

热处理脱硫对硫熏党参中二氧化硫残留及含硫衍生物的影响

徐菲^{1,2,3}, 孔铭², 徐金娣³, 李松林^{2,3*}, 姜艳^{1*}

- (1. 南京林业大学 化学工程学院, 南京 210037;
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 & 中国中医科学院江苏分院, 南京 210028)

[摘要] 目的:通过测定热处理前后硫熏党参中二氧化硫残留和含硫衍生物量的变化规律,评估硫熏党参热处理脱硫技术的可行性。**方法:**采用酸碱滴定法测定硫熏党参中二氧化硫残留量;采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 定性和半定量表征硫熏党参中含硫衍生物;对不同硫熏熏蒸时间和不同热处理时间的硫熏党参中二氧化硫残留量与含硫衍生物含量的变化进行相关性分析。**结果:**白术内酯Ⅱ含硫衍生物和白术内酯Ⅲ含硫衍生物为硫熏党参主要特征含硫衍生物。随硫熏程度的增加,党参中二氧化硫残留量显著增加,含硫衍生物的含量先增加后维持稳定,二氧化硫残留量与含硫衍生物的量之间并不一定呈正相关;随热处理程度增加,硫熏党参中二氧化硫残留量持续明显下降,但含硫衍生物的量先下降后维持稳定并保持在较高的含量水平,相关性分析结果表明热处理脱硫所致的党参药材二氧化硫残留与含硫衍生物量的变化并不一定呈正相关。**结论:**热处理虽然可显著降低硫熏党参中二氧化硫残留量,但药材中仍存在含量较高的含硫衍生物,不能使硫熏党参内在质量恢复到与非硫熏品质一致。因此,热处理脱硫技术不是保证硫熏党参质量的可行技术。

[关键词] 党参;硫熏;热处理脱硫;含硫衍生物

[中图分类号] R282.4;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0162-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182414

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180927.1328.034.html>

[网络出版时间] 2018-09-29 13:47

Effect of Heat Treatment on Contents of Sulfur Dioxide Residue and Sulfur-containing Derivatives in Sulfur-fumigated Codonopsis Radix

XU Fei^{1,2,3}, KONG Ming², XU Jin-di³, LI Song-lin^{2,3*}, JIANG Yan^{1*}

- (1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;
2. Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;
3. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine & Jiangsu Branch of Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the feasibility of heat-treating de-sulfur method for sulfur-fumigated Codonopsis Radix (CR) by investigating the changes in contents of sulfur dioxide residue and sulfur-containing derivatives after sulfur-fumigation. **Method:** Qualitative and semi-quantitative characterization of sulfur-containing derivatives was analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry

[收稿日期] 20180504(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503245)

[第一作者] 徐菲,在读硕士,从事药物分析工作,Tel:025-85427544,E-mail:2495651621@qq.com

[通信作者] *姜艳,博士,副教授,从事天然活性成分研究工作,Tel:025-85427544,E-mail:jiangyancpu@126.com

*李松林,博士,研究员,从事中药药效物质和质量控制研究工作,Tel:025-85639640,E-mail:songlinli64@126.com

(UPLC-Q-TOF-MS/MS), and sulfur dioxide residues were determined by acid-base titration method. Then the correlations between sulfur dioxide residues and sulfur-containing derivatives in sulfur-fumigated CR samples with different sulfur-fumigation and heat treatment extents were analyzed. **Result:** Atractylenolide II and atractylenolide III sulfur-containing derivatives were identified as major characteristic markers of sulfur fumigated CR. With the increase of sulfur-fumigation time, the content of sulfur dioxide residues was continuously increased, while the content of sulfur-containing derivatives was elevated at the beginning and then reached to a plateau, so there was not necessarily a positive correlation between sulfur dioxide residue and the amount of sulfur derivatives. With the increase of heat-treated time, the content of sulfur dioxide residues was continuously decreased, while the content of sulfur-containing derivatives was decreased first and remained at a high level later. There was no clear correlation between sulfur dioxide residue and sulfur-containing derivatives in different sulfur-fumigated and heat-treating de-sulfur degrees of CR. **Conclusion:** Heat-treatment could decrease the content of sulfur dioxide residue, but the content of sulfur-containing derivatives still remained at a high level, so heat treatment could not reinstate the inner quality of sulfur-fumigated CR to its non-fumigated ones. Therefore, heat-treating de-sulfur is not a feasible method for the quality assurance of sulfur-fumigated CR.

[**Key words**] Codonopsis Radix; sulfur-fumigation; heat-treating de-sulfur method; sulfur-containing derivatives

党参为常用中药材,储运过程中常易生虫长霉,一些不法商贩往往采用反复硫熏杀虫防霉^[1]。但过度硫熏会导致党参药材中二氧化硫残留等有害物超标,对人体产生潜在的危害^[2-3];硫熏党参药材内在质量也发生变化,如党参炔苷及多糖等活性成分的含量明显降低^[4-6],甚至产生新的硫熏特征成分白术内酯 II 含硫衍生物和白术内酯 III 含硫衍生物^[7];硫熏后党参的药理活性也受到影响,与未硫熏党参相比,硫熏党参的小鼠免疫调节作用降低,小鼠体质量增长幅度减小^[8],小鼠的耐缺氧时间显著降低等^[9]。为了加强对硫熏药材的监管,2015 年版《中国药典》(一部)在党参等 10 种药材品种项下增加了亚硫酸盐残留的限量要求(以二氧化硫计,不得过 400 mg·kg⁻¹),从而保障潜在的硫熏药材的质量,确保其临床用药的安全和有效。

笔者对市售党参药材进行鉴别研究时发现,部分商品药材的部分性状特征(断面呈褐色,角质样)与 2015 年版《中国药典》(一部)^[10]标准规定(断面呈灰白、淡棕、淡黄、黄白至黄色)不符。进一步调研发现,一些商贩为了使硫熏党参二氧化硫残留量达到 2015 年版《中国药典》(一部)规定的限量要求,会将硫熏党参进行热处理脱硫。笔者曾对产地采集的党参药材进行类似的热处理,发现药材断面也成褐色和角质样,表明市售部分断面特征与 2015 年版《中国药典》(一部)不符的样品极有可能就是热处理脱硫的样品。然而,热处理脱硫技术作为硫熏党参保质方法是否可行未见科学评估。

本研究拟采用酸碱滴定法测定硫熏党参中二氧化硫硫残留量,采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 定性和半定量表征硫熏党参中的含硫衍生物,探讨不同硫熏程度和不同热处理程度硫熏党参样品中二氧化硫残留量与硫熏含硫衍生物含量变化的相关性,评估热处理脱硫技术作为硫熏党参保质方法的可行性。

1 材料

ACQUITY 型 UPLC(配备双元溶剂梯度泵,自动进样器,二级管阵列检测器),QTOF SYNAPT G2-S 型质谱仪(美国 Waters 公司);Microfuge 16 型台式微量离心机(美国贝克曼库尔特公司);AT201 型 1/10 万电子分析天平(瑞士梅特勒公司);KQ-250E 型医用超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);DJ-02 型灵巧型粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司);Milli-Q 系列纯水器(美国密理博公司);DW-2 型调温电热套(通州决心化工电器公司);二氧化硫残留量测定装置(青岛仁和兴实验科技有限公司)。

党参对口药材采自甘肃省定西市陇西县柯寨乡(编号 JSPACM-64-1),经江苏省中医药研究院李松林研究员鉴定为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* 的干燥根,标本留存于江苏省中医药研究院中药质量与代谢组研究室。乙腈、甲醇、甲酸均为质谱纯,分别购自美国 Merck 公司和美国 Sigma-Aldrich 公司。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 硫熏党参样品的制备 取党参药材,加工成 1~2 mm 的薄片,称取 8 份,每份 400 g。每份用水

20 mL 淋湿 1 min, 静置 30 min。将点燃的硫磺粉末 10 g 和党参切片分别放入有隔层密闭容器的下层和上层, 保持硫磺充分燃烧, 分别熏蒸 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h。熏蒸期间, 每间隔 2 h 添加硫磺 5 g。取出硫熏药材装于自封袋中, 于室内阴凉干燥处存放。

2.1.2 热处理脱硫党参样品的制备 取硫熏 10 h 党参样品 6 份, 每份 50 g, 平铺于鼓风干燥箱中, 在 60 ℃ 温度下, 分别烘干 0, 2, 4, 8, 16, 32 h。取出脱硫药材装于自封袋中, 于室内阴凉干燥处存放。

2.1.3 供试品溶液的制备 取不同硫熏时间和不同热处理脱硫时间党参样品, 粉碎(过 40 目筛), 精密称取粉末 2 g, 置于具塞锥形瓶中, 加甲醇 40 mL, 称重, 室温超声处理 30 min, 放冷, 称重, 以甲醇补足减失的质量。滤过, 取滤液于 12 000 rmin⁻¹ 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

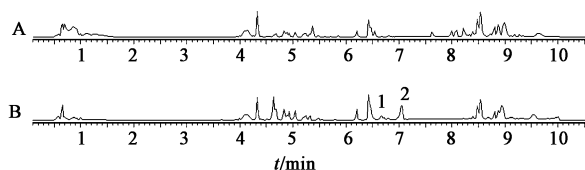
2.2 二氧化硫残留量测定 取党参样品, 按照 2015 年版《中国药典》(四部) 二氧化硫残留量测定法中第一法酸碱滴定法^[11] 测定样品中二氧化硫残留量。

2.3 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

2.3.1 色谱条件 WatersACQUITYHSST3 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相为 (A) 0.1% 甲酸-乙腈, (B) 0.1% 甲酸-水, 梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 5% A; 1 ~ 4 min, 5% ~ 17% A; 4 ~ 9 min, 17% ~ 30% A; 9 ~ 16 min, 30% ~ 70% A; 16 ~ 17 min, 70% ~ 100% A); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 柱温 35 ℃; 样品室温度 15 ℃; 进样量 5 μL。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源, 采用负离子扫描模式, 雾化气和锥孔气为氮气, 雾化气温度 400 ℃, 毛细管电压 0.5 kV, 锥孔电压 80 V, 离子源温度 100 ℃, 脱溶剂气温度 400 ℃, 反向锥孔气流 80 L·h⁻¹, 脱溶剂气流 1 100 L·h⁻¹, 低电压 6 V, 高电压 30 ~ 60 V, 扫描时间 0.02 s。采用亮氨酸-脑啡肽锁定质量数 554.261 5 (-)。将 UPLC-Q-TOF-MS/MS 获得的原始数据采用 Mass Lynx 4.1 分析软件处理。

2.4 硫熏党参中含硫衍生物的确证 采用所建立的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 方法分析硫熏党参和未硫熏党参药材样品, 所得样品基峰强度 (base peak intensity, BPI) 色谱图见图 1。从图 1 可见, 与未硫熏党参药材相比, 硫熏党参的色谱图中新出现 2 个色谱峰 1 和 2, 表明硫熏可以导致党参化学轮廓发生改变。



A. 党参甲醇提取液; B. 硫熏党参甲醇提取液

图 1 硫熏及未硫熏党参甲醇提取液的 BPI

Fig. 1 BPI chromatograms of sulfur-fumigated and non-fumigated Codonopsis Radix samples

图 2A 为色谱峰 1 的质谱图。该化合物在负离子模式下的分子离子峰 $[M - H]^-$, m/z 327.091 0, 提示分子式为 $C_{15}H_{20}O_6S$, 碎片离子 m/z 247.131 4 与 $[M - H]^-$ 相比减少了 80 Da, 对应丢失 1 分子 SO_3 ; 碎片离子 m/z 203.143 9 与 m/z 247.131 4 离子相比少了 44 Da, 推测其为丢失 1 分子 CO_2 产生。党参中白术内酯Ⅲ的相对分子质量为 248, 分子式为 $C_{15}H_{20}O_3$, 推测化合物 1 可能为白术内酯Ⅲ结合 1 分子 SO_3 。上述精确质量信息和碎片离子信息与文献[6, 12]报道的白术内酯Ⅲ含硫衍生物一致, 因此化合物 1 被确认为白术内酯Ⅲ含硫衍生物。

图 2B 为色谱峰 2 的质谱图。该化合物在负离子模式下的分子离子峰 $[M - H]^-$, m/z 295.099 9, 提示分子式为 $C_{15}H_{20}O_4S$, 这与白术内酯Ⅱ (元素组成为 $C_{15}H_{20}O_2$) 的元素组成相比增加了 1 分子 SO_2 。碎片离子 m/z 187.008 3 与 $[M - H]^-$ 相比减少了 108 Da, 对应丢失 1 分子 C_8H_{12} 。碎片离子 m/z 123.044 3 与 m/z 187.008 3 离子相比少了 64 Da, 推测其为丢失 1 分子 SO_2 产生。上述精确质量信息和碎片离子信息与文献[6, 12]报道的白术内酯Ⅱ含硫衍生物一致, 因此化合物 2 被确认为白术内酯Ⅱ含硫衍生物。

2.5 硫熏含硫衍生物 UPLC-Q-TOF-MS/MS 半定量分析方法学考察

2.5.1 精密度 取硫熏 10 h 党参样品溶液, 在上述色谱质谱条件下连续进样 6 次, 记录白术内酯Ⅱ含硫衍生物和白术内酯Ⅲ含硫衍生物色谱峰的峰面积, 计算 RSD 分别为 2.2% 和 2.8%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性 取硫熏 10 h 党参样品粉末 6 份, 按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在上述色谱质谱条件下进样分析, 记白术内酯Ⅱ含硫衍生物和白术内酯Ⅲ含硫衍生物色谱峰的峰面积, 计算 RSD 分别为 2.7%, 2.4%, 表明方法重复性良好。

2.5.3 稳定性 取同一份供试品溶液, 室温放置,

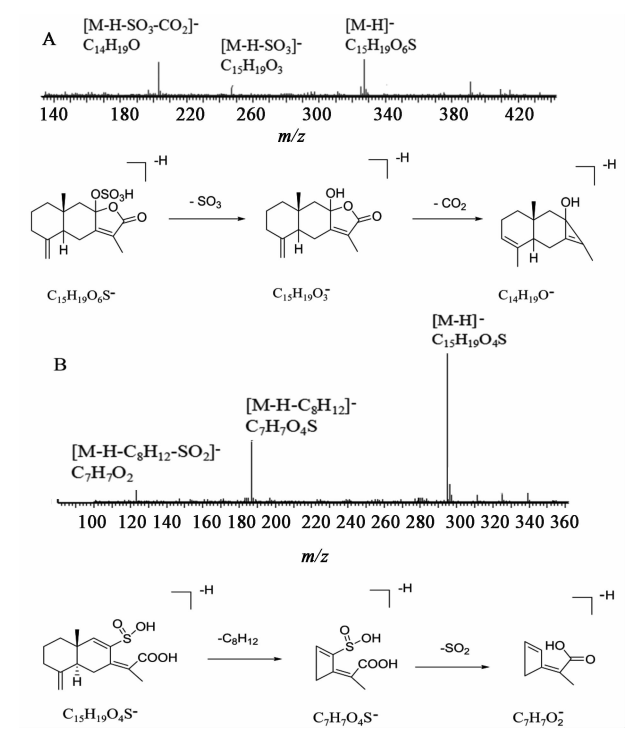


图 2 白术内酯Ⅲ含硫衍生物和白术内酯Ⅱ含硫衍生物的二级质谱碎片及可能的裂解途径

Fig. 2 MS/MS spectra and fragmentation pathways of atractylenolide III sulfonate and atractylenolide II sulfonate

分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 进样分析, 记录白术内酯Ⅱ含硫衍生物和白术内酯Ⅲ含硫衍生物色谱峰的峰面积, 计算 RSD 分别为 3.0%, 2.4%, 表明样品稳定性良好。

2.6 不同硫熏时间党参样品中二氧化硫残留量与含硫衍生物量的相关性 不同硫熏时间的党参样品中二氧化硫残留量的变化趋势见图 3。由图可以看出二氧化硫的残留量随硫熏时间的延长逐渐增加, 在 0~2 h 时急剧增加, 在 2~12 h 时缓慢增加。白术内酯Ⅲ含硫衍生物和白术内酯Ⅱ含硫衍生物的峰面积在 0~2 h 先上升, 2 h 后趋于稳定。用 SPSS 11.5 软件, 对不同硫熏时间党参二氧化硫残留量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。白术内酯Ⅲ含硫衍生物峰面积与二氧化硫残留的 Pearson 相关系数为 0.488 5, 其相关系数检验的概率为 0.029 0 ($P < 0.05$), 认为两者总体存在弱的正相关性。白术内酯Ⅱ含硫衍生物与二氧化硫残留量的 Pearson 相关系数为 0.214 0, 其相关系数检验的概率为 0.118 0 ($P > 0.05$), 认为两者总体为零相关。可见, 随硫熏程度的增加, 党参中二氧化硫残留量和含硫衍生物

的量均会增加, 但二氧化硫残留量与含硫衍生物的量之间并不一定呈正相关。

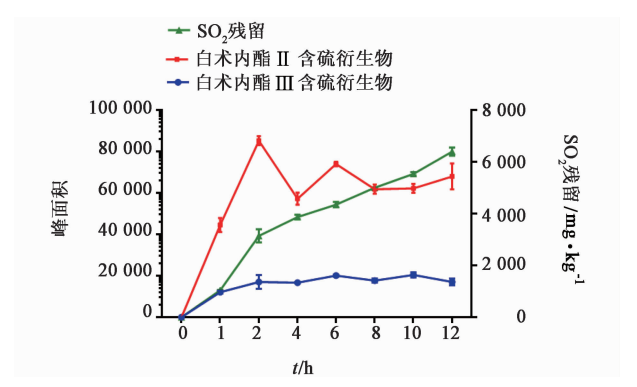


图 3 不同硫熏熏蒸时间党参二氧化硫残留量和含硫衍生物峰面积

Fig. 3 Contents of sulfur dioxide residue and sulfur-containing derivatives peak area in Codonopsis Radix samples with different sulfur-fumigation duration

2.7 热处理脱硫党参样品中二氧化硫残留量与含硫衍生物量的相关性 以自制硫熏 10 h 党参样品考察热处理脱硫时间对二氧化硫残留量和含硫衍生物量的影响, 结果见图 4, 由图可见, 随着热处理时间的延长, 二氧化硫残留量持续明显下降; 白术内酯Ⅱ含硫衍生物和白术内酯Ⅲ含硫衍生物的含量先稍降再上升并趋于平稳。白术内酯Ⅲ含硫衍生物峰面积与二氧化硫残留的 Pearson 相关系数为 0.769 1, 其相关系数检验的概率为 0.038 5 ($P < 0.05$), 认为两者总体存在正相关性。白术内酯Ⅱ含硫衍生物与二氧化硫残留量的 Pearson 相关系数为 0.626 5, 其相关系数检验的概率为 0.183 2 ($P > 0.05$), 认为两者总体为零相关。可见, 随热处理程度增加, 硫熏党参中二氧化硫残留量持续明显下降, 但含硫衍生物的量并不会持续显著下降, 热处理脱硫所致的党参药材二氧化硫残留与含硫衍生物量的变化并不一定呈正相关。

3 讨论

本研究在确认了硫熏导致党参药材二氧化硫残留和新产生 2 个硫熏含硫衍生物的基础上, 重点考察了热处理对硫熏党参中二氧化硫残留和含硫衍生物含量的影响, 发现热处理确实可以显著降低硫熏党参药材的二氧化硫残留量, 但硫熏党参中新产生的含硫衍生物的量并不能呈正相关性下降。由于二氧化硫残留存在安全隐患, 硫熏药材成分转化又会影响药材的药效和吸收代谢^[13-16], 因此笔者认为, 热处理脱硫虽然可以明显降低硫熏党参中二氧化硫的含量, 使硫熏党参二氧化硫残留达到《中国药典》规定的限量标准, 控制由于外源性二氧化硫残留导

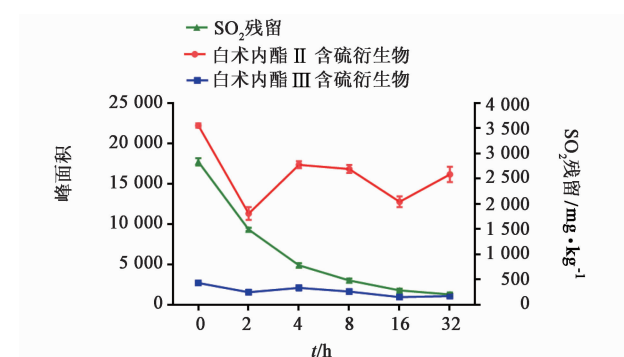


图 4 不同热处理时间党参二氧化硫残留量和含硫衍生物峰面积
Fig. 4 Contents of sulfur dioxide residue and sulfur-containing derivatives peak area in *Codonopsis Radix* samples with different heat treatment time

致的党参安全性隐患,但是硫熏党参中仍存在含量较高的含硫衍生物,其内在质量并不一定能通过热处理脱硫技术恢复到与未硫熏品质一致。因此,热处理脱硫并不一定能消除硫熏诱导产生的含硫衍生物潜在的导致党参有效性和安全性改变的隐患。热处理脱硫技术不是保证硫熏党参质量的可行技术。

[参考文献]

[1] 席啸虎,刘璐,刘霞. 基于化学成分变化优化麦冬硫熏工艺[J]. 中草药,2017,48(7):1327-1333.

[2] 刘静静,刘晓,李松林,等. 硫磺熏蒸中药材及饮片的研究现状[J]. 中草药,2010,41(8):1403-1406.

[3] 赵玉英,张娟娟,王颖莉. 硫磺熏蒸前后党参红外光谱特征变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(10):63-66.

[4] 孟召全. 硫熏法对党参有效成分含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2010,17(S1):37-38.

[5] 李成义,魏学明,王明伟,等. 硫熏对党参中党参炔苷含量的影响[J]. 中国现代中药,2010,12(12):11-13.

[6] 杨军宣,郭振宇,张毅,等. 不同党参饮片贮藏期有效

成分的稳定性研究[J]. 中药材,2018,41(1):89-92.

[7] MA X Q, Leung A K, CHAN C L, et al. UHPLC/MS/MS analysis of the impact of sulfur fumigation on the chemical profile of *Codonopsis Radix* (*Dangshen*) [J]. *Analyst (Lond)*, 2014, 139(2): 505-516.

[8] 刘成松,王玉萍,史彦斌,等. 硫磺熏蒸党参对小鼠免疫功能的影响[J]. 中药材,2014,37(11):1969-1972.

[9] 李萍,彭百承,甄丹丹,等. 3种含硫量不同的党参药效比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):175-176,179.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:281-282.

[11] 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.

[12] SUN X, CUI X B, WEN H M, et al. Influence of sulfur fumigation on the chemical profiles of *Atractylodes macrocephala* Koidz. evaluated by UFLC-QTOF-MS combined with multivariate statistical analysis [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2017, 141:19-31.

[13] 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.

[14] KONG M, LIU H H, WU J, et al. Effects of sulfur-fumigation on the pharmacokinetics, metabolites and analgesic activity of *Radix Paeoniae Alba* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 212:95-105.

[15] 陆兔林,宁子琬,单鑫,等. 硫磺熏蒸对中药材化学成分和药理作用影响的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014,39(15):2796-2800.

[16] 丁喜炎,季琳,程雪,等. 不同硫熏替代技术的黄芪药材对小鼠免疫功能影响研究[J]. 中国中药杂志, 2016,41(15):2819-2823.

[责任编辑 顾雪竹]