

· 资源与质量评价 ·

绿原酸与亚硫酸根的反应与其在鉴别硫熏药材的应用

田玉婷^{1,2}, 王玉^{2,3}, 霍志鹏², 宋兆辉², 徐云根^{1*}, 何毅^{2*}
(1. 中国药科大学 药学院, 南京 210009;
2. 天士力控股集团有限公司 天士力研究院现代中药开发中心,
创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410;
3. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072)

[摘要] 目的: 探索绿原酸与亚硫酸钠反应产物的结构、反应位点,以及硫熏后金银花中绿原酸化学变化情况。方法: 将绿原酸与亚硫酸钠置于温和条件下进行化学反应,利用液相色谱-离子阱-飞行时间质谱技术(LC-MS-IT-TOF)以及核磁共振波谱(¹H-NMR)检测技术对反应产物进行检测,并用 LC-MS-IT-TOF 检测硫熏后及未硫熏的金银花水提取液。结果: 经过对碎片离子、分子裂解规律及精确相对分子质量等质谱数据的分析,结合化学位移、峰强度以及峰裂分等核磁信号结果,初步鉴定绿原酸与亚硫酸钠的生成产物为绿原酸 α,β -不饱和羰基加成产物:3-[3-(3,4-二羟基苯基)-2-磺丙基]氧基-1,4,5-三羟基环己烷-1-羧酸或者 3-[3-(3,4-二羟基苯基)-3-磺丙基]氧基-1,4,5-三羟基环己烷-1-羧酸,并在硫磺熏蒸金银花中检测到与加成产物相同的特征碎片,而在未硫熏金银花中没有发现。结论: 该研究首次证明了绿原酸与亚硫酸反应产物结构和反应位点,并检测到硫熏金银花中的绿原酸亚硫酸加成产物。尽管目前尚未明确金银花硫熏后产生的亚硫酸加成化合物对金银花功效和毒理活性影响,仍应关注硫熏药材中活性成分的变化情况。同时该研究还可为含有 α,β -不饱和羰基结构的中药硫熏后化学成分变化的研究提供参考。

[关键词] 绿原酸; 液相色谱-离子阱-飞行时间质谱技术; α,β -不饱和羰基; 金银花; 硫熏
[中图分类号] R284.1;R289;R22;R2-031 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)23-0122-06
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191613
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190505.0907.003.html>
[网络出版时间] 2019-05-08 9:28

Reaction of Chlorogenic Acid with Sulfite and Its Application in
Identification of Sulfur-fumigated Herbs

TIAN Yu-ting^{1,2}, WANG Yu^{2,3}, HUO Zhi-peng², SONG Zhao-hui², XU Yun-gen^{1*}, HE Yi^{2*}
(1. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
2. Traditional Chinese Medicine Research Center, Tasly Academy, State Key Laboratory of Critical
Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Pharmaceutical Group Co. Ltd., Tianjin 300410, China;
3. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

[Abstract] Objective: To explore the structure and reaction sites of the reaction products of chlorogenic acid and sodium sulfite, and the chemical changes of chlorogenic acid in *Lonicerae Japonicae* Flos after sulfur fumigating. Method: Chlorogenic acid was reacted with sodium sulfite under mild conditions. Liquid

[收稿日期] 20181122(010)
[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301005)
[第一作者] 田玉婷,在读硕士,从事现代中药分析研究,E-mail:sti1108@163.com
[通信作者] * 徐云根,教授,从事药物化学研究,Tel:025-83271244,E-mail:xyg64@126.com;
* 何毅,博士,从事中药新药开发与研究工作,Tel:022-86343860,E-mail: heyi@tasly.com

chromatography-mass spectrometry-ion trap-time-of-flight (LC-MS-IT-TOF) and ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H -NMR) detection techniques were used to detect the reaction products, and the sulfur-fumigated and unsulfurized *Lonicerae Japonicae Flos* water extract was detected by LC-MS-IT-TOF. **Result:** After analyzing the mass spectrometry data of fragment ion, molecular cleavage and accurate molecular weight, according to the results of nuclear magnetic signals of chemical shift, peak intensity and peak splitting, the products of chlorogenic acid and sodium sulfite were preliminarily identified as chlorogenic acid α , β -unsaturated carbonyl addition product: 3- ((3- (3, 4-dihydroxyphenyl) -2-sulfopropyl) oxy) -1, 4, 5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid or 3- ((3- (3, 4-dihydroxyphenyl) -3-sulfopropyl) oxy) -1, 4, 5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid, and the same characteristic fragments were detected as the addition product in the sulfur fumigated *Lonicerae Japonicae Flos*, but not found in the unsulfurized. **Conclusion:** It is the first time to demonstrate the structure and reaction sites of chlorogenic acid and sulfurous acid reaction products, and detect the chlorogenic acid sulfite addition product in sulfur-fumigated *Lonicerae Japonicae Flos*. Although it is still unclear how the sulfite addition compound produced by sulphur *Lonicerae Japonicae Flos* affects the efficacy and toxicological activity of *Lonicerae Japonicae Flos*, we shall still pay attention to the changes of active ingredients in sulphuric medicinal materials. Besides, this study can also provide reference for the studies of chemical composition changes after sulfuration of traditional Chinese medicine containing α , β -unsaturated carbonyl structure.

[**Key words**] chlorogenic acid; LC-MS-IT-TOF; α , β -unsaturated carbonyl; *Lonicerae Japonicae Flos*; sulfur fumigation

绿原酸(3-*O*-咖啡酰奎尼酸,CQA)为 1 分子咖啡酸与奎尼酸 3 位缩合成酯的天然产物,见图 1。绿原酸在植物中分布广泛,是金银花、菊花、茵陈、蒲公英、杜仲、桑叶、贯叶连翘、天山雪莲等多种中药的重要活性成分,咖啡和茶叶中也有绿原酸存在^[1-3]。药理研究显示绿原酸具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗病毒等药理作用。

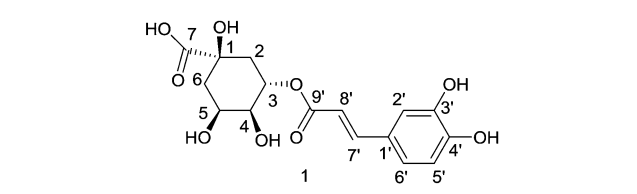


图 1 绿原酸化学结构
Fig.1 Chemical structure of chlorogenic acid

金银花是一味常用中药,具有清热解毒,疏散风热等功效。绿原酸被认为是金银花中重要的活性物质之一^[4]。2015 年版《中国药典》金银花项下规定绿原酸为药材的含量控制成分,要求含量不得少于 1.5%。1995 年版《中国药典》收录金银花项下产地加工中包含用硫磺熏后干燥^[5]。硫磺熏蒸是中药材加工和养护的一种传统方法,有防霉变、防虫蛀、漂白、辅助干燥等作用,硫磺熏蒸的不当使用会导致药材的活性成分发生变化,过量的 SO_2 对人体产生一定的毒性,在 2005 年版《中国药典》中已删去了所有药材的硫磺熏蒸内容^[6]。2015 年版《中国药

典》中对硫磺熏蒸的控制方式为检测 SO_2 残留量,对硫磺熏蒸药材的研究中发现其活性成分的变化情况与 SO_2 残留无显著关联性^[7-8],根据 SO_2 残留并不能很好地判断药材内在质量变化。有报道用 UPLC-MS 技术分析硫磺熏蒸的金银花药材,检测到绿原酸 + H_2SO_3 的质谱峰信号,然而绿原酸和 H_2SO_3 的反应位点和反应产物的结构尚不明确^[9]。

绿原酸中咖啡酰基部分含有 α,β -不饱和羰基结构, α,β -不饱和羰基具有亲电性质容易与亚硫酸氢根发生加成反应。含 α,β -不饱和羰基的穿心内酯、维生素 K_3 的亚硫酸氢根加成物已被开发为上市药品,例如主要成分为亚硫酸氢钠穿心莲内酯的莲必治注射液,主要成分为亚硫酸氢钠甲萘醌的维生素 K_3 ^[10-11]。硫磺熏蒸后残留的 SO_2 转化为亚硫酸盐形式存在于药材中^[12-13],推测绿原酸可能与亚硫酸盐发生类似反应,生成亚硫酸氢盐加成物。为鉴定亚硫酸盐与绿原酸的反应产物结构,明确硫磺熏蒸金银花中绿原酸活性成分的结构变化情况,本实验采用 ^1H -NMR 和高效液相色谱联用高分辨质谱研究反应产物,并用 LC-MS-IT-TOF 方法检测了硫磺熏蒸及未硫磺熏蒸金银花的水提取液。

1 材料
HPLC-MS-IT-TOF(日本岛津公司,包括自动进样器、二元梯度泵、柱温箱和 PDA 检测器); Milli-Q 系列超纯水系统(美国 Millipore 公司),KQ-500DV

型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Bruker 400M 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司)。绿原酸(上海阿拉丁试剂公司,纯度 98%,批号 E1831146),硫磺(国药集团化学试剂有限公司),甲酸(色谱纯,上海阿拉丁试剂公司),乙腈(质谱纯,德国 Merk 公司)。金银花(河北全泰药业有限公司,批号 1711001)经天士力研究院霍志鹏中级工程师鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的干燥花蕾,亚硫酸钠(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 方法

2.1 色谱与质谱条件 色谱条件:使用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~6 min,5% B;6~23 min,5%~45% B;23~28 min,45% B;28~32 min,45%~90% B;32~34 min,90% B;34~35 min,90%~5% B;35~40 min,5% B),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30℃,进样量 6 μL。

质谱条件:采用电喷雾 ESI 离子源,正、负离子分别检测,扫描范围 *m/z* 100~700,采用三氟乙酸钠作为校正液,检测电压 1.6 kV,雾化气体积流量 1.5 L·min⁻¹,曲型脱溶剂装置(CDL)温度 200℃,离子累积时间 50 ms,毛细管电压 -3.5 kV(负离子),4.5 kV(正离子),诱导碰撞解离能(CID)50%。柱后分流,分流比 1:3。

2.2 对照品溶液制备 精密称取绿原酸对照品 10 mg,用 50% 甲醇溶解后定容至 10 mL 量瓶中,并以 50% 甲醇稀释至 50 g·L⁻¹。

未硫熏金银花样品:取干燥金银花样品 10 g 粉碎过 60 目筛,称取粉碎样品 1 g,加入 50% 甲醇溶液 50 mL,超声提取 60 min。取适量上清,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,过滤,取续滤液得金银花未硫熏对照供试品。

2.3 样品溶液制备

2.3.1 绿原酸亚硫酸反应液样品溶液 取绿原酸样品 10 mg 溶于 10 mL 水中,按摩尔比 1:2 比例加入亚硫酸钠震荡溶解,室温过夜反应。取反应液稀释 20 倍得反应液样品溶液。

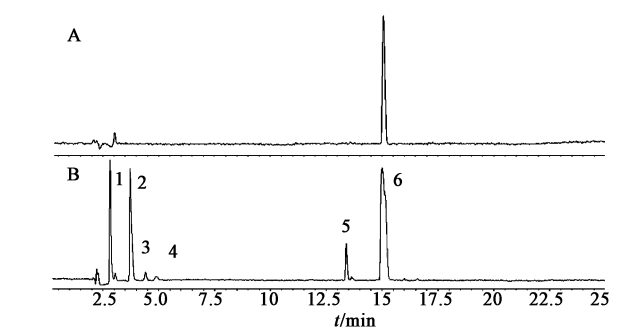
2.3.2 熏制金银花样品溶液 取干燥金银花 10 g,加纯化水润湿,取出后放置于自制熏制容器,点燃硫磺 0.1 g 熏制 6~8 h 后取出于 50℃ 烘箱中烘干。将烘干样品粉碎过 60 目筛,称取粉碎后样品 1 g,加入 50% 甲醇溶液 50 mL,超声提取 60 min。取适量上清,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,过滤取续滤液即

得硫磺熏制后金银花进样样品。

2.3.3 核磁样品溶液 称取绿原酸 5 mg 直接溶于 0.5 mL 重水得绿原酸对照品溶液。另取绿原酸 5 mg 溶于 0.5 mL 重水,按摩尔比 1:2 加入亚硫酸钠过夜反应后检测。

3 结果与分析

3.1 绿原酸及其反应液检测 绿原酸及其反应液提取离子流见图 2。对照品绿原酸保留时间(*t_R*) 15.1 min,分子离子峰 *m/z* 353.086 8 [M-H]⁻, 355.099 9 [M+H]⁺, 377.082 1 [M+Na-H]⁺,正离子可见碎片离子 163.037 3 [M-奎尼酸+H]⁺ 以及 191.057 0 [M-咖啡酰基-H]⁻ 特征峰,见图 3。反应液保留时间在 2~5 min,出现 4 个色谱峰,峰 1(*t_R* 2.8 min) 质谱图特征 *m/z* 435.057 6 [M-H]⁻, 353.088 5 [M-SO₃H₂]⁻, 454.100 8 [M+NH₄]⁺, 355.099 6 [M-SO₃H₂]⁺ 见图 4,鉴定为绿原酸亚硫酸氢根加成产物 [C₁₆H₁₉O₁₂S]⁻。图 2B 中峰 2(*t_R* 3.7 min),峰 3(*t_R* 4.4 min),峰 4(*t_R* 4.9 min) 质谱信号特征与峰 1 一致。鉴定峰 2,3,4 为峰 1 的同分异构体。在绿原酸 α,β-不饱和羰基结构中 7' 位和 8' 位均可能加成磺酸基,得到多一个手性中心的加成产物。出现多个峰信号与绿原酸可能发生多活性位点反应推测一致。反应液在保留时间 13.4 min 还出现一个色谱峰(图 2B 峰 5),其质谱信号特征和绿原酸相同,推测其为绿原酸同分异构体^[14]。

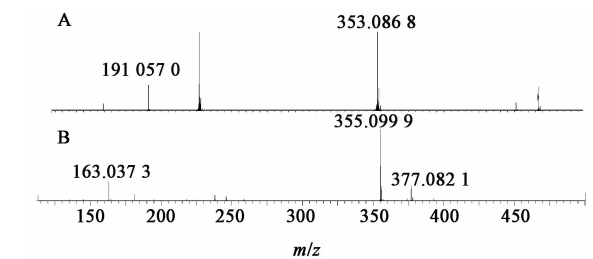


A. 对照品;B. 反应液

图 2 绿原酸及其反应液提取离子流

Fig. 2 Extraction ion chromatogram of chlorogenic acid and reaction solution

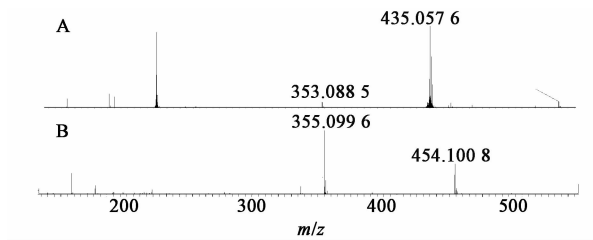
参考文献[15]数据归属对绿原酸信号归属见表 1。2 位及 6 位质子信号重叠,得多重峰。7' 位,8' 位为烯键质子,处于低场区。亚硫酸钠与绿原酸反应液 48 h 核磁数据归属见表 2。以 3 位 H(δ 5.24) 峰面积为 1,绿原酸中 7' 以及 8' 位烯键的低场



A. 负离子;B. 正离子

图 3 绿原酸高分辨质谱

Fig.3 High resolution mass spectra of CQA



A. 负离子;B. 正离子

图 4 峰 1 高分辨质谱

Fig.4 High resolution mass spectra of peak 1

峰面积明显降低(δ 6.28,7.53),随着反应时间延长,降低更加明显,同时出现高场位置质子信号(δ 1.52~1.55,2H)。绿原酸对照品核磁图谱见图 5A。

表 1 绿原酸核磁数据归属¹H-NMR(400 MHz,D₂O)

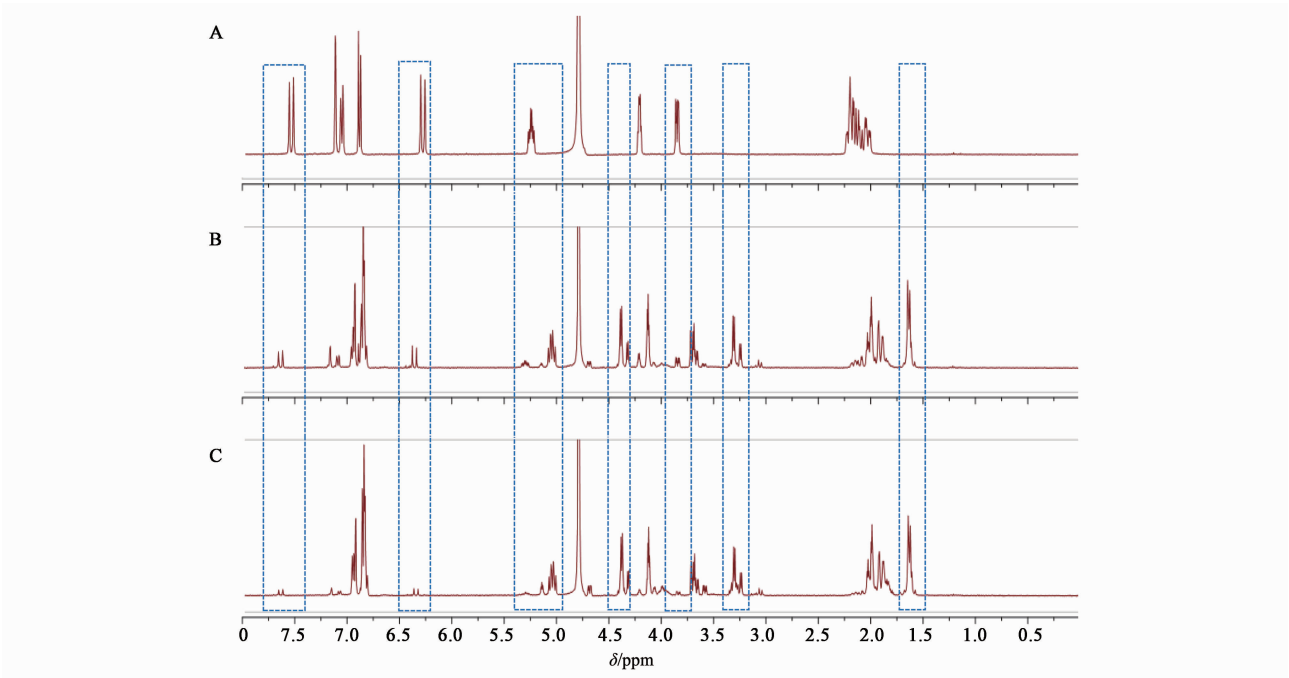
Table 1 NMR data of CQA ¹H-NMR(400 MHz,D₂O)

No.	δ	J/Hz	峰强度	对应质子信号
1	2.00~2.24	m	4	2H,6H
2	3.85	dd(3.3,8.6)	1	4H
3	4.19~4.22	m	1	5H
4	5.24	td(4.3,8.9)	1	3H
5	6.28	d(15.9)	1	8'H
6	6.88	d(8.2)	1	5'H
7	7.05	dd(2.0,5.5)	1	6'H
8	7.11	d(1.9)	1	2'H
9	7.53	d(16.0)	1	7'H

表 2 亚硫酸钠与绿原酸反应产物核磁数据归属¹H-NMR(400 MHz,D₂O)

Table 2 Data of sodium sulfite and CQA reaction products ¹H-NMR(400 MHz,D₂O)

No.	δ	J/Hz	峰强度	对应质子信号
1	1.52~1.55	m	2	7'H
2	1.72~1.94	m	4	2H,6H
3	3.18~3.25	m	1	8'H
4	4.04	dd(3.3,6.6)	1	4H
5	4.28~4.30	m	1	5H
6	4.95	td(8.0,10.2)	1	3H
7	6.80~6.89	m	3	2'H,5'H,6'H



A. 绿原酸;B. 绿原酸 + 亚硫酸钠反应 20 h;C. 绿原酸 + 亚硫酸钠反应 48 h

图 5 绿原酸及其反应产物核磁谱对照

Fig.5 NMR diagram of CQA and its reaction products

除表中归属核磁信号,在图中还可见到 δ 4.22~4.30 出现峰强度约为 1 的多重峰。在烯键

上存在两个位置的加成,由于苯环去屏蔽效应,7'位加成产物的 7'-H 信号较 8'位加成产物质子信号在更低场处,表中归属信号 δ 3.18 ~ 3.25 为 $C_8-H_2SO_3$ 加成产物 8'-H,而 δ 4.22 ~ 4.30 信号为 $C_7-H_2SO_3$ 加成产物 7'-H。结合绿原酸反应液质谱准分子离子峰提取离子流图出现 4 个具有加成产物特征碎片

的离子峰,推断绿原酸与亚硫酸钠存在多个位点反应产物,推测反应式见图 6,得到亚硫酸加成绿原酸产物为 3- $\{[3-(3,4\text{-二羟基苯基})\text{-}2\text{-磺丙基}]\text{氧基}\}\text{-}1,4,5\text{-三羟基环己烷-1-羧酸}$ (化合物 2)或者 3- $\{[3-(3,4\text{-二羟基苯基})\text{-}3\text{-磺丙基}]\text{氧基}\}\text{-}1,4,5\text{-三羟基环己烷-1-羧酸}$ (化合物 3)。

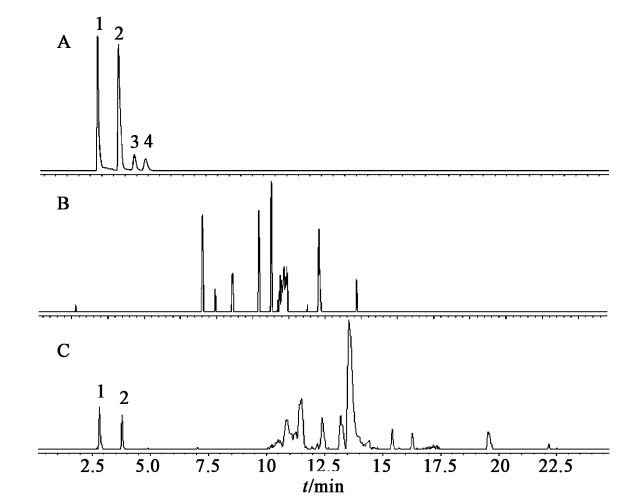
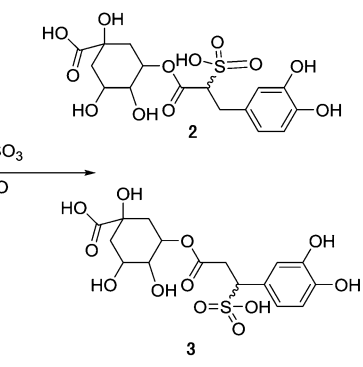
图 6 绿原酸与亚硫酸钠反应式
Fig. 6 Reaction formula of CQA and sodium sulfite

3.2 金银花提取液检测 实验观察硫熏后金银花提取液的颜色明显浅于未经硫熏金银花提取液。提取 m/z 435.06 $[M-H]^-$ 在未硫熏金银花提取液中保留时间在 2 ~ 5 min 未发现亚硫酸绿原酸加成产物质谱峰(图 7A)。而在硫熏后金银花提取 m/z 435.06 $[M-H]^-$ 发现与绿原酸反应液保留时间一致的色谱峰(见图 7B,峰 1,2)。进一步分析质谱碎片信息,峰 1 和峰 2 检测到与亚硫酸绿原酸加成物相同特征离子碎片 m/z 435.058 8, 355.101 1, 191.021 4。鉴定硫熏金银花中峰 1 和峰 2 为亚硫酸绿原酸加成产物。综上可初步判定未经硫熏金银花中没有绿原酸 + H_2SO_3 产物或者其含量极低。但经硫熏后金银花中出现绿原酸 + H_2SO_3 加成产物,硫熏金银花中有效成分绿原酸结构发生了变化。

4 总结与展望

本文探索了绿原酸与亚硫酸反应规律,初步鉴定反应产物结构,并在硫熏金银花中检测到相同的产物。质谱与核磁数据显示绿原酸与亚硫酸钠在温和条件下反应可以得到 7'或者 8'位加成亚硫酸加成产物。LC-MS-IT-TOF 检测结果显示,硫熏金银花质谱中存在亚硫酸绿原酸加成产物的特征碎片离子,提示硫熏后金银花中绿原酸化学性质也发生了 7'位和 8'位的硫酸加成,生成了绿原酸亚硫酸加成产物,在未硫熏的金银花药材中未检测到绿原酸亚硫酸加成化合物。

本研究首次证明了绿原酸与亚硫酸加成的反应



A. 绿原酸亚硫酸钠反应液;B. 未硫熏金银花;C. 硫熏金银花
图 7 绿原酸与亚硫酸钠反应液、金银花提取液提取离子流
Fig. 7 EIC of reaction solution of CQA and Na_2SO_3 , *Lonicerae Japonicae Flos* extract

位点,揭示了绿原酸与亚硫酸加成的反应原理。绿原酸中咖啡酰基为肉桂酸衍生物,含有 α,β -不饱和羰基(包括酯键、羧酸)肉桂酸衍生物广泛存在于中药材中,例如当归中阿魏酸,迷迭香中的迷迭香酸,丹参中的丹酚酸等。这类物质的 α,β -不饱和羰基很有可能与亚硫酸有类似的反应,本研究可为含有类似结构中药硫熏后化学成分的变化提供参考。

硫熏的药材养护方式虽然在药典中已被去除,但因其操作简便,成本低廉,大众对其认识不足等原因,市场中仍然存在硫熏的药材。2015 年版《中国

药典》中二氧化硫残留项标准为“除另有规定外,药材及饮片(矿物类除外)的二氧化硫残留量不得过 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ”^[16],部分药材(例如白芍、山药)的残留限度为 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ”^[17]。可见并未禁止硫熏,但控制过量硫熏,即使是合格药材也会有亚硫酸盐和药材中活性的成分的相互作用。绿原酸是金银花中重要活性化学成分,尽管目前还不明确金银花硫熏后产生的亚硫酸加成化合物对金银花功效和毒理活性影响,笔者仍关注硫熏药材中活性成分的变化情况,在将来通过进一步研究为硫熏的利弊评价提供更多证据。

[参考文献]

[1] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977:146.

[2] 周荣汉. 中药资源学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993:426-433, 179, 85.

[3] 袁琦, 赵辉, 蒲晓辉, 等. HPLC 法同时测定菊花中绿原酸、黄芩苷和槲皮素的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(2):112-115.

[4] 王金丹. 金银花中绿原酸的研究进展[J]. 农业科技与装备, 2016(6):59-61.

[5] 刘志敏. 对《中国药典》1995 年版一部硫黄熏法加工药材的看法[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(7):412.

[6] 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.

[7] 段素敏, 孔铭, 张艳波, 等. 硫磺熏蒸当归二氧化硫残留与内在质量变化相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21):41-44.

[8] 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.

[9] 王菲. 硫熏金银花成分分析与体内代谢研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.

[10] 孟正木. 穿心莲内酯亚硫酸氢钠加成物的结构研究[J]. 药学报, 1981, 16(8):571-575.

[11] 曹晓群, 程岱峰, 王玉民, 等. 维生素 K₃ 的合成研究[J]. 山东化工, 2003, 32(1):3-4.

[12] 陆钊, 孙鹏飞, 马硕, 等. 中药材中二氧化硫残留量测定方法比较[J]. 中南药学, 2015, 13(10):1077-1080.

[13] 吉琅, 廖晴, 吕维, 等. 中药材中二氧化硫残留量快速测定方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10):66-69.

[14] 罗奇志, 王有志, 罗佳波. 绿原酸水解产物的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7):1345-1349.

[15] 相婷, 吴立军, 侯捷, 等. 绿原酸乙酯的 NMR 研究[J]. 波谱学杂志, 1997, 14(5):387-391.

[16] 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, 2015:30.

[17] 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, 2015:28, 105.

[责任编辑 顾雪竹]