

# 硫熏当归配方颗粒的安全性检控指标分析

武洁<sup>1,2</sup>, 徐亚运<sup>1</sup>, 孔铭<sup>2</sup>, 李松林<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学附属南京市中西医结合医院, 南京 210028;

2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028)

**[摘要]** 目的:探讨SO<sub>2</sub>残留和藁本内酯含硫衍生物含量作为硫熏当归配方颗粒安全性检控指标的可行性。方法:采用2015年版《中国药典》(四部)通则2331测定SO<sub>2</sub>残留量,采用HPLC-MS/MS半定量检测藁本内酯含硫衍生物的含量,考察当归配方颗粒制剂过程(提取、浓缩和干燥)中SO<sub>2</sub>残留和藁本内酯含硫衍生物的含量转移规律。结果:在硫熏当归提取液、浓缩液和干浸膏中均能检测到SO<sub>2</sub>残留和藁本内酯含硫衍生物,二者在干浸膏中的最终转移率分别为8.13%和60.75%。藁本内酯含硫衍生物在配方颗粒制剂过程中的稳定性及检测方法的专属性和灵敏度均好于SO<sub>2</sub>残留。结论:鉴于SO<sub>2</sub>公认的危害性和藁本内酯含硫衍生物潜在的毒性,可以考虑将藁本内酯含硫衍生物结合SO<sub>2</sub>残留作为硫熏当归配方颗粒的安全性检控指标。

**[关键词]** 当归; 配方颗粒; 硫磺熏蒸; SO<sub>2</sub>残留; 藁本内酯含硫衍生物; 安全性评价

**[中图分类号]** R283.6;R284;TQ450.2;R944.2+7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0020-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018050020

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171213.0851.004.html>

**[网络出版时间]** 2017-12-13 14:06

## Chemical Markers for Safety Control of Sulfur-fumigated Angelicae Sinensis Radix Dispensing Granules

WU Jie<sup>1,2</sup>, XU Ya-yun<sup>1</sup>, KONG Ming<sup>2</sup>, LI Song-lin<sup>1,2\*</sup>

(1. Nanjing Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Nanjing 210028, China;

2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the feasibility of residual SO<sub>2</sub> and sulfite-ligustilide used for the safety control of herbal dispensing granules that contained sulfur-fumigated Angelicae Sinensis Radix. **Method:** Residual SO<sub>2</sub> was determined by the method documented in the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, while sulfite-ligustilide was analyzed semi-quantitatively by HPLC-MS/MS. The mimic Angelicae Sinensis Radix dispensing granules were self-made, and the content transfer rules of residual SO<sub>2</sub> and sulfite-ligustilide in sulfur-fumigated Angelicae Sinensis Radix during preparation procedures of dispensing granules, including extraction, concentration and drying, were systematically investigated. **Result:** Residual SO<sub>2</sub> and sulfite-ligustilide could all be detectable in the samples of extract, concentrate and dry extract, their final transfer ratios in dry extract were 8.13% and 60.75%, respectively. In addition, the stability of sulfite-ligustilide in the preparation procedures of the dispensing granules and the specificity, sensitivity of the detection method were all better than residual SO<sub>2</sub>. **Conclusion:** As the well-recognized harmfulness of SO<sub>2</sub> and potential toxicity of sulfite-ligustilide, it is

**[收稿日期]** 20170926(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81503245,81573596)

**[第一作者]** 武洁, 硕士, 副主任药师, 从事中药质量控制研究, Tel:025-85639640, E-mail:wujie613@hotmail.com

**[通信作者]** \*李松林, 博士, 研究员, 从事中药药效物质基础、质量控制和硫熏药材创新检控方法研究, Tel:025-85639640, E-mail:songlinli64@126.com

suggested that sulfite-ligustilide combined with residual SO<sub>2</sub> could be used as indicators for the safety control of sulfur-fumigated *Angelicae Sinensis Radix* dispensing granules.

[**Key words**] *Angelicae Sinensis Radix*; dispensing granules; sulfur-fumigation; residual SO<sub>2</sub>; sulfite-ligustilide; safety evaluation

中药配方颗粒是以传统中药饮片为原料,经现代化制药技术精制而成的仅供临床调剂用的颗粒状制剂<sup>[1]</sup>。目前,我国已有 34 家药企获得中药配方颗粒试点资格,其中包括 6 家国家级试点企业和 28 家省级试点企业。然而我国迟迟未出台统一的中药配方颗粒质量标准,试点生产企业多遵循本省或本企业的质量标准,这在一定程度上导致了市场中中药配方颗粒质量参差不齐的问题<sup>[2]</sup>。

药材(饮片)质量是影响中药配方颗粒质量的主要因素,但是在药材(饮片)的加工炮制过程中,硫熏药材呈品种蔓延和过度熏蒸之势,不仅导致了药材(饮片)的 SO<sub>2</sub> 残留,而且改变了药材(饮片)的化学组成<sup>[3-5]</sup>,进而改变药材(饮片)的有效性<sup>[6-8]</sup>和安全性<sup>[9-11]</sup>。SO<sub>2</sub> 残留量是当前硫熏药材(饮片)检控的法定指标,但是 SO<sub>2</sub> 会随着药材(饮片)贮藏时间的延长而不断逸失<sup>[12-13]</sup>,易造成假阴性结果。前期研究发现,药材(饮片)硫熏后产生的硫熏特征标志物不仅反映了药材(饮片)内在质量的变化,而且反映了药材(饮片)的硫熏程度,可作为硫熏药材(饮片)的检控指标<sup>[14-17]</sup>,但其能否作为硫熏中药配方颗粒的检控指标,仍有待系统深入的研究。

尽管 2015 年版《中国药典》规定当归不属于传统习用硫磺熏蒸的中药材品种,但是本课题组前期研究发现,当归药材(饮片)硫熏情况依然十分普遍,当归药材(饮片)硫熏后,其活性成分藁本内酯会转化为藁本内酯含硫衍生物<sup>[3,15]</sup>。由于藁本内酯含硫衍生物对照品难以获得,故使用自制硫熏药材(饮片)进行对照分析,这也是课题组前期对硫熏药材(饮片)进行检控的有效方法<sup>[16,18]</sup>。本实验拟以当归为例,按 2015 年版《中国药典》收录的方法测定 SO<sub>2</sub> 残留量,采用 HPLC-MS/MS 半定量检测藁本内酯含硫衍生物,考察当归配方颗粒制剂过程(提取、浓缩和干燥)中 SO<sub>2</sub> 残留和藁本内酯含硫衍生物的含量转移规律,以客观评判 SO<sub>2</sub> 残留和藁本内酯含硫衍生物作为当归配方颗粒安全性检控指标的可行性,为制定合理的检控标准提供科学依据,并为其他硫熏中药配方颗粒质量控制方法的研究提供参考。

## 1 材料

2695 型高效液相色谱-Micromass Quattro micro 型质谱联用仪(美国 Waters 公司),XP6 型 1/100 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),Micromax 型高速离心机(美国 Thermo 公司),FW100 型粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),R-200 型旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司),DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏试验设备有限公司),Milli-Q 型纯水器(美国 Millipore 公司),二氧化硫残留测定装置(湖北泰康医疗设备有限公司)。

当归饮片购自南京松龄中药饮片有限公司,批号 160728,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* 干燥根的炮制饮片,11 批商品当归配方颗粒来源见表 1。水为自制纯水,甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

表 1 商品当归配方颗粒的 SO<sub>2</sub> 残留和藁本内酯含硫衍生物的测定 (n=3)

Table 1 Determination of residual SO<sub>2</sub> and sulfite-ligustilide in commercial *Angelicae Sinensis Radix* dispensing granules (n=3)

No.	样品	生产厂家 <sup>1)</sup>	批号	藁本内酯含硫衍生物
1	当归(尾)配方颗粒	TWSTT	1322308	+
2	当归配方颗粒	TWSTT	15012003	+
3	当归配方颗粒	TWXF	S2900Q1	+
4	当归配方颗粒	TWXF	S2900G1	+
5	当归尾配方颗粒	GXL	47414022	+
6	当归尾配方颗粒	GXL	F16925	+
7	当归配方颗粒	JYTJ	201503	+
8	当归尾配方颗粒	TWKD	421302405	+
9	当归尾配方颗粒	TWKD	421314301	+
10	当归配方颗粒	EG	421302305	-
11	当归配方颗粒	EG	421314301	+

注:<sup>1)</sup>厂家名字采用拼音首字母缩写;样品中均未检测到 SO<sub>2</sub> 残留;“+”表示检测到,“-”表示未检测到。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品的制备

**2.1.1 硫熏当归饮片** 取市售当归饮片,按饮片与水质量比 1:1 均匀喷洒水,浸润后静置 30 min,摊于

纱布包裹的筛网上,置于密闭容器中进行硫磺熏蒸(饮片与硫磺质量比250:1),2 h后取出,置于烘箱中,于50℃干燥6 h。自制硫熏当归饮片装于自封袋内,于室内阴凉干燥处保存。

**2.1.2 饮片供试品溶液** 取过40目筛的硫熏当归饮片粉末0.1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇10 mL,密塞,称定质量,室温超声提取40 min,放冷,加甲醇补足减失的质量,摇匀,于转速15 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,取上清液,即得。

**2.1.3 提取液供试品溶液<sup>[7]</sup>** 取硫熏当归饮片200 g,置于圆底烧瓶中,加8倍量水回流提取1 h,滤过,取滤液,滤渣重复提取1次,合并2次提取液,同法平行制备3份。取提取液0.5 mL,加甲醇至10 mL,按2.1.2项下方法制备,即得。

**2.1.4 浓缩液供试品溶液** 提取液于80℃减压浓缩成1 g·mL<sup>-1</sup>浓缩液,同法平行制备3份。称取浓缩液0.5 mL,加甲醇至10 mL,按2.1.2项下方法制备,即得。

**2.1.5 干浸膏供试品溶液** 浓缩液于真空干燥箱80℃下干燥24 h,至含水量<6%,同法平行制备3份。取干浸膏50 mg,加甲醇溶解并稀释至10 mL,按2.1.2项下方法制备,即得。

**2.1.6 配方颗粒供试品溶液** 称取商品配方颗粒60 mg,加甲醇溶解并稀释至10 mL,按2.1.2项下方法制备,即得,同法平行制备3份。

## 2.2 定量分析

**2.2.1 分析条件** 色谱条件为Agilent Poroshell 120EC-C<sub>18</sub>色谱柱(3.0 mm×100 mm,2.7 μm),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~6 min,10%~40% B,6~8 min,40%~100% B,8~12 min,100% B),流速设定0.35 mL·min<sup>-1</sup>,柱温35℃,样品室温度10℃,进样量5 μL。质谱条件为电喷雾离子化,离子极性为负离子,毛细管电压3 kV,离子源温度120℃,干燥气温度400℃,干燥气流速400 L·h<sup>-1</sup>,碰撞室压力(氩气)0.4 Pa,检测方式为多反应监测(MRM),藁本内酯含硫衍生物在质谱中可产生m/z 271的[M-H]<sup>-</sup>准分子离子和m/z 81的[H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-H]<sup>-</sup>碎片离子<sup>[3,15]</sup>,因此,用于监测藁本内酯含硫衍生物的反应为m/z 271~81。

**2.2.2 专属性考察** 未硫熏和硫熏当归饮片色谱图见图1,藁本内酯含硫衍生物保留时间约6.8 min,结果发现饮片中杂质不干扰该化合物的测定。

**2.2.3 精密度试验** 精密吸取当归饮片供试品溶

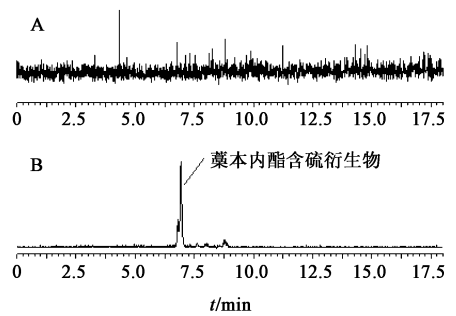


图1 未硫熏当归饮片(A)和硫熏当归饮片(B)的HPLC  
Fig.1 HPLC chromatograms of non-fumigated *Angelicae Sinensis Radix* decoction pieces(A) and sulfur-fumigated *Angelicae Sinensis Radix* decoction pieces(B)

液,按2.2.1项下分析条件连续进样6次,记录藁本内酯含硫衍生物的色谱峰面积,计算峰面积的RSD 2.5%,表明仪器精密度良好。

**2.2.4 重复性试验** 精密称取硫熏当归饮片粉末6份,按2.1.2项下方法平行制备6份供试液,按2.2.1项下分析条件进样分析,记录藁本内酯含硫衍生物的色谱峰面积,因为没有藁本内酯含硫衍生物的对照品,故未计算其质量分数。计算该化合物峰面积的RSD 4.8%,表明该方法重复性良好。

**2.2.5 稳定性试验** 取同一份当归饮片供试品溶液,室温放置,分别于0,2,4,6,8,10,12 h按2.2.1项下分析条件进样分析,记录藁本内酯含硫衍生物的色谱峰面积,计算峰面积的RSD 3.9%,表明供试品溶液室温下放置12 h稳定性良好。

**2.3 SO<sub>2</sub>残留量的测定** 取当归饮片粉末、提取液、浓缩液、干浸膏适量,分别加水至400 mL,依据2015年版《中国药典》SO<sub>2</sub>残留测定法(酸碱滴定法)<sup>[19]</sup>测定样品的SO<sub>2</sub>残留量,各平行测定3份。

**2.4 质量转移规律分析** 当归配方颗粒制剂过程中饮片、提取液、浓缩液和干浸膏中SO<sub>2</sub>残留量和藁本内酯含硫衍生物的半定量测定结果见表2。

表2 当归配方颗粒不同制备阶段中SO<sub>2</sub>残留与藁本内酯含硫衍生物的峰面积( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Contents of residual SO<sub>2</sub> and sulfite-ligustilide in samples obtained from different preparation stages of *Angelicae Sinensis Radix* dispensing granules( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品	SO <sub>2</sub> 残留量/mg·kg <sup>-1</sup>	藁本内酯含硫衍生物峰面积
饮片	769.50 ± 18.87	229 893.57 ± 2 941.22
提取液	165.11 ± 13.88	247 826.60 ± 12 229.09
浓缩液	106.99 ± 8.48	168 570.72 ± 11 506.25
干浸膏	62.56 ± 5.16	139 666.13 ± 4 294.75

由表2可知,当归配方颗粒制剂过程中SO<sub>2</sub>残

留量明显降低,由饮片中的  $769.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  降低至干浸膏中的  $62.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (以饮片计),转移率仅为 8.13% (转移率 = 各不同制备阶段中  $\text{SO}_2$  残留量/饮片中  $\text{SO}_2$  残留量  $\times 100\%$ ),其中提取工序  $\text{SO}_2$  残留量减少 78.54%,是造成  $\text{SO}_2$  残留量转移率低的主要工序。藁本内酯含硫衍生物在制剂过程中呈现先升后降的趋势,提取液中藁本内酯含硫衍生物的含量高于饮片中(107.80%),然而至浓缩和干燥工艺阶段,藁本内酯含硫衍生物的转移率分别降至 73.33% 和 60.75%。

**2.5 样品测定** 11批商品当归配方颗粒均未检测出  $\text{SO}_2$  残留,而10批配方颗粒检测出了藁本内酯含硫衍生物。见表1。

### 3 讨论

中药配方颗粒具有剂量准确、卫生、即冲即服和贮存携带方便等特点,在我国台湾地区已被广泛应用,中药饮片已基本被中药配方颗粒所取代<sup>[2]</sup>。国家对中药配方颗粒的试点生产企业从最初的6家逐步放开至如今的34家,因而制订全国统一的中药配方颗粒质量控制标准已成为当务之急。本研究发现在当归配方颗粒制剂过程中的提取液、浓缩液和干浸膏中均检测到了  $\text{SO}_2$  和藁本内酯含硫衍生物,  $\text{SO}_2$  的最终转移率仅 8.13%,可能原因有2个方面:①提取、浓缩等加热过程中  $\text{SO}_2$  挥发逸失;② $\text{SO}_2$  与水反应生成  $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,进一步与藁本内酯反应生成藁本内酯含硫衍生物。藁本内酯含硫衍生物在制剂过程中呈现先升后降的趋势,提取液中藁本内酯含硫衍生物的量高于饮片中,可能是煎煮过程中,饮片中吸附的  $\text{SO}_2$  与水反应生成  $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,进而再次与饮片中的藁本内酯发生反应生成含硫衍生物。浓缩和干燥工艺阶段,藁本内酯含硫衍生物的转移率降低,这可能与藁本内酯含硫衍生物不稳定,随着受热时间的延长而不断降解。藁本内酯含硫衍生物制剂过程中的最终转移率为 60.75%,从检测指标的稳定性方面来看,其作为硫熏当归配方颗粒的检控指标相比于  $\text{SO}_2$  残留更具优势。

另外,从检测方法的专属性和灵敏度来看,11批商品当归配方颗粒中均未检测到  $\text{SO}_2$  残留,一方面可能是其本身原材料的  $\text{SO}_2$  残留量较低,另一方面可能是制剂成型工序造成了  $\text{SO}_2$  残留的进一步损失。而藁本内酯含硫衍生物的测定采用 HPLC-MS/MS 的 MRM 模式,通过选择特异性母离子和子离子,排除大量干扰离子,降低背景噪音,从而获得良好的专属性和灵敏度。藁本内酯含硫衍生物在质谱

中会发生  $m/z$  271 ~ 81 的离子反应,通过监测色谱图中是否存在离子反应为  $m/z$  271 ~ 81 的色谱峰,即可判断当归配方颗粒是否经过硫熏。11批商品当归配方颗粒除1批外,其余10批均检测出了藁本内酯含硫衍生物,降低了假阴性结果的发生率,因而藁本内酯含硫衍生物作为硫熏当归配方颗粒的检控指标专属性和灵敏度优于  $\text{SO}_2$  残留。

尽管暂未有研究证实藁本内酯含硫衍生物对人体或动物有明显毒性,但硫熏改变了当归配方颗粒的化学成分,进而有可能会改变其活性和安全性,故建议考虑将藁本内酯含硫衍生物结合  $\text{SO}_2$  残留作为硫熏当归配方颗粒的安全性检控指标。当然指标限量的制定还需要对量-效/毒关系以及大样本量商品配方颗粒的定量结果进行深入研究。本研究不仅为硫熏当归配方颗粒质量标准研究提供了理论依据,也可为其他硫熏中药配方颗粒的质量控制方法研究提供参考。

#### [参考文献]

- [1] 陈周全,张宁. 中药配方颗粒研究的思考[J]. 中成药,2010,32(9):1573-1578.
- [2] 崔景朝,赵自明. 中药配方颗粒研究进展(II)——中药单煎与合煎对比研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):240-245.
- [3] 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 (Pt3):387-394.
- [4] 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 Pharm Biomed Anal,2014,98:424-433.
- [5] 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.
- [6] 郭婕,赵海霞,颜燕,等. 硫熏熏蒸山药对大鼠肝组织抗氧化能力及 ATP 酶活性的影响[J]. 中国实验方剂

- 学杂志,2010,16(11):150-153.
- [ 7 ] ZHAN J Y, YAO P, BI C W, et al. The sulfur-fumigation reduces chemical composition and biological properties of *Angelicae Sinensis Radix* [ J ]. *Phytomedicine*, 2014, 21(11):1318-1324.
- [ 8 ] MA B, KAN W L, ZHU H, et al. Sulfur fumigation reducing systemic exposure of ginsenosides and weakening immunomodulatory activity of ginseng [ J ]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195:222-230.
- [ 9 ] WANG S, HAO L J, ZHU J J, et al. Study on the effects of sulfur fumigation on chemical constituents and antioxidant activity of *Chrysanthemum morifolium* cv. Hang-ju [ J ]. *Phytomedicine*, 2014, 21(5):773-779.
- [ 10 ] 郑玉忠,张振霞,张勇,等. 硫熏山药对六味地黄丸中有效成分的影响 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(18):48-51.
- [ 11 ] DING K, CAO G, XU Z, et al. Quantitative analysis coupled with toxic evaluation to investigate the influence of sulfur-fumigation on the quality of *Chrysanthemum morifolium* [ J ]. *Nat Prod Commun*, 2014, 9(9):1357-1358.
- [ 12 ] 李秀杨,段素敏,刘欢欢,等. 特征含硫衍生物对硫熏牡丹皮检控的意义 [ J ]. *药学报*, 2016, 51(6):972-978.
- [ 13 ] 王刚,晋小军,王辉,等. 硫磺熏制与贮藏期对当归二氧化硫残留量的影响 [ J ]. *时珍国医国药*, 2014, 25(2):453-455.
- [ 14 ] WU J, SHEN H, XU J, et al. Detection of sulfur-fumigated *Paeoniae Alba Radix* in complex preparations by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [ J ]. *Molecules*, 2012, 17(8):8938-8954.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] 周姗姗,徐金娣,沈红,等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合对照药材法快速筛查硫磺熏蒸商品人参 [ J ]. *中国中药杂志*, 2014, 39(15):2807-2813.
- [ 17 ] 李秀杨,段素敏,刘欢欢,等. 特征含硫衍生物对硫熏牡丹皮检控的意义 [ J ]. *药学报*, 2016, 51(6):972-978.
- [ 18 ] ZHANG H M, LI S L, ZHANG H, et al. Holistic quality evaluation of commercial white and red ginseng using a UPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach [ J ]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62:258-273.
- [ 19 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部 [ M ]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:208-209.

[责任编辑 刘德文]