

· 化学与分析 ·

硫磺熏蒸当归二氧化硫残留与内在质量变化相关性

段素敏^{1,2,3}, 孔铭^{2,3}, 张艳波⁴, 李秀杨^{2,3}, 刘丽芳^{1*}, 李松林^{2,3*}

(1. 中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009;

2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 南京 210028;

3. 江苏省中医药研究院, 南京 210028; 4. 香港大学中医药学院, 香港 999077)

[摘要] 目的:以探讨经硫磺熏蒸后当归中二氧化硫残留量与硫熏诱导的含硫衍生物量的相关性为目的。方法:采用2010年版《中国药典》第一增补本中的方法对二氧化硫残留量进行动态检测;采用UPLC-QTOF-MS/MS对不同硫磺熏蒸时间当归中的含硫衍生物进行半定量测定;将二氧化硫残留量与含硫衍生物测定结果进行统计学分析。结果:在480 min内,随着硫磺熏蒸时间的增加,二氧化硫残留量呈现先升高后略降,再趋于平缓的趋势;水煎液中含硫衍生物的含量明显高于甲醇提取液,并随硫熏时间延长先升高后缓慢降低。结论:硫磺熏蒸当归二氧化硫残留与含硫衍生物含量无显著相关性,仅以二氧化硫残留量作为硫磺熏蒸当归检控指标值得商榷。

[关键词] 硫磺熏蒸; 当归; 二氧化硫残留量; 含硫衍生物; 相关性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0041-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210041

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0859.002.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 8:59

Correlation Between Sulfur Dioxide Residue and Quality Change of Sulfur-fumigated Angelica Sinensis Radix

DUAN Su-min^{1,2,3}, KONG Ming^{2,3}, ZHANG Yan-bo⁴, LI Xiu-yang^{2,3}, LIU Li-fang^{1*}, LI Song-lin^{2,3*}

(1. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Traditional Chinese Medicine (TCM) Quality Research Room, Nanjing Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of TCM, Nanjing 210028, China;

3. Jiangsu Province Academy of TCM, Nanjing 210028, China;

4. School of Chinese Medicine, University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between sulfur dioxide residue and the content of sulfur-containing derivatives in Angelica Sinensis Radix after sulfur-fumigation. **Method:** The method in *Chinese Pharmacopoeia* (2010 version, the first supplement) was used to determine the dynamic change of sulfur dioxide residue; UPLC-QTOF-MS/MS method was used to quantify the sulfur-containing derivatives at different sulfur-fumigation time points. The determination results of sulfur dioxide residue and sulfur-containing derivatives were statistically analyzed. **Result:** With the increase of sulfur-fumigation duration, sulfur dioxide residue first increased, then reduced and became flat within 480 min. The content of sulfur-containing derivatives in decoction

[收稿日期] 20151111(009)

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2014AA022204);国家自然科学基金项目(81503245);科技部中医药行业科研专项(201307008-2);江苏高校优势学科建设工程项目

[第一作者] 段素敏,在读硕士,从事现代中药分析研究,E-mail:duansumin@hotmail.com

[通讯作者] *刘丽芳,博士,教授,从事现代中药分析研究,Tel:025-86185136,E-mail:liulifang69@126.com;

*李松林,博士,研究员,从事中药药效物质基础、质量控制和新药研发,Tel:025-85639640,E-mail:sonlinli64@126.com

was obviously higher than that in methanol extract, and first increased and then slowly reduced with the increase of sulfur-fumigation duration. **Conclusion:** There is no clear correlation between sulfur dioxide residue and sulfur-containing derivatives in sulfur-fumigated *Angelica Sinensis Radix*. Therefore, sulfur dioxide residue alone might be inadequate to comprehensively evaluate the quality control of sulfur-fumigated *Angelica Sinensis Radix*s.

[**Key words**] sulfur-fumigation; *Angelica Sinensis Radix*; sulfur dioxide residue; sulfur-containing derivatives; correlation

硫磺熏蒸作为一种传统中药材加工方法,其目的是为了药材和饮片更加美观,并且具有防霉、防虫、防腐败的作用,延长药材和饮片的储藏期^[1]。近年来,硫磺熏蒸对药材质量带来的负面影响已引起人们的高度关注^[2]。硫磺熏蒸对药材产生的影响主要包括 3 个方面:①硫磺熏蒸会导致药材二氧化硫残留和重金属超标,对人体产生潜在危害^[3-4];②经过硫磺熏蒸的药材活性成分含量升高或降低^[5];③硫磺熏蒸药材活性成分可能会发生结构转化,产生相应的含硫衍生物^[6]。当前学者对前两个方面的影响研究较多,但对硫磺熏蒸程度对含硫衍生物含量影响研究未见报道。

当归是治疗妇科疾病的传统中药,临床应用极广,具有补血活血、调经止痛、润肠通便的作用^[7]。近年来,当归的硫磺熏蒸情况十分严重,硫磺熏蒸使当归中藁本内酯等活性成分有不同程度的降低^[8]。笔者前期研究表明,硫磺熏蒸导致藁本内酯转化为藁本内酯含硫衍生物^[9],但硫磺熏蒸程度对含硫衍生物量的影响有待进一步研究。

本研究以当归为例,通过笔者前期建立的 UPLC-QTOF-MS/MS 方法^[9],测定不同硫磺熏蒸时间当归中含硫衍生物,并且用峰面积半定量方法分析其与药材中二氧化硫残留的关系,探讨硫磺熏蒸时间对当归中新产生含硫衍生物量的影响,分析二氧化硫残留与含硫衍生物之间的关联性,为硫磺熏蒸中药材的安全监控提供科学依据。

1 材料

ACQUITY UPLC™, Q-TOF SYNAPT G2-S 型质谱仪(美国 Waters 公司); Microfuge 16 型台式微量离心机(美国贝克曼库尔特), AT201 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒公司), KQ-250E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), DJ-02 型灵巧型粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司), 美国 Milli-Q 系列纯水器。DW-2 型调温电热碗(江苏省南通市张芝山镇决心化工电器厂), 二氧化硫残留测定装置(泰康医疗)。

当归鲜药材采自甘肃岷县(编号 JSPACM-15-2,

批号 20141201)。药材由江苏省中医药研究院李松林研究员鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的根。甲醇色谱纯,甲酸质谱纯,超纯水为实验室自制。

2 方法与结果

2.1 不同硫磺熏蒸时间当归样品的制备 取鲜当归切片,摊于纱布包裹的筛网上,按药材与水 1:1 均匀喷洒水,静置 30 min 后,置于密闭容器中进行硫磺熏蒸,分别于各时间点取出适量当归,置于烘箱中,于 50 °C 下干燥 12 h。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 甲醇提取液 精密称取不同硫磺熏蒸时间当归样品粉末(过 40 目筛)0.5 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,室温超声提取 40 min,放冷,称质量,补足减失质量。取上清液于 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,离心 2 次,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

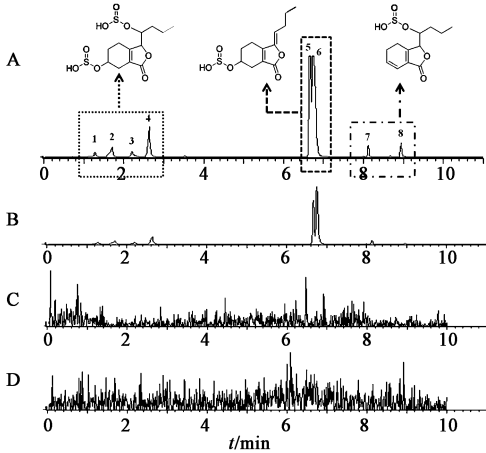
2.2.2 水煎液 精密称取不同硫磺熏蒸时间当归样品粉末(过 40 目筛)0.5 g,置于圆底烧瓶中,准确加入水 50 mL,称定质量,于电热套中回流提取 1 h,冷却至室温,称质量,补足减失质量,过滤,滤液于 70 °C 水浴蒸干,残渣用甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度。取上清液于 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,离心 2 次,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.3 样品分析方法 应用本课题组前期建立的方法^[9],对不同硫磺熏蒸时间当归甲醇提取物及水煎液进行 UPLC-QTOF-MS/MS 分析,针对含硫衍生物的特征性离子(ESI⁻模式下为 m/z 271.06),使用提取离子的方法在不同当归样品中提取此特征性离子,记录各含硫衍生物峰面积,并计算每克样品所含含硫衍生物峰面积;依据 2010 年版《中国药典》第一增补版中二氧化硫残留测定方法,测定各当归样品的二氧化硫残留^[10]。各样品平行测定 3 份,求平均值。

2.4 提取离子法 使用提取离子的方法寻找含硫衍生物,提取特征离子 m/z 271.06。在硫磺熏蒸当归的甲醇提取液及水煎液中均可以提取到含硫衍生物。

物的峰,而非硫磺熏蒸当归的样品中没有提取到此特征离子。硫磺熏蒸当归甲醇提取液及水煎液中均提取到了 8 个含硫衍生物及其异构体,见图 1。

个峰值,之后降低,在 60 min 时达到最大,之后呈现降低的趋势。随硫磺熏蒸时间的延长,各藁本内酯含硫衍生物异构体均有不同程度降低。将甲醇提取液和水煎液比较,在水煎液中的藁本内酯含硫衍生物较甲醇提取液中更多,并且各异构体的含量均高于甲醇提取液。



A. 硫磺熏蒸当归甲醇提取液; B. 硫磺熏蒸当归水煎液; C. 非硫磺熏蒸当归甲醇提取液; D. 非硫磺熏蒸当归水煎液; 1~8 为藁本内酯含硫衍生物及其异构体色谱峰

图 1 不同当归样品提取液离子流及含硫衍生物峰归属

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of different samples and sulfur-containing derivatives to peaks

2.5 不同硫磺熏蒸时间对二氧化硫残留的影响

不同硫磺熏蒸时间当归样品二氧化硫残留量,见图 2。二氧化硫残留在 120 min 内随着硫磺熏蒸时间的延长逐渐增加,在 40 min 之前的样品中,二氧化硫残留均 $< 150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。硫磺熏蒸 40 min 的样品,二氧化硫残留达到了 $306 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。硫磺熏蒸 120 min 时,二氧化硫残留达到最高 ($4\ 412 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),之后略为降低后再次上升。

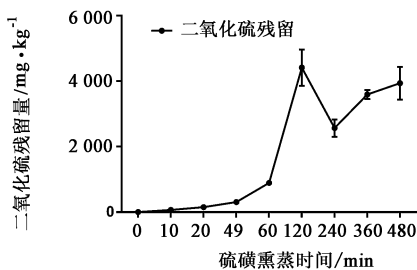
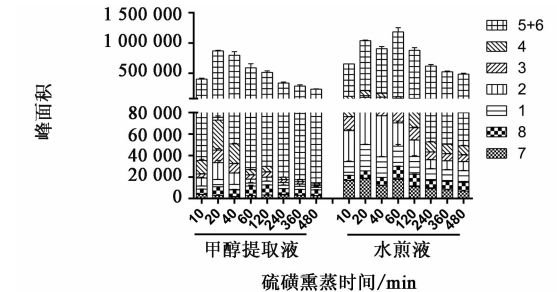


图 2 不同硫磺熏蒸时间当归样品二氧化硫残留量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Trend of sulfur dioxide residue in different samples versus sulfur-fumigation duration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6 不同硫磺熏蒸时间对含硫衍生物的影响

不同硫磺熏蒸时间对含硫衍生物的影响见图 3。藁本内酯含硫衍生物随着硫磺熏蒸时间的延长呈现先上升后降低的趋势。在甲醇提取液中,硫磺熏蒸 20 min 的样品含硫衍生物的量达到最大值,之后又呈现降低的趋势;在水煎液中同样在 20 min 时达到一



1~8. 藁本内酯含硫衍生物及其异构体

图 3 不同硫磺熏蒸时间当归甲醇提取液、水煎液 (1 g) 含硫衍生物峰面积-时间 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Peak area (1 g)-time chart of sulfur-containing derivatives from different sulfur-fumigation duration in methanol extracts and decoction ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

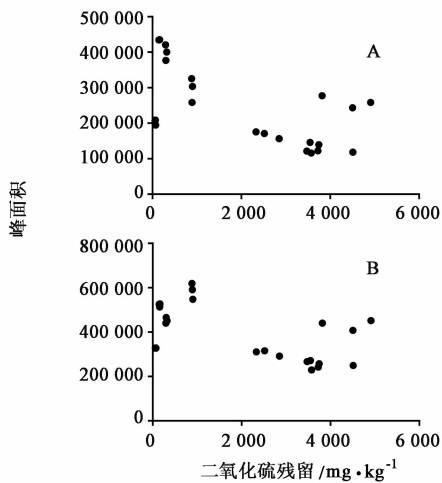
2.7 含硫衍生物与二氧化硫残留量相关性分析

用 SPSS 11.5 软件,对不同硫磺熏蒸时间当归二氧化硫残留与含硫衍生物的量进行相关分析,用 Pearson 相关系数来评价两者之间的相关性,见图 4。数据点均呈现离散分布,两者之间无明显的线性相关性。甲醇提取液中含硫衍生物峰面积与二氧化硫残留的 Pearson 相关系数为 -0.276 ,两者之间存在弱的负相关性,其相关系数检验的概率为 0.163 ($P < 0.01$),认为两者总体为零相关;水煎液中含硫衍生物峰面积与二氧化硫残留的 Pearson 相关系数为 -0.070 ,两者之间存在弱的负相关性,其相关系数检验的概率为 0.728 ($P < 0.01$),认为两者总体为零相关。

3 讨论

笔者前期研究表明,当归在硫磺熏蒸过程中,藁本内酯与 H_2SO_3 发生了加成反应生成含硫衍生物,在硫磺熏蒸当归中共检测到 8 种藁本内酯含硫衍生物^[9]。图 1 中,峰 1~4 为 1 分子藁本内酯加 2 分子 H_2SO_3 。由于存在空间异构,可能生成了 4 种立体异构体的产物;峰 5~8 为 1 分子藁本内酯加 1 分子 H_2SO_3 生成的含硫衍生物及他们的空间异构体。

在当归硫磺熏蒸过程中,含硫衍生物的量随着时间的增加先递增后下降,原因可能是藁本内酯含硫衍生物不稳定,随着时间的增加而不断降解。水



A. 甲醇提取液中含硫衍生物-二氧化硫残留; B. 水煎液中含硫衍生物-二氧化硫残留

图 4 含硫衍生物(1 g)峰面积-二氧化硫残留相关分析散点

Fig. 4 Correlation plot of sulfur-containing derivatives (1 g) - sulfur dioxide residue

煎液中的含硫衍生物的量高于甲醇提取液,可能是在煎煮过程中,药材中吸附的二氧化硫会再次与水反应生成 H_2SO_3 ,进而再次与药材中的藁本内酯发生反应生成含硫衍生物。

二氧化硫残留不一定能反映当归的硫磺熏蒸程度。2010 年版《中国药典》以二氧化硫残留来控制药材的硫磺熏蒸程度,规定当归二氧化硫残留不得超过 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。硫磺熏蒸 40 min 时,二氧化硫残留已经超过了《中国药典》标准。在对硫磺熏蒸鲜当归二氧化硫残留的动态监测中,其含量并不是随硫磺熏蒸时间的延长而不断上升,中间有所下降,这与课题组前期对当归饮片二氧化硫残留监测的结果类似^[8],但时间点有所不同,可能是由于鲜当归细胞并未失活,药材中的成分多存在于细胞壁内部,使得二氧化硫与药材中活性成分反应时间延后。

根据相关性分析结果,二氧化硫残留与含硫衍生物的量在统计学上不存在相关性,即二氧化硫残留与硫磺熏蒸当归的内在质量变化并不存在关联性,提示二氧化硫残留并不一定能反映当归的硫磺熏蒸程度。2010 年版《中国药典》以二氧化硫残留作为硫磺熏蒸中药材的检控指标,但当归二氧化硫残留与其内在质量变化并无显著关联性。因此,仅以二氧化硫残留作为硫磺熏蒸当归的检控指标的合理性值得商榷。

[参考文献]

[1] 段金殿,赵润怀,宿树兰,等. 对硫磺熏蒸药材的基本认识与建议[J]. 中国现代中药, 2011(4): 3-5,14.

[2] 卢晓琳,马逾英,张福卓,等. 不同硫磺熏蒸程度白芷二氧化硫残留量与有效成分含量的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):139-142.

[3] 毛春芹,季琳,陆兔林,等. 中药材硫磺熏蒸后有害物质及其危害研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(15):2801-2806.

[4] 杜向红,杜云锋,刘伟,等. 原子吸收法测定烘干与硫磺熏金银花中的重金属含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(2):63-66.

[5] Kong M, Liu H H, Xu J, et al. Quantitative evaluation of Radix Paeoniae Alba sulfur-fumigated with different durations and purchased from herbal markets: simultaneous determination of twelve components belonging to three chemical types by improved high performance liquid chromatography-diode array detector [J]. J Pharmaceut Biomed, 2014, 98(10): 424-433.

[6] Li S L, Shen H, Zhu L Y, et al. Ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight mass spectrometry based chemical profiling approach to rapidly reveal chemical transformation of sulfur-fumigated medicinal herbs, a case study on white ginseng[J]. J Chromatogr A, 2012, 1231: 31-45.

[7] Bai Y J, Kong M, Xu J D, et al. Effect of different drying methods on the quality of Angelicae Sinensis Radix evaluated through simultaneously determining four types of major bioactive components by high performance liquid chromatography photodiode array detector and ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed, 2014, 94C(6): 77-83.

[8] Duan S M, Xu J, Bai Y J, et al. Sulfur dioxide residue in sulfur-fumigated edible herbs: the fewer, the safer? [J]. Food Chem, 2016, 192: 119-124.

[9] Bai Y J, Xu J D, Kong M, et al. Discovery of characteristic chemical markers for inspecting sulfur-fumigated Radix Angelicae Sinensis by ultra-high performance liquid chromatography - quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics and chemical profiling approach [J]. Food Res Int, 2015, 76(3): 387-394.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 第一增补本[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 262-263.

[责任编辑 顾雪竹]