

基于UHPLC-Q-TOF-MS和化学计量学的金银花硫磺熏蒸前后化学成分差异性分析

钱岩¹, 黄逸文¹, 贾昌平¹, 顾晓风¹, 王添艳², 李丹³, 闵春艳^{1*}

1. 苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215104

2. 苏州卫生职业技术学院, 江苏 苏州 215009

3. 苏州大学, 江苏 苏州 215006

摘要: 目的 系统研究硫磺熏蒸对金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* 化学成分的影响, 寻找代表性的金银花硫磺熏蒸化学标志物。方法 采用UHPLC-Q-TOF-MS高分辨质谱法, 以Waters HSS T3为色谱柱, 0.1%甲酸水溶液和0.1%甲酸乙腈溶液为流动相, 梯度洗脱, 采用ESI负离子扫描模式对无硫金银花和硫磺金银花样品进行测定; 并结合Mass Profiler Professional软件, 应用主成分分析和t检验等化学计量学方法分析金银花硫磺熏蒸前后差异性成分, 并对主要差异成分进行鉴定。通过权重赋值法筛选硫磺熏蒸化学标志物。结果 无硫金银花和硫磺金银花样品可被明显地区分开, 主成分之间存在明显差异; 筛选出65种差异性化学成分, 对其中23种主要差异性成分进行了鉴定, 为金银花酚酸类化合物的磺化产物和亚硫酸加成产物, 以及环烯醚萜类化合物的亚硫酸酯和亚硫酸加成产物, 其中13种含硫衍生物未见文献报道; 并通过制备色谱分离和¹H-NMR确认了绿原酸磺化产物的化学结构。断马钱子酸亚硫酸酯、绿原酸磺化产物、马钱子苷A亚硫酸加成产物3个化合物权重赋值法得分较高。结论 筛选和鉴定了金银花硫磺熏蒸前后主要差异性成分, 断马钱子酸亚硫酸酯等3个含硫衍生物推荐为候选的硫磺熏蒸化学标志物。为阐明金银花化学成分在硫磺熏蒸过程中的转化机制以及硫磺金银花的筛查和金银花的质量控制提供了参考。

关键词: UHPLC-Q-TOF-MS; 化学计量学; 硫磺熏蒸; 金银花; 含硫衍生物; 硫磺熏蒸化学标志物

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)04-1146-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.04.004

Difference analysis of chemical constituents of *Lonicerae Japonicae Flos* before and after sulfur fumigation based on UHPLC-Q-TOF-MS and chemometrics

QIAN Yan¹, HUANG Yiwen¹, JIA Changping¹, GU Xiaofeng¹, WANG Tianyan², LI Dan³, MIN Chunyan¹

1. Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou 215104, China

2. Suzhou Vocational Health College, Suzhou 215009, China

3. Soochow University, Suzhou 215006, China

Abstract: Objective To comprehensively investigate the effect of sulfur fumigation on the chemical composition of Jinyinhua (*Lonicerae Japonicae Flos*, LJF) and seek the typical chemical markers of sulfur-fumigated LJF. **Methods** Both non-sulfur and sulfur-fumigated LJF were analyzed by UHPLC-Q-TOF-MS. The separation was conducted using a gradient elution program with 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid acetonitrile as mobile phases on a Waters HSS T3 column. In addition, ESI negative ion mode was employed for the mass spectrometry analysis. Chemometrics such as principal component analysis (PCA) and t-test were used to examine the variations in the chemical components of LJF before and after sulfur fumigation combined with Mass Profiler Professional software. The main differential components were subjected for the identification. The Weight assignment method was employed to screen chemical markers of sulfur fumigation. **Results** The results indicated that the non-sulfur and sulfur-fumigated LJF samples could be clearly distinguished, and significant difference was observed among the principal components. Sixty-five differential components were screened out, 23 of which were identified as the sulfonated products and sulfite acid addition products of

收稿日期: 2024-10-09

基金项目: 苏州市科技计划项目 (SYS2019116)

作者简介: 钱岩, 硕士, 主管中药师, 从事药品质量分析研究。E-mail: qianyan0717@163.com

*通信作者: 闵春艳, 博士, 主任中药师, 从事药品质量标准研究。E-mail: 944757490@qq.com

phenolic acid compounds, and sulfite esters and sulfite addition products of iridoid compounds of LJF. Thirteen sulfur-containing derivatives were not reported in the literature. The structure of the sulfonated product of chlorogenic acid was characterized by the preparative chromatography separation and ^1H NMR method. Three compounds including secologanic acid sulfite, sulfonated product of chlorogenic acid and strychnine A sulfite addition product got higher scores by the weight assignment method. **Conclusion** The principal differential components of LJF before and after sulfur fumigation were screened and identified. Three sulfur-containing derivatives were recommended as candidates of chemical markers of sulfur fumigation. This study provides a reference for the illustration of the transformation mechanism of chemical components in LJF during the sulfur fumigation and provided a basis for the rapid screening of sulfur-fumigated LJF and the quality control of LJF.

Keywords: UHPLC-Q-TOF-MS; chemometrics; sulfur fumigation; *Lonicerae Japonicae Flos*; sulfur-containing derivatives; chemical markers of sulfur fumigation

金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* (LJF) 为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 具有清热解毒、疏散风热的功效, 常用于风热感冒, 温病发热等症状^[1], 其化学成分包括酚酸类、环烯醚萜苷类、黄酮类和挥发油类等^[2-5], 通常采用烘干、晒干、阴干等方法进行产地加工。硫磺熏蒸中药材具有防腐、防霉、防虫蛀, 利于干燥等作用, 但会导致外源性有害物质的残留、改变药材的化学成分和药理药效等, 因此《中国药典》和 GAP 限制该方法的使用^[6-8], 但是市场上仍存在金银花和其他品种过度硫熏的情况^[9-11]。

已有研究通过高效液相色谱指纹图谱法^[12-13]、X 射线荧光谱法^[14]、高光谱成像^[15]等方法鉴别硫熏金银花, 但对金银花硫熏前后化学成分的具体变化与转化相关研究较少。Li 等^[16]报道了硫熏金银花中环烯醚萜类成分断马钱子酸的 4 种含硫衍生物, 郭爱丽等^[17]进一步研究了断马钱子酸转化为这些含硫衍生物的反应机制。田玉婷等^[18]报道了硫熏金银花中绿原酸亚硫酸加成产物。这些研究均是基于单一化学成分经硫熏后的转化情况, 不能全面反映金银花硫熏后化学成分的变化情况。Liu 等^[19]基于质谱总离子流图 (total ion chromatogram, TIC) 中的色谱峰, 系统研究了硫熏金银花中化学成分, 鉴定了 17 种新生成的含硫衍生物。但中药成分复杂, 很多成分难以分离, 仅通过 TIC 中的色谱峰不能充分识别金银花硫熏前后的差异性成分。本研究采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱 (UHPLC-Q-TOF-MS) 法, 通过提取离子递归处理质谱数据, 结合 Mass Profiler Professional 软件, 应用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和 t 检验等方法, 筛选金银花硫熏前后的差异性成分, 并对主要差异成分进行鉴定, 总结其转化规律, 挖掘潜在的金银花硫熏化学标志物, 以期全面阐明硫熏对金

银花化学成分的影响, 以及为金银花及含金银花中成药质量控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1290-6538 UHPLC-Q-TOF-MS 液相色谱质谱联用仪, 配 Mass Hunter Workstation (Version 10.0), Mass Hunter Profinder (Version 10.0), Mass Profiler Professional (Version 14.0) 软件 (美国 Agilent 公司); Buchi C620 中压制备液相色谱仪 (瑞士 Buchi 公司); Shimadzu LC-20AP 型高压制备液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司); Bruker AVANCE III 400 MHz 核磁共振谱仪 (瑞士 Bruker 公司); Milli-Q 型超纯水仪 (美国 Millipore 公司); XSE205DU 电子天平 (瑞士 Mettler 公司); SK5200HP 型超声清洗仪 (上海科导超声仪器有限公司); 6000C 型二氧化硫残留量测定仪 (青岛顺昕电子科技有限公司)。

1.2 试剂

对照品绿原酸 (批号 110735-201706, 质量分数 99.3%)、咖啡酸 (批号 110885-201703, 质量分数 99.7%) 均购自中国食品药品检定研究院; 对照品幼枝含断氧化马钱子苷 (批号 10520, 质量分数 98.0%) 购于 Nature Standard 公司。甲酸、乙腈均为 LC-MS 级, 购自美国 Thermo 公司。

1.3 样品

8 批金银花药材分别购自苏州的 3 家中药饮片厂, 经苏州市药品检验检测研究中心闵春艳主任中药师鉴定为忍冬科植物忍冬 *L. japonica* Thunb. 的干燥花蕾。按照《中国药典》2020 年版四部 2331 二氧化硫残留量测定法第一法 (酸碱滴定法) 进行二氧化硫残留量测定, 确定为无硫金银花, 具体信息见表 1。

硫熏金银花药材的制备: 采用库房硫磺熏蒸法进行模拟硫磺熏蒸, 在 18 m³ 的密闭硫磺熏房内,

表1 金银花样品信息及SO₂残留量检测结果

序号	产地	无硫金银花编号	SO ₂ 残留量 (×10 ⁻⁶)	硫熏金银花编号	SO ₂ 残留量 (×10 ⁻⁶)
1	河南	1-1	未检出	1-2	1 250
2	河南	2-1	未检出	2-2	845
3	河南	3-1	未检出	3-2	2 631
4	河南	4-1	未检出	4-2	1 951
5	山东	5-1	未检出	5-2	631
6	山东	6-1	未检出	6-2	608
7	山东	7-1	未检出	7-2	915
8	山东	8-1	未检出	8-2	909

将上述8批无硫金银花样品约40 kg均匀平铺于架子上, 点燃3.6 kg硫磺, 密闭放置3 d, 通风, 晾置3 d, 收样存放于塑料封口袋中, 即得自制硫熏的金银花药材, 按照《中国药典》2020年版方法测定SO₂残留量, 信息见表1。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

取绿原酸、咖啡酸和幼枝含断氧化马钱子苷对照品约10 mg, 精密称定, 分别置100 mL量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成每1 mL含0.101 3 mg绿原酸、0.107 9 mg咖啡酸、0.100 9 mg幼枝含断氧化马钱子苷的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

分别取无硫金银花和硫熏金银花粉碎, 过筛, 称取细粉约1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入50%甲醇溶液25 mL, 称定质量, 超声(功率500 W、频率53 kHz) 5 min, 浸泡18 h, 再继续超声(功率500 W、频率53 kHz) 60 min, 超声温度(30±5) °C, 放冷, 称定质量, 补足减失质量, 用0.22 μm滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 色谱条件

采用Waters UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以0.1%甲酸水溶液为流动相A, 0.1%甲酸乙腈溶液为流动相B, 梯度洗脱: 0~2 min, 5% B; 2~5 min, 5%~8% B; 5~13 min, 8%~12% B; 13~20 min, 12%~26% B; 20~31 min, 26%~70% B; 31~36 min, 70%~95% B; 36~38 min, 95% B; 38~38.1 min, 95%~5% B; 38.1~40 min, 5% B; 柱温40 °C; 体积流量0.40 mL/min; 进样量5 μL。

2.4 质谱条件

电喷雾负离子模式(ESI⁻); 雾化气压力40 psi (1 psi=6.895 kPa); 干燥气温度350 °C, 干燥气体积流量12 L/min; 毛细管电压3 500 V; 碎裂电压135 V; 扫描范围*m/z* 100~1 700, MS扫描速率1.5 spectra/s。二级质谱采用AUTO MSMS模式, 扫描范围*m/z* 50~1 200, 设置10、20、30、45 eV 4个不同碰撞能依次采集。

2.5 化合物3的提取与分离

取硫熏金银花5 kg, 用8倍量的25%乙醇浸提4 d, 滤过提取液, 45 °C减压浓缩至3 L。将浓缩提取液滤过后经C₁₈反相中压色谱分离, 以水-乙腈(0~100%)梯度洗脱, 得到的各组分采用LC-MS追踪分析, 结果显示目标物主要在洗脱部分10~16中, 将6个目标洗脱液减压浓缩干燥后, 用1 L水超声溶解, 再次经反相中压色谱分离, 以水-乙腈(0~5%)梯度洗脱, 结果显示目标物主要在洗脱部分13~21中。再经C₁₈高压制备色谱分离, 以0.1%三氟乙酸-乙腈(0~100%)梯度洗脱, 得目标洗脱部分, 再经高压制备色谱(0.1%三氟乙酸-甲醇, 0~100%)纯化得到化合物3。

2.6 多元统计学分析

检索金银花化学成分研究的相关文献, 通过Agilent PCDL软件化合物数据库管理系统, 构建中药金银花专属化学成分数据库, 包含各化合物的化学名称、相对分子质量、分子式和分子结构等信息。采用Mass Hunter Profinder软件对原始数据进行分子特征提取(molecular feature extraction, MFE)、数据对齐和过滤噪音处理, 以重新查找提取离子, 设置的主要参数为: 最小峰高为5 000, 化合物保留时间偏差±0.2 min, 质量偏差±1×10⁻⁵。将递归后的数据导入Mass Profiler Professional软件, 进行PCA和*t*检验, 筛选差异成分。

3 结果与分析

3.1 差异成分筛选

采用建立的UHPLC-Q-TOF-MS方法快速分析8批相对应的无硫金银花和硫熏金银花, 得到的TIC图见图1。在对比图中可以看出无硫金银花和硫熏金银花的TIC图存在一定的差异, 但是金银花中化学成分复杂, 很多成分难以在40 min内完全分离, 在TIC图中存在同一色谱峰中有多种化合物共洗脱的现象, 且目视无法观察到一些色谱峰的细微差别, 因此本研究采用Mass Hunter Profinder软件中

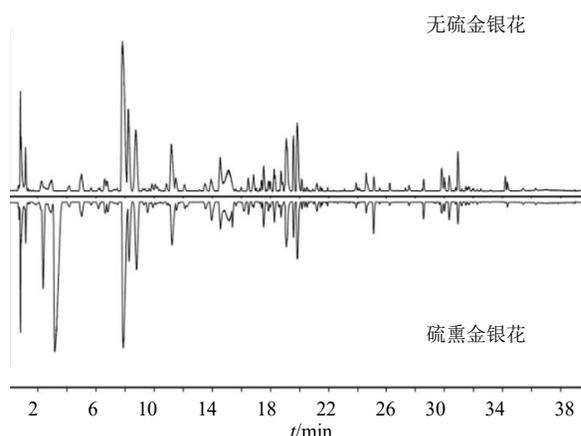
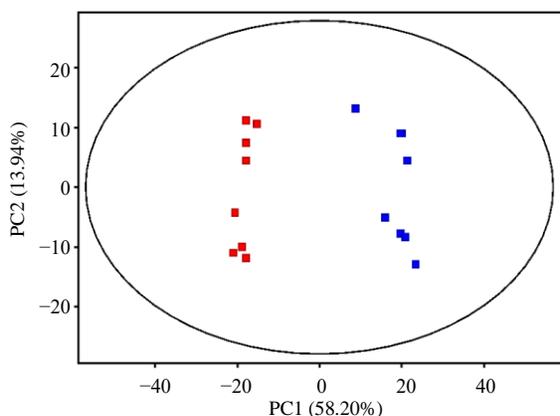


图1 无硫金银花和硫熏金银花的 TIC 对比图
Fig. 1 Compared TIC of non-sulfur and sulfur-fumigated LJF samples

的递归算法查找提取离子，该算法首先在各个样品的色谱图中提取数据，按照保留时间和质量数对特征峰进行对齐，生成目标列表，再以该列表为提取条件对 16 个样品的色谱图进行二次离子查找，最后对查找提取到的特征峰进行递归提取，因此同一个色谱峰中的不同质量数化合物也能够被识别并分别积分处理，获取到更多的谱图信息。

对提取离子后的质谱数据进行 PCA，PCA 得分图见图 2，主成分 PC1 和 PC2 的协方差累积贡献率为 72.1%，由图可知 2 组之间有良好的分离度，无硫金银花和硫熏金银花化学成分存在差异，证明硫磺熏蒸对金银花化学成分产生了明显的影响。

为了进一步探索差异性成分，对上述 16 批样



蓝色-无硫金银花组；红色-硫熏金银花组。
Blue-non-sulfur LJF; Red-sulfur-fumigated LJF.

图2 二维 PCA 得分图
Fig. 2 2D PCA score chart

品数据进行 t 检验，设置差异倍数 (fold change, FC) > 10 、 $P < 0.05$ ，通过 $\log_2 FC$ 和 $-\lg P$ 绘制火山图，将差异成分筛选可视化，见图 3。每个散点代表 1 个化学成分，离散程度越大、离 0 点距离越远，代表对两组差异性贡献率越大，红色散点是金银花硫熏后含量显著增加的化学成分，蓝色散点是金银花硫熏后含量显著降低的成分，绿色是两组共有成分且含量差异较小，灰色代表没有显著性差异。共筛选出 65 种差异性化学成分，对其中 23 个差异性较大 ($P < 1 \times 10^{-15}$)、有代表性的成分进行鉴定，均为含硫衍生物，并计算其变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) 值，结果详见表 2。23 个差异性化合物基本可分为以绿原酸为代表的咖啡酰奎宁酸类化合物含硫衍生物和以断马钱子酸为代表的环烯醚萜类化合物含硫衍生物。

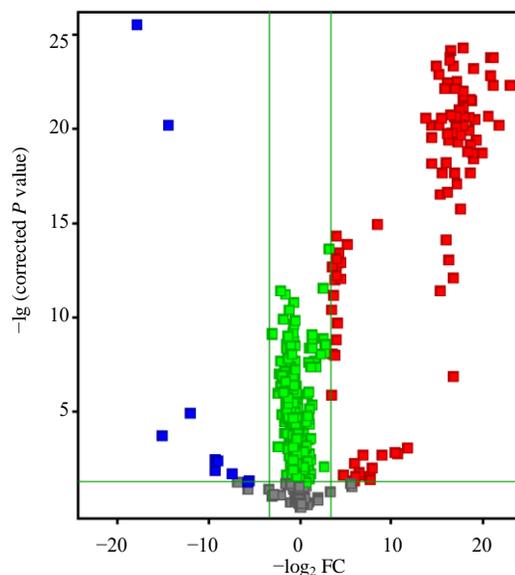


图3 差异性成分 t 检验火山图

Fig. 3 Volcano map of t -test for differential components

3.2 含硫衍生物的结构鉴定

根据目标差异性化合物的相对分子质量和二级碎片，以及含硫衍生物成分的特征碎片离子峰，结合各对照品的二级碎片和文献已总结的金银花中酚酸类和环烯醚萜类成分的质谱裂解规律^[20-23]，推测 23 个硫熏特征化合物的化学结构。

化合物 1 和 2 的准分子离子峰均为 m/z 435.060 7 $[M-H]^-$ ，保留时间分别为 0.79、1.40 min，预测分子式为 $C_{16}H_{20}O_{12}S$ 。在二级质谱图中，两者均产生 m/z 353.088 7 $[M-H-H_2SO_3]^-$ 、80.964 5 $[H_2SO_3-H]^-$ 、260.989 6 $[咖啡酸-H+H_2SO_3]^-$ 的特

表 2 23 个含硫衍生物的质谱数据及鉴定结果

Table 2 Mass spectrometry data and identification results of 23 sulfur-containing derivatives

编号	t/min	分子式	[M-H] ⁻	误差 (×10 ⁻⁶)	特征碎片	化合物鉴定	P 值	FC 值	VIP 值	平均 峰面积	参考 文献
1	0.79	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₂ S	435.060 7	0.92	353.088 7, 260.989 6, 80.964 5	单咖啡酰奎宁酸亚硫酸加成产物	2.6×10 ⁻²¹	400 674	1.327 8	467 653	18
2	1.40	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₂ S	435.060 2	0.23	353.088 2, 260.889 0, 80.965 2	单咖啡酰奎宁酸亚硫酸加成产物	2.6×10 ⁻²¹	400 674	1.327 8	468 309	18
3	5.87	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₂ S	433.044 9	0.69	258.995 2, 240.985 4, 215.004 5	绿原酸磺化产物	1.2×10 ⁻²⁴	65 677	1.328 5	928 753	/
4	7.43	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₅ S	597.092 1	0.17	515.117 1, 80.964 9	二咖啡酰奎宁酸亚硫酸加成产物	1.7×10 ⁻²⁰	494 226	1.327 5	592 554	20-23
5	10.52	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₅ S	597.092 0	0	515.116 6, 80.964 7	二咖啡酰奎宁酸亚硫酸加成产物	1.7×10 ⁻²⁰	609 471	1.327 9	717 472	20-23
6	10.98	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₅ S	597.092 3	0.50	515.114 2, 80.963 3	二咖啡酰奎宁酸亚硫酸加成产物	7.3×10 ⁻²¹	949 330	1.327 6	1 381 774	20-23
7	11.65	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₅ S	597.092 1	0.17	515.116 6, 80.964 3	二咖啡酰奎宁酸亚硫酸加成产物	7.2×10 ⁻²¹	463 458	1.327 6	551 052	20-23
8	15.27	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₅ S	595.076 5	0.34	433.045 5, 258.992 5, 240.982 0	二咖啡酰奎宁酸磺化产物	4.7×10 ⁻²⁵	36 905	1.328 6	41 548	/
9	15.97	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₅ S	595.076 6	0.50	433.044 5, 258.991 9, 240.980 8, 215.002 6	二咖啡酰奎宁酸磺化产物	1.8×10 ⁻²⁵	31 146	1.328 6	34 927	/
10	16.61	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₅ S	595.076 5	0.34	433.043 8, 258.991 6, 240.981 0	二咖啡酰奎宁酸磺化产物	3.4×10 ⁻²⁰	20 209	1.327 3	23 661	/
11	16.80	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₅ S	595.076 4	0.17	433.044 5, 258.991 7, 240.981 6	二咖啡酰奎宁酸磺化产物	2.4×10 ⁻²²	20 466	0.995 3	23 370	/
12	3.29	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₂ S	437.076 1	0.46	373.114 7, 275.023 5, 257.012 9	断马钱子酸亚硫酸酯	9.0×10 ⁻¹⁷	350	1.328 5	40 016 473	16-17, 24
13	1.91	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₃ S	455.086 3	0.44	373.110 1, 80.964 5	断马钱子酸亚硫酸加成产物	1.6×10 ⁻²¹	76 879	1.327 9	89 076	16-17
14	1.96	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₄ S	485.097 3	0.62	453.078 0, 291.021 5	幼枝含断氧化马钱子苷亚硫酸加成产物	3.9×10 ⁻¹⁹	147 850	1.326 7	179 988	/
15	2.67	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₄ S	485.097 1	0.21	453.073 2, 291.015 2	幼枝含断氧化马钱子苷亚硫酸加成产物	1.1×10 ⁻¹⁹	401 906	1.327 1	489 128	/
16	5.02	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₃ S	469.101 9	0.43	387.130 0	断马钱子苷亚硫酸加成产物	9.3×10 ⁻¹⁴	103 748	1.317 3	307 539	16-17, 20, 24
17	15.33	C ₃₃ H ₄₆ O ₂₂ S	825.213 2	0.36	743.235 4	马钱子苷 A 亚硫酸加成产物	2.3×10 ⁻²²	3 485 903	1.328 1	4 151 728	20, 23
18	16.15	C ₃₃ H ₄₆ O ₂₂ S	825.213 1	0.24	743.235 9	马钱子苷 A 亚硫酸加成产物	1.2×10 ⁻²⁴	2 293 440	1.328 5	2 614 252	20, 23
19	9.49	C ₃₂ H ₄₄ O ₂₂ S	811.197 7	0.62	729.218 3	去甲基马钱子苷 A 亚硫酸加成产物	4.2×10 ⁻²⁵	1 935 470	1.328 6	2 192 782	23
20	12.16	C ₃₂ H ₄₄ O ₂₂ S	811.197 0	0.25	729.219 6	去甲基马钱子苷 A 亚硫酸加成产物	5.3×10 ⁻²⁶	1 889 675	1.328 7	2 119 657	23
21	14.65	C ₃₂ H ₄₂ O ₂₁ S	793.186 4	0.38	729.223 3	去甲基马钱子苷 A 亚硫酸酯	6.5×10 ⁻²³	131 089	1.328 3	150 358	23
22	16.87	C ₃₂ H ₄₂ O ₂₁ S	793.187 0	0.38	729.224 7	去甲基马钱子苷 A 亚硫酸酯	8.6×10 ⁻²⁴	394 045	1.328 4	451 139	23
23	17.90	C ₃₂ H ₄₂ O ₂₁ S	793.186 8	0.13	729.224 7	去甲基马钱子苷 A 亚硫酸酯	9.9×10 ⁻²⁴	427 689	1.328 4	490 143	23

征碎片, 由此推断为亚硫酸加成产物。由碎片 m/z 191.057 2 [M-H-H₂SO₃-C₉H₆O₃]⁻、179.033 1 [M-H-H₂SO₃-C₇H₁₀O₅]⁻ 可推断化合物 **1** 和 **2** 结构中均含有咖啡酰基和奎宁酰基, m/z 179.033 1 进

一步脱水或者中性丢 CO₂ 生成 m/z 161.024 0 [M-H-H₂SO₃-C₇H₁₀O₅-H₂O]⁻ 和 m/z 135.044 9 [M-H-H₂SO₃-C₇H₁₀O₅-CO₂]⁻, 且上述 4 个碎片与绿原酸对照品二级碎片一致, 通过文献报道比对^[18],

化合物 **1** 和 **2** 推测为单咖啡酰奎宁酸亚硫酸加成产物, 其生成机制可能为咖啡酰基中 α,β -不饱和羰基与亚硫酸发生了 1,4 共轭加成或 1,2 亲核加成。

化合物 **3** 的准分子离子峰为 m/z 433.044 9 $[M-H]^-$, 预测分子式为 $C_{16}H_{18}O_{12}S$ 。在二级质谱图中, 产生了 m/z 258.995 2 $[咖啡酸-H+SO_3]^-$ 、240.985 4 $[咖啡酸-H+SO_3-H_2O]^-$ 、215.004 5 $[咖啡酸-H+SO_3-CO_2]^-$ 的特征碎片, 其余碎片如 m/z 191.058 4、161.025 4、135.045 3 与绿原酸对照品二级碎片一致, 化合物 **3** 初步推测为单咖啡酰奎宁酸磺化产物, 其生成机制初步推测可能为咖啡酰基上的苯环与三氧化硫发生磺化反应。

化合物 **4**~**7** 的准分子离子峰均为 m/z 597.092 1 $[M-H]^-$, 保留时间分别为 7.43、10.52、10.98、11.65 min, 预测分子式为 $C_{25}H_{26}O_{15}S$ 。在二级质谱图中, 产生 m/z 515.117 1 $[M-H-H_2SO_3]^-$ 和 m/z 80.964 9 $[H_2SO_3-H]^-$ 的特征碎片, 由此推断为亚硫酸加成产物, 其中 m/z 515.117 1 与文献报道^[20-23]中二咖啡酰基奎宁酸准分子离子峰一致。碎片 m/z 435.056 1 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ 与化合物 **1** 和 **2** 的准分子离子峰一致; 碎片 m/z 353.085 3、191.053 9、179.033 2、161.021 1、135.043 3 和化合物 **1** 和 **2** 的二级碎片一致, 由此推断化合物 **4**~**7** 比化合物 **1** 和 **2** 多 1 个咖啡酰基团, 为二咖啡酰奎宁酸亚硫酸加成产物, 生成机制与化合物 **1**、**2** 类似, 为新发现的含硫衍生物。

化合物 **8**~**11** (m/z 595.076 5 $[M-H]^-$, 保留时间分别为 15.27、15.97、16.61、16.80 min) 预测分子式为 $C_{25}H_{24}O_{15}S$, 二级碎片 m/z 433.044 5 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ 与化合物 **3** 的准分子离子峰一致, 其余碎片也与化合物 **3** 碎片一致, 推测化合物 **8**~**11** 为二咖啡酰基奎宁酸磺化产物, 生成机制与化合物 **3** 类似。

化合物 **12** 的准分子离子峰为 m/z 437.076 1 $[M-H]^-$, 预测分子式为 $C_{16}H_{22}O_{12}S$ 。由特征碎片 m/z 373.114 7 $[M-H-SO_2]^-$ 推测为亚硫酸酯类衍生物。化合物 **12** 的碎片 m/z 275.023 5 $[M-H-Glc]^-$ 和 m/z 257.012 9 $[M-H-Glc-H_2O]^-$ 分别与断马钱子酸对照品二级碎片 m/z 211.058 6 $[M-H-Glc]^-$ 和 m/z 193.051 2 $[M-H-Glc-H_2O]^-$ 相差 64 (SO_2)。此外, 碎片 m/z 211.058 5 $[M-H-SO_2-Glc]^-$ 、193.051 1 $[M-H-SO_2-Glc-H_2O]^-$ 、179.056 4 $[M-H-SO_2-Glc-H_2O-CH_2]^-$ 、149.061 1 $[M-H-SO_2-Glc-H_2O-CO_2]^-$ 与断马钱子酸对照品二级碎片一致, 对比文献报道^[16-17,24], 推断化合物 **12** 为

断马钱子酸亚硫酸酯。

化合物 **13** 的准分子离子峰为 m/z 455.086 3 $[M-H]^-$, 预测分子式为 $C_{16}H_{24}O_{13}S$ 。由特征碎片 m/z 373.110 1 $[M-H-H_2SO_3]^-$ 和 m/z 80.964 5 $[H_2SO_3-H]^-$ 推断为亚硫酸加成产物。碎片 m/z 275.023 5 $[M-H-Glc-H_2O]^-$ 与断马钱子酸对照品二级碎片 m/z 193.051 2 相差 82 (H_2SO_3), 碎片 m/z 211.058 5 $[M-H-H_2SO_3-Glc]^-$ 与断马钱子酸对照品二级碎片一致, 对比文献报道^[16-17], 推断化合物 **13** 为断马钱子酸水解产生的开链醛糖中间体与亚硫酸发生加成反应的产物。

化合物 **14** 和 **15** 的准分子离子峰均为 m/z 485.097 1 $[M-H]^-$, 保留时间为 1.96、2.67 min, 预测分子式为 $C_{17}H_{26}O_{14}S$ 。化合物 **14** 和 **15** 的碎片 m/z 453.073 2 $[M-H-CH_3OH]^-$ 和 m/z 291.015 2 $[M-H-CH_3OH-Glc]^-$ 分别与幼枝含断氧马钱子苷对照品二级碎片 m/z 371.097 5 $[M-H-CH_3OH]^-$ 和 m/z 209.101 0 $[M-H-CH_3OH-Glc]^-$ 相差 m/z 82 (H_2SO_3)。此外, 化合物 **14** 和 **15** 二级碎片 m/z 179.039 0 $[M-H-H_2SO_3-Glc-H_2O-CO_2]^-$ 和幼枝含断氧化马钱子苷对照品二级碎片 m/z 179.039 0 $[M-H-Glc-H_2O-CO_2]^-$ 一致, 由此推测化合物 **14** 和 **15** 为幼枝含断氧化马钱子苷亚硫酸加成产物及其同分异构体, 其生成机制可能为幼枝含断氧化马钱子苷的 α,β -不饱和羰基与亚硫酸发生了 1,4 共轭加成或 1,2 亲核加成, 为新发现的含硫衍生物。以 1,4 共轭加成为例, 其可能的结构和裂解途径见图 4, 可能的生成机制见图 5。

化合物 **16** 的准分子离子峰为 m/z 469.101 9 $[M-H]^-$, 预测分子式为 $C_{17}H_{26}O_{13}S$ 。由特征碎片 m/z 387.130 0 $[M-H-H_2SO_3]^-$ 推测为亚硫酸加成产物。 m/z 387.130 0 与文献报道^[20]中断马钱子苷准分子离子峰一致, 其他碎片 m/z 225.077 1 $[M-H-H_2SO_3-Glc]^-$ 、179.056 5 $[M-H-H_2SO_3-Glc-H_2O-CO]^-$ 与文献报道^[20]中断马钱子苷的碎片一致, 对比文献报道^[16-17,24]推测化合物 **16** 为断马钱子苷结构中的醛基与亚硫酸发生 1,2 加成的亚硫酸加成产物。

化合物 **17** 和 **18** 的准分子离子峰为 m/z 825.213 1 $[M-H]^-$, 保留时间分别为 15.33、16.15 min, 预测分子式为 $C_{33}H_{46}O_{22}S$ 。由特征碎片 m/z 743.235 9 $[M-H-H_2SO_3]^-$ 推测为亚硫酸加成产物, 该碎片与文献报道^[20,23]的马钱子苷 A 准分子离子峰一致, 其余二级碎片如 m/z 563.180 7 $[M-H-H_2SO_3-Glc-H_2O]^-$

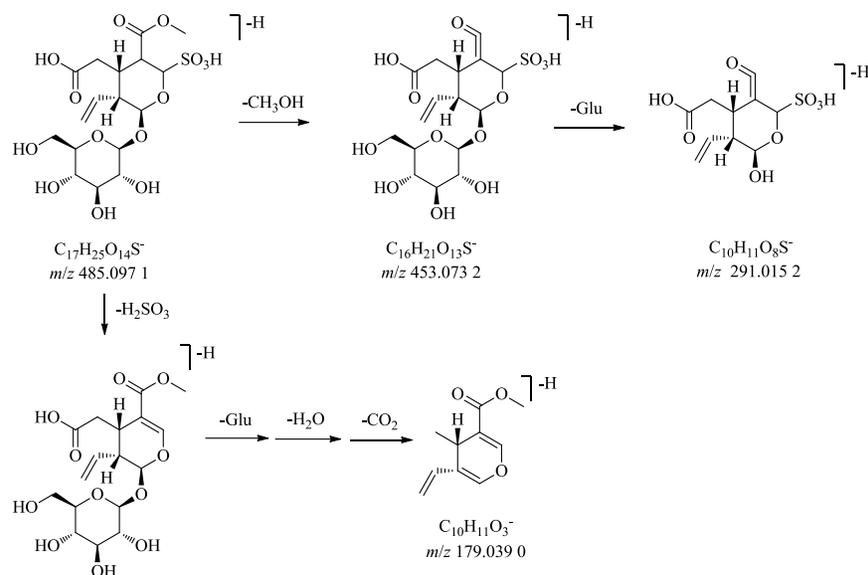


图 4 化合物 14、15 可能的化学结构和裂解途径

Fig. 4 Possible chemical structures and fragmentation pathways of compounds 14 and 15

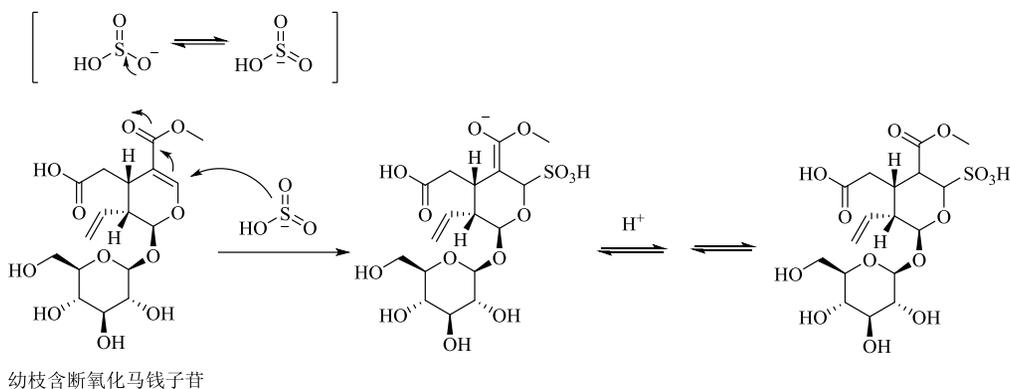


图 5 化合物 14、15 可能的生成机制

Fig. 5 Possible formation pathway of compounds 14 and 15

$\text{H}_2\text{O}]^-$ 、511.142 5 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{逆 DA 裂解}]^-$ 、467.153 9 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{逆 DA 裂解}-\text{CO}_2]^-$ 也均与文献报道^[20,23]中马钱子苷 A 碎片一致, 由此推测化合物 17 和 18 为马钱子苷 A 亚硫酸加成产物, 其生成机制可能为马钱子苷 A 结构中的 α,β -不饱和羰基与亚硫酸发生了 1,4 共轭加成或 1,2 亲核加成, 为新发现的含硫衍生物。

化合物 19 和 20 的准分子离子峰均为 m/z 811.197 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 保留时间分别为 9.49、12.16 min, 预测分子式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_{22}\text{S}$ 。由特征碎片 m/z 729.218 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{SO}_3]^-$ 推测为亚硫酸加成产物, m/z 729.218 3 与文献报道^[23]中去甲基马钱子苷 A 准分子离子峰一致, 碎片 m/z 685.228 9 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{CO}_2]^-$ 、549.158 7 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{Glc}-$

$\text{H}_2\text{O}]^-$ 、497.127 4 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{逆 DA 裂解}]^-$ 、453.136 4 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{逆 DA 裂解}-\text{CO}_2]^-$ 、409.150 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{逆 DA 裂解}-\text{CO}_2-\text{CO}_2]^-$ 均与文献报道^[23]中去甲基马钱子苷 A 碎片一致。此外, 碎片 m/z 767.182 2 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ 与碎片 m/z 685.228 9 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{CO}_2]^-$ 相差 82 (H_2SO_3), 因此化合物 19 和 20 推测为去甲基马钱子苷 A 亚硫酸加成产物, 其生成机制可能为去甲基马钱子苷 A 结构中的 α,β -不饱和羰基与亚硫酸发生了 1,4 共轭加成或 1,2 亲核加成, 为新发现的含硫衍生物。

化合物 21 ~ 23 的准分子离子峰均为 m/z 793.187 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 保留时间分别为 14.65、16.87、17.90 min, 预测分子式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_{21}\text{S}$ 。由特征碎片 m/z 729.224 7 $[\text{M}-\text{H}-\text{SO}_2]^-$ 推测为亚硫酸酯类化

合物。 m/z 729.224 7 与文献报道^[23]中去甲基马钱子苷 A 准分子离子峰一致, 碎片 m/z 749.191 4 [M-H-CO₂]⁻、631.130 1 [M-H-Glc]⁻、561.095 1 [逆 DA 裂解]⁻、517.099 7 [逆 DA 裂解-CO₂]⁻均分别与文献报道^[23]中去甲基马钱子苷 A 碎片相差 64 (SO₂), 推测化合物 21~23 为去甲基马钱子苷 A 亚硫酸酯, 其生成机制可能为去甲基马钱子苷 A 结构中的羟

基与亚硫酸发生酯化反应, 为新发现的含硫衍生物, 其可能的结构和裂解途径见图 6。

此外, 本研究中火山图的蓝色散点为金银花硫熏后含量减少的化学成分, 共有 12 个化合物, 通过与文献中一级和二级质谱数据比对, 鉴定出离 0 点距离最远的点即差异性最大的化合物为忍冬碱苷 N (保留时间 9.381 min, m/z 534.198 2 [M-H]⁻)^[23]。

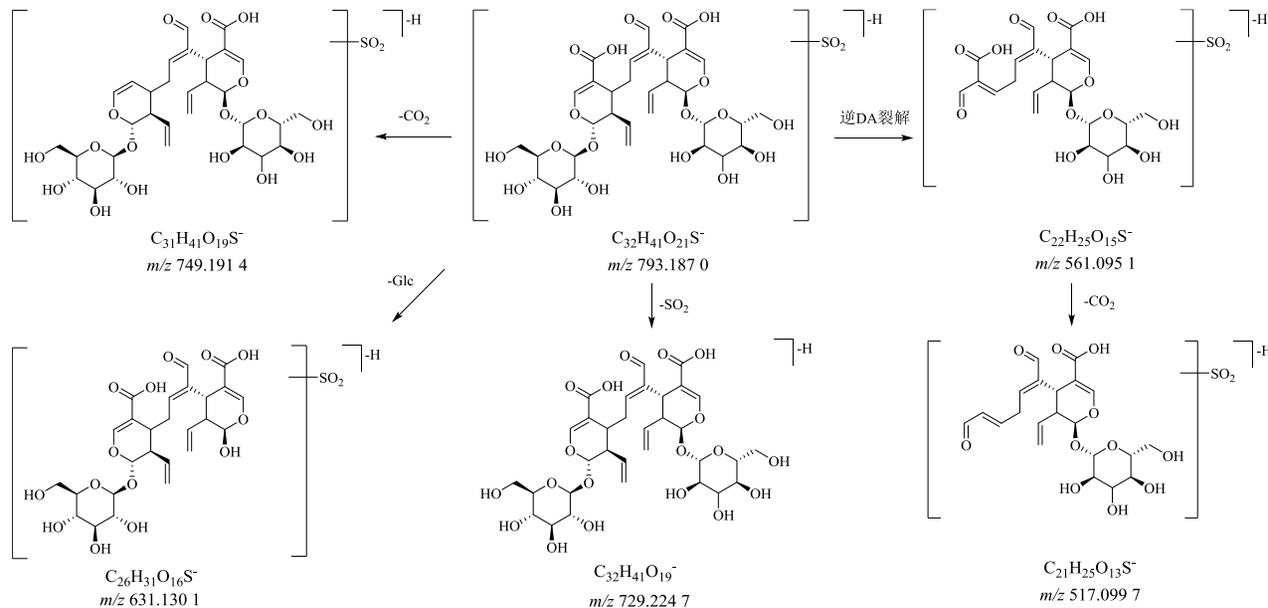


图 6 化合物 21~23 可能的化学结构和裂解途径

Fig. 6 Possible chemical structures and fragmentation pathways of compounds 21—23

3.3 绿原酸磺化产物结构确证

绿原酸等酚酸类化合物上的苯环结构与三氧化硫发生磺化反应是新发现的含硫衍生物结构类型和转化机制, 为进一步验证磺化产物的化学结构, 本研究通过多次制备色谱法对其进行制备分离, 获得化合物 3, 并通过 ¹H-NMR 法进一步对其结构进行确认。结果通过“2.5”项下方法制备分离得到的化合物单体与硫熏金银花样品溶液中化合物 3 的保留时间一致,

且准分子离子峰及二级碎片均一致 (图 7、8)。

化合物 3 的 ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) 图谱中, δ 1.93, 2.08 (2H, m), 1.97, 2.12 (2H, m), 3.81 (1H, dd, $J = 2.8, 9.2$ Hz), 4.15 (1H, m), 5.23 (1H, td, $J = 4.4, 10.4$ Hz) 的质子信号推测结构中存在奎宁酸结构片段; δ 6.24 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), 8.32 (1H, d, $J = 15.6$ Hz) 是 1 个典型的反式双键结构片段; 低场的 2 个芳香质子信号 δ 6.89 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.10 (1H, d,

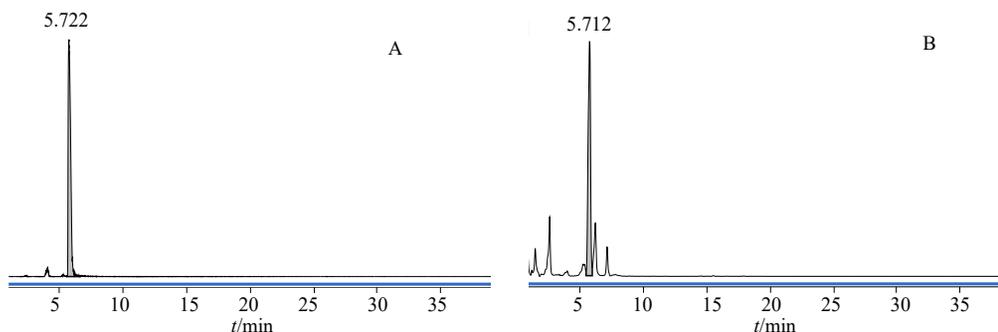


图 7 制备化合物 (A) 与供试品溶液中化合物 3 (B) 的提取离子色谱图

Fig. 7 Extract ion chromatograms of preparative compound (A) and compound 3 in sample solution (B)

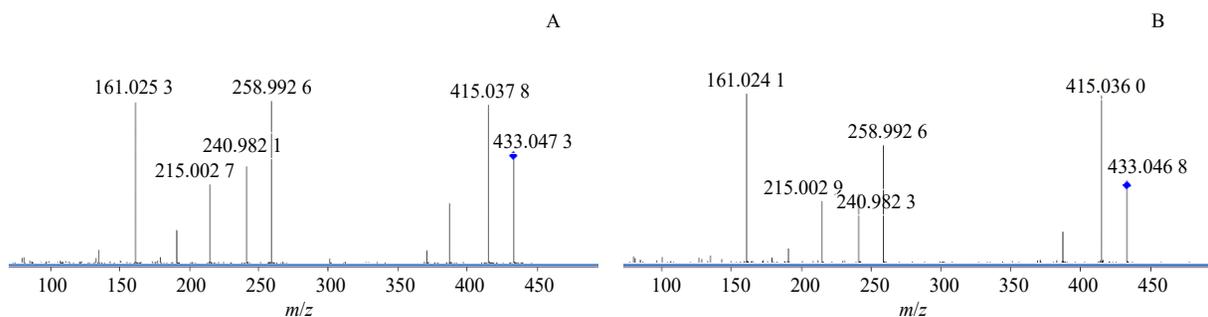


图8 制备化合物(A)与供试品溶液中化合物3(B)的二级质谱图

Fig. 8 ESI-MS/MS spectra of preparative compound (A) and compound 3 in sample solution (B)

$J=8.8$ Hz) 可推断化合物3是1个1',2',3',4'-四取代苯环结构。

将化合物3的 $^1\text{H-NMR}$ 与绿原酸 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) 进行比较, 见图9和表3。根据文献报道^[18]对绿原酸 $^1\text{H-NMR}$ 信号的归属, 峰8'和峰7'分别为绿原酸8'位和7'位上的烯键质子, 峰5'、6'、2'分别为绿原酸5'位、6'位和2'位上的苯环质子。相比绿原酸, 化合物3的烯键质子、苯环质子均向低场移动, 且其ABX自旋偶合系统中X位(即2'位)质子 [δ 6.98 (1H, brs)] 消失, 而位于高场的奎宁酸氢质子的化学位移、裂分、偶合常数等基本无变化。结合“2.3”项下的质谱分析数据, 确认化合物3为绿原酸2'位苯环质子被磺酸基(- SO_3H)取代的产

物, 即绿原酸2'位与 SO_3 发生磺化反应的产物, 命名为(1R,3S,4S,5S)-3-[[*E*]-3-(3,4-二羟基-2-磺苯基)丙烯酰]氧基}-1,4,5-三羟基环己烷-1-羧基。其质谱裂解途径见图10, 转化机制见图11, 为新发现的含硫衍生物结构类型和转化机制。

3.4 权重赋值综合筛选硫熏化学标志物

通过 P 值、 FC 值、 VIP 值、峰面积、 SO_2 残留量相关性、化学稳定性以及前体化合物的药效作用和前体化合物含量测定指标性8个参数对上述23个差异性化合物进行综合评价, 将这8个参数作为权重指标予以量化。其中“ SO_2 残留量相关性”是将每批次各化合物峰面积与相应的 SO_2 残留量进行相关性检验; “化学稳定性”是指将硫熏后的8批药

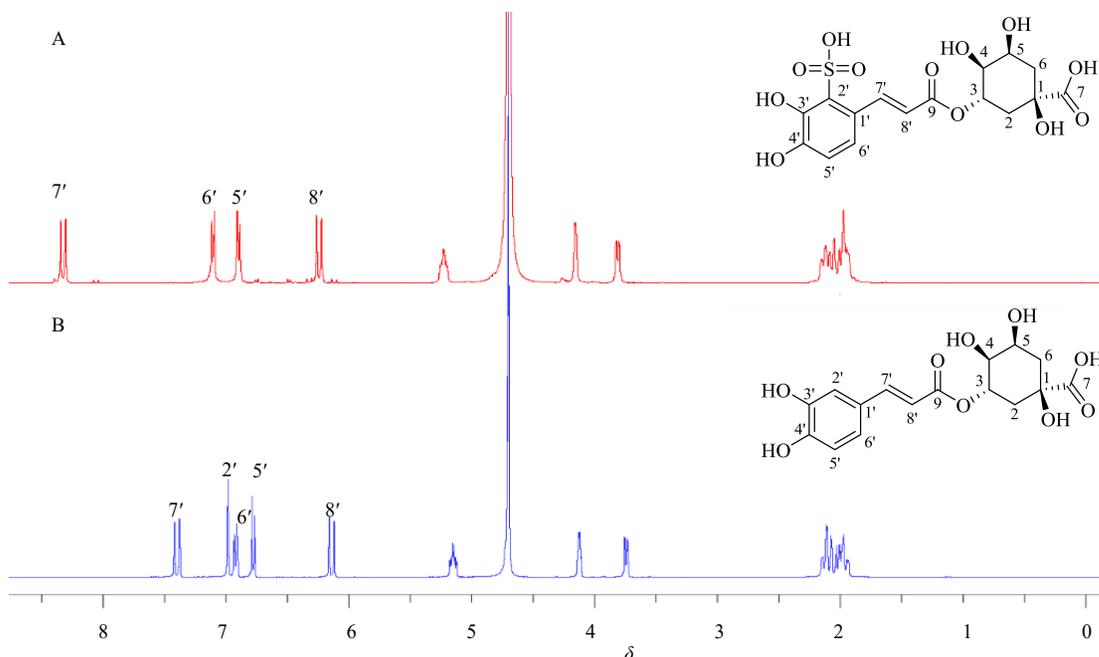


图9 化合物3(A)和绿原酸(B)的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱

Fig. 9 $^1\text{H-NMR}$ spectra of compound 3 and chlorogenic acid

表 3 化合物 3 和绿原酸 ¹H-NMR 峰信号归属
Table 3 ¹H-NMR peaks assignment of compound 3 and chlorogenic acid

碳位	δ_H	
	化合物 3	绿原酸
2	1.93, 2.08 (2H, m)	1.97, 2.08 (2H, m)
6	1.97, 2.12 (2H, m)	1.99, 2.11 (2H, m)
4	3.81 (1H, dd, <i>J</i> = 2.8, 9.2 Hz)	3.74 (1H, dd, <i>J</i> = 3.2, 8.8 Hz)
5	4.15 (1H, m)	4.12 (1H, m)
3	5.23 (1H, td, <i>J</i> = 4.4, 10.4 Hz)	5.15 (1H, td, <i>J</i> = 4.4, 8.8 Hz)
8'	6.24 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)	6.14 (1H, d, <i>J</i> = 16.0 Hz)
5'	6.89 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.77 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)
6'	7.10 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.92 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)
2'	—	6.98 (1H, brs)
7'	8.32 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)	7.39 (1H, d, <i>J</i> = 16.0 Hz)

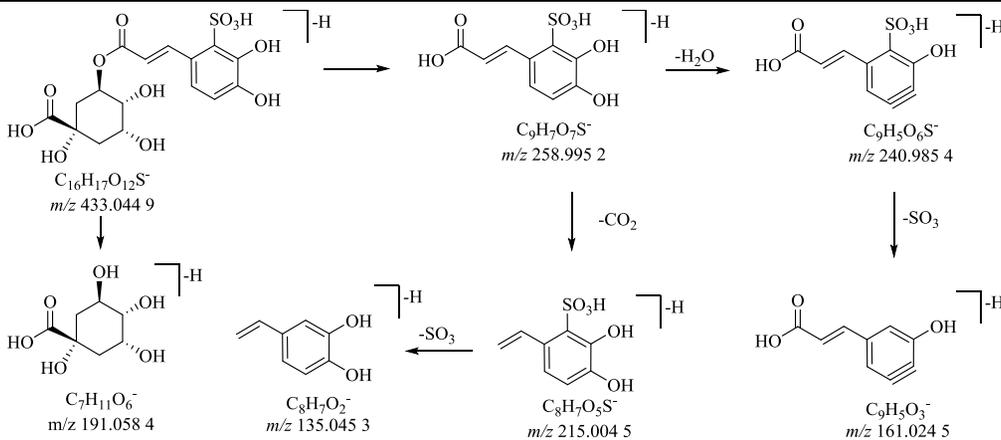


图 10 化合物 3 的质谱裂解途径

Fig. 10 Fragmentation pathways of compound 3

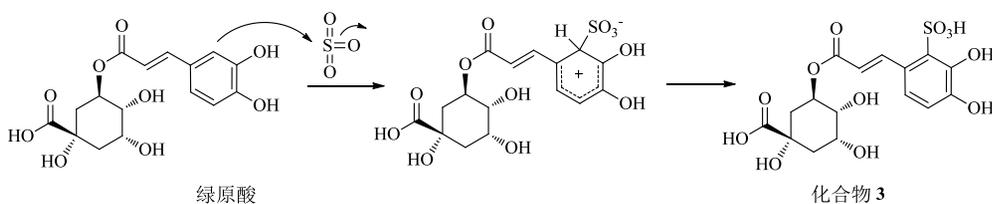


图 11 化合物 3 的转化生成途径

Fig. 11 Transformation pathway of compound 3

材置烘箱中在 60 °C 放置 10 d, 考察各化合物峰面积变化;“前体化合物的药效作用”是利用文献计量学考察绿原酸、断马钱子酸、幼枝含断氧化马钱子苷、断马钱子苷、马钱子苷 A、去甲基马钱子苷 A 等前体化合物在近 20 年发表的金银花活性成分分析文献中所占的比重^[25-27], 同法考察“含量测定指标性”参数^[25-27]。

采用层次分析法 (analytic hierarchy process, AHP) 和基于指标相关性的权重确定方法 (criteria importance through intercriteria correlation, CRITIC) 相结合的组合权重赋值法确定各参数权重系数。

AHP 是主观确定权重赋值的方法^[28-29], 将 8 项指标分成 8 个层次, 并确定各指标的优先顺序: 峰面积 = 稳定性 > *P* 值 = FC 值 = VIP 值 > 与 SO₂ 残留量相关性 > 前体化合物的药效作用 = 前体化合物含量测定指标性, 以此构成两两比较的判断优先矩阵, 并获得各项指标的相对评分。AHP 法计算得到 *P* 值、FC 值、VIP 值、峰面积、SO₂ 残留量相关性、化学稳定性、前体化合物的药效作用及前体化合物含量测定指标性 8 项指标权重系数分别为 0.126 8、0.126 8、0.126 8、0.195 7、0.089 7、0.195 7、0.069 2、0.069 2, 一致性比例因子 CR 值 (0.022) 远低于 0.1 的阈值,

表明所构建的判断矩阵具有良好的一致性, 权重系数有效。CRITIC 法是客观权重赋值的方法^[28-29], 以指标间的对比强度和冲突性来综合确定权重。首先对 8 项指标的数据做线性插值处理, 对于 P 值采用公式: 无量纲数据 = (最大值 - 实测值) / (最大值 - 最小值) × 100; 对于其他 7 项指标采用公式: 无量纲数据 = (实测值 - 最大值) / (最大值 - 最小值) × 100, 用 SPSS 在线统计软件处理数据, 计算得到 P 值、FC 值、VIP 值、峰面积、SO₂ 残留量相关性、化学稳定性、前体化合物的药效作用及前体化合物含量测定指标性 8 项指标权重系数分别为 0.098 0、0.139 4、0.101 4、0.104 9、0.168 0、0.094 2、0.155 5、0.138 6。

采用 AHP 法得到了以主观信息为基础的权重系数 (ω_{AHP}), 基本体现了金银花硫熏特征物所需要的含量、化学稳定性、差异性和代表性依次重要顺序。采用 CRITIC 法得到了各指标的客观权重系数 (ω_{CRITIC}), 弥补了主观赋权存在的片面性。将 2 种方法相结合, 可以得到更加合理的综合权重 ($\omega_{\text{AHP-CRITIC}}$), 计算公式为 $\omega_{\text{AHP-CRITIC}} = \omega_{\text{AHP}}\omega_{\text{CRITIC}} / \sum \omega_{\text{AHP}}\omega_{\text{CRITIC}}$ 。计算得到 P 值、FC 值、VIP 值、峰面积、SO₂ 残留量相关性、化学稳定性、前体化合物的药效作用及前体化合物含量测定指标性 8 项指标综合权重系数分别为 0.098 0、0.139 4、0.101 4、0.104 9、0.168 0、0.094 2、0.155 5、0.138 6。采用该系数对各项指标进行综合评分, 结果见表 4, 可以看出化合物 12 (断马钱子酸亚硫酸酯)、化合物 3 (绿原酸磺化产物)、化合物 17 (马钱子苷 A 亚硫酸加成产物) 得分较高, 可作为候选的金银花硫熏化学标志物。

4 讨论

本研究通过 UHPLC-QTOF-MS 法结合 PCA、 t 检验等统计学手段分析金银花硫熏前后化学成分的变化, 筛选出 65 种差异性化学成分, 对其中 23 种主要差异性成分进行了鉴定, 其中二咖啡酰奎宁酸亚硫酸加成产物、幼枝含断氧化马钱子苷亚硫酸加成产物、马钱子苷 A 亚硫酸加成产物、去甲基马钱子苷 A 亚硫酸加成产物、去甲基马钱子苷 A 亚硫酸酯及其相应的同分异构体共 13 个化合物为新发现的金银花含硫衍生物。此外, 通过制备液相分离和 ¹H-NMR 结构确证, 揭示了绿原酸苯环磺化反应产物这 1 新的含硫衍生物结构类型和转化机制。

基于以上 23 个化合物可能的化学结构, 硫熏后金银花中化学成分转化规律主要为 4 类: (1) 酚

表 4 23 个差异化化合物 AHP-CRITIC 综合权重得分
Table 4 Weighted scores of 23 differentiated compounds using AHP-CRITIC

排序	化合物	AHP-CRITIC 评价得分	排序	化合物	AHP-CRITIC 评价得分
1	12	58.92	13	7	39.37
2	3	53.16	14	6	38.79
3	17	52.41	15	13	36.99
4	18	46.47	16	23	34.36
5	2	45.60	17	22	32.45
6	1	44.86	18	21	32.40
7	20	42.74	19	10	28.13
8	19	41.55	20	8	27.36
9	4	41.32	21	9	26.46
10	15	40.11	22	11	18.55
11	14	39.85	23	16	14.37
12	5	39.51			

羟基、半缩醛羟基等结构中的羟基与亚硫酸发生酯化反应, 该类亚硫酸酯类衍生物的准分子离子峰呈现为原型化合物 + 64 (SO₂), 对应的质谱裂解碎片常见 [M - 64] 特征碎片。本研究中以断马钱子酸为代表的环烯醚萜类化合物均含羟基基团, 易发生该类反应。(2) α, β -不饱和羰基基团与亚硫酸发生 1,2 亲核加成或 1,4 共轭加成, 该类亚硫酸加成衍生物的准分子离子峰呈现为原型化合物 + 82 (H₂SO₃), 相应的质谱裂解碎片常见 [M - 82] 特征碎片。金银花中以咖啡酰奎宁酸类及环烯醚萜类化合物中均含有较多的 α, β -不饱和羰基结构, 均易与亚硫酸发生此类反应。(3) 醛基基团与亚硫酸发生加成反应, 该类亚硫酸加成衍生物的准分子离子峰和质谱裂解碎片与反应 (2) 相同, 如金银花中断马钱子酸在酸性条件内酯环易水解开环, 生成醛基基团, 与亚硫酸发生加成反应。(4) 苯酚结构与三氧化硫发生磺化反应, 生成邻羟基苯磺酸, 该类产物的准分子离子峰呈现为原型化合物 + 80 (SO₃), 质谱裂解碎片常见 [M - 80] 特征碎片, 金银花中以绿原酸为代表的酚酸类化合物易发生此类反应。

干燥加工是影响金银花品质和化学成分含量的重要因素, 本研究发​​现金银花经硫熏的方式加工后绿原酸等酚酸类化合物经过一系列转化反应生成含硫衍生物, 导致绿原酸含量降低。但是伍继东等^[30]采用紫外分光光度计法测定硫熏和烘干金银花中绿原酸的含量, 结果发现硫熏金银花中绿原酸

含量更高,孙曙光等^[31]采用高效液相色谱法也得出同样的结论。霍文杰等^[32]以绿原酸、木犀草苷、总黄酮为指标,比较不同干燥方法对金银花中指标性成分的影响,结果绿原酸含量的排序为微波干燥>硫磺熏蒸>烤房干燥>自然晒干,推断是因为绿原酸作为多酚羟基酸性物质热稳定性差,会因温度过高而分解,也会在多酚氧化酶的作用下氧化缩合成高分子有色物质,在一定温度范围内,干燥温度越高多酚氧化酶的活性越强,且干燥时间越长绿原酸的氧化量越多。因此与硫熏转化损失的绿原酸量对比,自然晒干和烘干的绿原酸损失量更多。但是这仅仅是干燥加工过程中金银花指标性成分绿原酸的变化情况,课题组前期研究发现,由于金银花特殊的呈密闭筒状结构,硫熏后残留的二氧化硫等物质不易挥发,可较长时间保留在花蕾内部,这可能导致硫熏后的金银花在储藏期因二氧化硫等物质的残留持续引发化学成分的变化。

硫熏后药材化学成分的变化势必会引起药理毒理的改变。马晓青^[33]综合考察了硫磺熏蒸对金银花药效和毒性的影响,结果发现金银花硫熏后抗菌作用增强,抗病毒作用降低,急性毒性增强,长期毒性结果显示硫熏金银花对肝肾功能以及排泄代谢有一定的影响。该毒性的增强是否与本研究鉴定出的差异性化合物有关,还需做进一步的化合物纯化和药理毒理试验。另有文献报道了金银花硫熏后抗氧化活性增加^[24],认为是酚酸类化合物、黄酮类化合物和硫熏后产生的环烯醚萜类含硫衍生物共同作用的结果,本研究也证实了金银花经硫熏后环烯醚萜类含硫衍生物含量确实显著增加。

二氧化硫残留量是目前普遍认可的硫熏评价指标,其残留量大小可初步反映药材硫熏程度,但其操作繁琐、专属性差,且存在检测不完全、假阳性等缺点。硫熏化学标志物可作为中药质量控制的重要指标是金银花及含金银花中成药质量控制的有效辅助手段。本研究采用综合加权评价法从差异性、含量、稳定性和代表性等8个方面挖掘出3个候选金银花硫熏化学标志物,这些化合物是筛选出的理论候选范围,可为后续研究提供方向。但硫熏化学标志物的确立仍需更多的探索,包括药理毒性研究以及考察该化合物反映硫熏程度的有效性、涵盖其他产地金银花的代表性等,以期快速鉴别硫熏金银花及判断中成药中投料金银花的硫熏程度,完善金银花及其中成药质量控制与品质评价。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 230.
- [2] 熊乐文, 金莹, 王彦予, 等. 金银花酚酸类化学成分、药理活性及体内代谢研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(3): 864-871.
- [3] 刘天亮, 董诚明, 齐大明. 基于中药质量标志物 (Q-marker) 的金银花指纹图谱体系的构建思路 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 229-235.
- [4] 魏晓芳, 沈婉莹, 李阳芳, 等. 金银花黄酮苷类化学成分研究 [J]. 中草药, 2023, 54(11): 3424-3429.
- [5] 刘艳萍, 王云, 贾哲, 等. 基于 GC-MS 和多元统计方法分析不同产地金银花挥发性成分的差异 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(20): 5508-5519.
- [6] 杨慧娟, 董林林, 郑文科. 我国中药材生产质量管理中存在的问题与对策 [J]. 中国现代中药, 2024, 26(3): 425-430.
- [7] 黄思勇, 金显平, 康振兴, 等. 中药饮片质量控制途径探讨 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49(8): 167-169.
- [8] 李哲, 赵振华, 玄静, 等. 金银花干燥加工研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(8): 156-159.
- [9] 左甜甜, 金红宇, 王莹, 等. 以风险控制为核心的中药外源性有害残留物标准建设初步成效及展望 [J]. 中国食品药品监管, 2023(1): 26-35.
- [10] 郭丹, 杨洋, 史岚, 等. 2017年至2021年上海市药品质量抽检不合格数据分析 [J]. 药品评价, 2023, 20(1): 10-13.
- [11] 许玮仪, 于江勇, 金红宇, 等. 我国2013—2017年中药材及饮片硫熏情况调查以及二氧化硫残留量限度标准建议 [J]. 中国药房, 2019, 30(24): 3330-3336.
- [12] 马晓青, 蔡皓, 刘晓, 等. 硫磺熏蒸前后金银花的 HPLC 指纹图谱比较和聚类分析 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(1): 92-95.
- [13] 刘伟, 茹凡书, 崔永霞, 等. 烘干与硫熏金银花药材 HPLC 指纹图谱对比 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 111-113.
- [14] 方萍, 邹雯, 买尔哈巴·买买提, 等. X 射线荧光光谱法快速鉴别硫磺熏蒸金银花 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1587-1590.
- [15] Liu Y H, Wang Q Q, Xu Q, *et al.* Non-destructive detection of *Flos Lonicerae* treated by sulfur fumigation based on hyperspectral imaging [J]. *J Food Meas Charact*, 2018, 12(4): 2809-2818.
- [16] Li Z Y, Gao H M, Sun J, *et al.* Secoiridoid sulfonates from the sulfiting-processed buds of *Lonicera japonica* [J]. *Helv Chim Acta*, 2012, 95(7): 1144-1151.
- [17] 郭爱丽, 高慧敏, 陈两绵, 等. 硫磺熏蒸金银花中断马钱子酸亚硫酸衍生物产生的机制探讨 [J]. 中国中药

- 杂志, 2014, 39(9): 1639-1643.
- [18] 田玉婷, 王玉, 霍志鹏, 等. 绿原酸与亚硫酸根的反应与其在鉴别硫熏药材的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23): 122-127.
- [19] Liu Z H, Wang Y Q, Mei X D, *et al.* Comprehensive analysis of the chemical constituents in sulfur-fumigated *Lonicerae Japonicae Flos* using UHPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(2): 148-160.
- [20] 龚兴成, 刘文静, 曹丽波, 等. DI-MS/MSALL 法快速定性分析金银花的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2220-2228.
- [21] 李泮霖, 李楚源, 刘孟华, 等. 基于 UFLC-Triple-Q-TOF-MS/MS 技术的金银花、山银花化学成分比较 [J]. 中南药学, 2016, 14(4): 363-369.
- [22] Pan H Q, Zhou H, Miao S, *et al.* An integrated approach for global profiling of multi-type constituents: Comprehensive chemical characterization of *Lonicerae Japonicae Flos* as a case study [J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1613: 460674.
- [23] Zhang F X, Li Z T, Li M, *et al.* Dissection of the potential anti-influenza materials and mechanism of *Lonicerae Japonicae Flos* based on *in vivo* substances profiling and network pharmacology [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 193: 113721.
- [24] Guo A L, Chen L M, Wang Y M, *et al.* Influence of sulfur fumigation on the chemical constituents and antioxidant activity of buds of *Lonicera japonica* [J]. *Molecules*, 2014, 19(10): 16640-16655.
- [25] 马涵玉, 钱琪, 牛丽颖. 基于文献计量学的金银花研究现状与热点分析 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(7): 1426-1434.
- [26] 袁悦, 张林林, 刘建庭, 等. 中药金银花质量标志物预测分析研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(7): 1730-1738.
- [27] 刘艳萍, 王云, 贾哲, 等. 基于颜色-特征成分关联分析及网络药理学的金银花质量标志物(Q-Marker)研究 [J]. 中草药, 2024, 55(14): 4882-4896.
- [28] 丁涵, 徐忠坤, 王振中, 等. 基于 AHP-CRITIC 混合加权法和 Box-Behnken 设计-响应面法优化羌芩颗粒成型工艺及其物理指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 787-797.
- [29] 张琳, 周欣, 闫丹, 等. 基于 CRITIC-AHP 权重分析法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选陈皮饮片炮制工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3829-3834.
- [30] 伍继东, 秦婧. 硫熏金银花 SO₂ 残留量及绿原酸含量的分析 [J]. 山东医药工业, 2002, 21(5): 7-8.
- [31] 孙曙光, 刘伟, 徐倩, 等. 不同产地硫熏和烘干金银花中绿原酸含量的高效液相色谱测定 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3): 669-670.
- [32] 霍文杰, 李卫民, 高英. 干燥方法对金银花中绿原酸、木犀草苷及总黄酮含量的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(5): 737-741.
- [33] 马晓青. 硫磺熏蒸导致杭白菊和金银花化学成分、药效及毒性变化的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.

[责任编辑 王文倩]