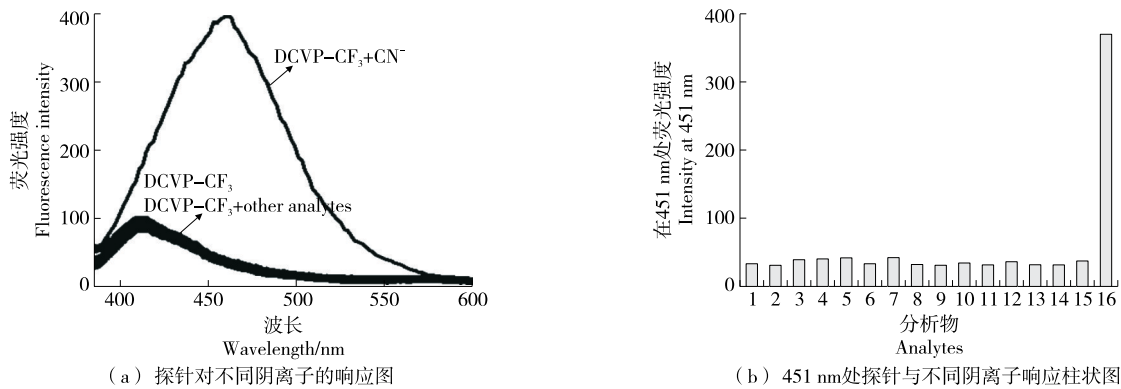
由图 8 可知,探针与 CN^- 反应后,451 nm 处荧光强度大大增强;当加入其他阴离子分析物(NO_2^- 、 SO_4^{2-} 、 Br^- 、 I^- 、 HS^- 、 CO_3^{2-} 、 SCN^- 、 HPO_4^- 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 ClO_3^- 、 F^- 、 HSO_3^- 、 CH_3COO^- 、 CN^-)时,451 nm 处荧光强度未发生明显变化。这主要归因于 CN^- 与探针分子发生特定的亲核加成反应,其他物质不能与探针分子发生反应。综上,该探针对于 CN^- 的响应具有高度选择性。

2.5 探针对于 CN^- 响应的线性分析

由图 9 可知,当体系中没有 CN^- 存在时,混合溶液几乎没有荧光,随着 CN^- 浓度的增大荧光逐渐增强,且荧光强度与 CN^- 浓度在 5~90 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈线性关系,线性方程为 $Y=11.645\,45+7.014\,55X$ ($R^2=0.995\,38$),表明该方程线性良好。方法检出限为 0.065 $\mu\text{mol/L}$,远低于国标方法的检出限,表明该探针能够定量检测 CN^- 。

2.6 探针对于 CN^- 响应的肉眼识别

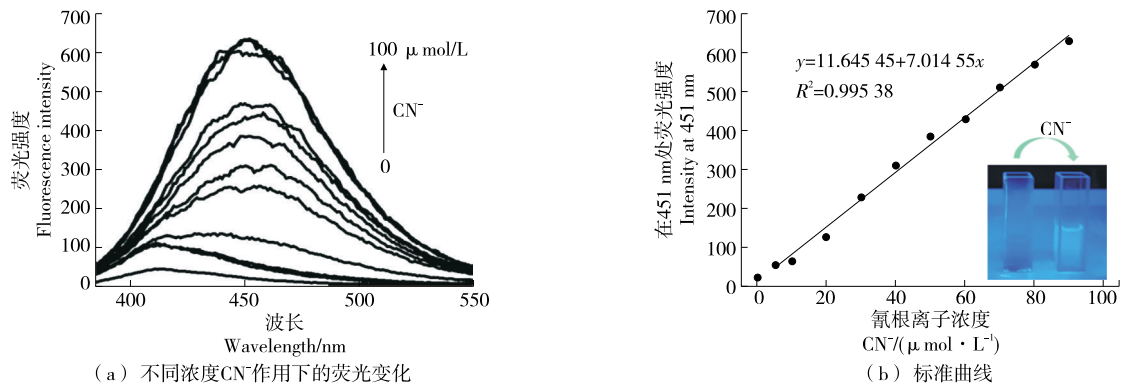
当探针浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,随着 CN^- 浓度的增加,探针与 CN^- 反应后,溶液颜色由浅橙色逐渐变为紫色。这主要是 CN^- 与探针分子发生了亲核加成反应,破坏了原探针分子的共轭体系结构,导致溶液颜色变化明显,表明该探针具有很好的可视化检测 CN^- 的应用价值。



(a) 探针不同阴离子的响应图 (b) 451 nm处探针与不同阴离子响应柱状图
1 为对照组; 2~8 为 NO₂⁻、SO₄²⁻、Br⁻、I⁻、HS⁻、CO₃²⁻、SCN⁻; 9~16 为 HPO₄⁻、Cl⁻、NO₃⁻、ClO₃⁻、F⁻、HSO₃⁻、CH₃COO⁻、CN⁻

图 8 探针对于 CN⁻ 的选择性

Figure 8 Selectivity of probe to CN⁻



(a) 不同浓度CN⁻作用下的荧光变化

(b) 标准曲线

图 9 探针对于 CN⁻ 的响应曲线

Figure 9 Response curve of probe to CN⁻

2.7 实际样品检测

选取日常生活中一些较容易出现氰化物超标的食品作为代表,采用标准加入法测定回收率,结果见表 1。由

表 1 可知,试验方法获得了较好的回收率,为 97.9%~105.0%,与两种国标方法(GB/T 5009.48—2003 和 GB/T 5750.5—2023 的为 98.6%~102.0%)的结果一致,说明试验方法能够用于食品中 CN⁻ 的检测。

3 结论

研究建立了一种新型的检测食品中氰化物的方法。将该方法应用于实际样品中氰化物的检测,取得了较好的效果,准确度与 GB/T 5009.48—2003、GB/T 5750.5—2023 的一致。相比于传统的氰化物检测方法,该方法具有简单、快速、灵敏度高和选择性好等优势;探针与氰离子反应前后溶液的颜色变化明显,有望作为一个快检手段,在日常生活中进行快速、可视化、准确分析氰化物。后续将开发多个类似的探针并通过计算机进行理论计算,进一步分析其与氰化物的响应机理。

参考文献

[1] KWON N, BAEK G, SWAMY K M K, et al. Naphthoimidazolium based ratiometric fluorescent probes for F⁻ and CN⁻, and anion-activated CO₂ sensing[J]. Dyes and Pigments, 2019, 171: 107679.

表 1 实际样品中氰化物的测定结果

Table 1 Determination of CN⁻ in actual samples

样品	加标量/(μmol·L ⁻¹)	测定量/(μmol·L ⁻¹)	回收率/%
湘江水	0	未检出	—
	5	5.15±0.015	103.0
	10	9.79±0.050	97.9
矿泉水	0	未检出	—
	20	20.8±0.03	104.0
	40	41.3±0.18	103.0
白酒	0	未检出	—
	5	4.94±0.024	98.8
	10	9.84±0.030	98.4
配制酒	0	0	—
	20	21.0±0.09	105.0
	40	41.7±0.11	104.0

- [2] KUMAR A, VANITA V, WALIA A, et al. Pyridoanthrone-based chromo-fluorogenic amphiphiles for selective CN^- detection and their bioimaging application[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 304: 127396.
- [3] ERDEMIR S, MALKONDU S. Visual and quantitative detection of CN^- ion in aqueous media by an HBT-Br and thiazolium conjugated fluorometric and colorimetric probe: real samples and useful applications[J]. *Talanta*, 2021, 221: 121639.
- [4] SHAHID M, MISRA A. A simple and sensitive intramolecular charge transfer fluorescent probe to detect CN^- in aqueous media and living cells[J]. *Analytical Methods*, 2013, 5(2): 434-437.
- [5] RAO P G, SARITHA B, RAO T S. Highly selective reaction based colorimetric and fluorometric chemosensors for cyanide detection via ICT off in aqueous solution[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2019, 372: 177-185.
- [6] LOHAR S, DHARA K, ROY P, et al. Highly sensitive ratiometric chemosensor and biomarker for cyanide ions in the aqueous medium[J]. *ACS Omega*, 2018, 3(8): 10 145-10 153.
- [7] XU Z, CHEN X, KIM H N, et al. Sensors for the optical detection of cyanide ion[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(1): 127-137.
- [8] DASH R R, GAUR A, BALOMAJUMDER C. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: a review on biotreatment [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 163(1): 1-11.
- [9] 苑海涛, 周丽华, 关金锁, 等. 镍氰配合物滴定法快速测定高浓度氰化物[J]. *湿法冶金*, 2021, 40(1): 82-85.
YUAN H T, ZHOU L H, GUAN J S, et al. Rapid determination of high concentration cyanide by nickel-cyanide complex titration[J]. *Hydrometallurgy of China*, 2021, 40(1): 82-85.
- [10] SHIN M C, KWON Y S, KIM J H, et al. Validation of an analytical method for cyanide determination in blood, urine, lung, and skin tissues of rats using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) [J]. *Analytical Science & Technology*, 2019, 32(3): 88-95.
- [11] 何维为, 徐灿辉, 何超, 等. 柱前衍生—高效液相色谱法测定酒中的氰化物[J]. *食品与药品*, 2021, 23(2): 128-132.
HE W W, XU C H, HE C, et al. Determination of cyanide in liquor by pre-column derivatization HPLC[J]. *Food and Drug*, 2021, 23(2): 128-132.
- [12] 赵庆武, 刘志新, 高坤, 等. 离子选择电极法测定生活饮用水中氰化物方法的研究[J]. *医学动物防制*, 2018, 34(12): 1 172-1 174.
ZHAO Q W, LIU Z X, GAO K, et al. Study on the method of determining cyanide in drinking water by ion selective electrode[J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2018, 34(12): 1 172-1 174.
- [13] KIM T, KIM H J, SHIN I S, et al. Potential-dependent electrochemiluminescence for selective molecular sensing of cyanide[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(8): 6 019-6 025.
- [14] 李宏达, 宋逸群, 孙倩倩, 等. 基于香豆素并半花菁染料的可视觉检测氰化物试纸的制备及应用研究[J]. *化学世界*, 2021, 62(6): 337-343.
LI H D, SONG Y Q, SUN Q Q, et al. Preparation and application of visual cyanide test paper based on coumarin-cyanine dye[J]. *Chemical World*, 2021, 62(6): 337-343.
- [15] MURUGESAN K, JEYASINGH V, LAKSHMINARAYANAN S, et al. Anion-binding-induced and reduced fluorescence emission (ABIFE & ABRFE): a fluorescent chemo sensor for selective turn-on/off detection of cyanide and fluoride[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 245: 118943.
- [16] LONG L L, HAN Y Y, YUAN X Q, et al. A novel ratiometric near-infrared fluorescent probe for monitoring cyanide in food samples[J]. *Food Chemistry*, 2020, 331: 127359.
- [17] LI M X, GAO Y, XU K, et al. Quantitatively analysis and detection of CN^- in three food samples by a novel nopinone-based fluorescent probe[J]. *Food Chemistry*, 2022, 379: 132153.
- [18] KAUSHIK R, GHOSH A, SINGH A, et al. Selective detection of cyanide in water and biological samples by an off-the-shelf compound[J]. *ACS Sensors*, 2016, 1(10): 1 265-1 271.
- [19] LEE J H, JEONG A R, SHIN I S, et al. Fluorescence turn-on sensor for cyanide based on a cobalt(II) -coumarinylsalen complex[J]. *Organic Letters*, 2010, 12(4): 764-767.
- [20] HU Z Q, DU M, ZHANG L F, et al. A novel colorimetric and fluorescent chemosensor for cyanide ion in aqueous media based on a rhodamine derivative in the presence of Fe^{3+} ion[J]. *Sensors and Actuators B Chemical*, 2014, 192: 439-443.
- [21] LI H D, WEN Z, JIN L Y, et al. A coumarin-Meldrum's acid conjugate based chemodosimetric probe for cyanide[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(95): 11 659-11 661.
- [22] LI H D, LI B, JIN L Y, et al. A rapid responsive and highly selective probe for cyanide in the aqueous environment[J]. *Tetrahedron*, 2011, 67(38): 7 348-7 353.
- [23] KUMAR S, SINGH P, HUNDAL G, et al. A chemodosimeter for ratiometric detection of cyanide in aqueous media and human blood serum[J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(26): 2 667-2 669.
- [24] HUH J O, DO Y, LEE M H. A BODIPY-borane dyad for the selective complexation of cyanide ion[J]. *Organometallics*, 2008, 27(6): 1 022-1 025.
- [25] ZIMMERMANN-DIMER L M, REIS D C, MACHADO C, et al. Chromogenic anionic chemosensors based on protonated merocyanine solvatochromic dyes in trichloromethane and in trichloromethane-water biphasic system[J]. *Tetrahedron*, 2009, 65(21): 4 239-4 248.
- [26] YUE Y K, HUO F J, NING P, et al. Dual-site fluorescent probe for visualizing the metabolism of cys in living cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(8): 3 181-3 185.