

· 资源与鉴定 ·

五味子中5-羟甲基糠醛含量与仓储和色泽的相关性

吴翠, 高岳瑞, 巢志茂*, 于莉, 刘超
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立五味子中5-羟甲基糠醛(5-HMF)的高效液相色谱含量测定方法,对市售的五味子和醋五味子饮片进行5-HMF的含量测定,并对5-HMF含量与仓储时间、色泽的相关性进行分析。方法:采用HPLC-PDA法检测,ODS色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(5:95),检测波长284 nm,流速1 mL·min⁻¹,柱温30℃。结果:建立了五味子和醋五味子饮片中5-HMF的HPLC测定方法,五味子、醋五味子中5-HMF的质量分数分别在3.6~70.2,3 719.0~14 486.0 μg·g⁻¹。结论:醋五味子中5-HMF的含量明显高于五味子生品;随着仓储时间的延长,五味子的色泽加深,5-HMF的含量升高。

[关键词] 五味子; 5-羟甲基糠醛; 色泽; 仓储; 高效液相色谱法; 麦拉德反应

[中图分类号] R282.2;R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)15-0024-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150024

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160603.1146.036.html>

[网络出版时间] 2016-06-03 11:46

Correlation Between 5-Hydroxymethylfurfural Content in Schisandra Chinensis Fructus and Its Storage and Color

WU Cui, GAO Yue-ruì, CHAO Zhi-mao*, YU Li, LIU Chao

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for content determination of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) in Schisandra Chinensis Fructus (SCF), determine the content of 5-HMF in commercial SCF and Schisandra processed with vinegar (SPV) decoction pieces, and carry out the correlative analysis between 5-HMF content and its storage and color. **Method:** HPLC-PDA method was performed on ODS column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with methanol-water (5:95) as the mobile phase at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detective wavelength was set at 284 nm and the column temperature was maintained at 30℃. **Result:** The HPLC method for content determination of 5-HMF in SCF and SPV was established. The contents of 5-HMF in SCF and SPV were 3.6-70.2, 3 719.0-14 486.0 μg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The content of 5-HMF in SPV is significantly higher than that in SCF. With the extension of storage time of SCF, the color gradually deepens and the content of 5-HMF increases.

[Key words] Schisandra Chinensis Fructus; 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF); color; storage; HPLC; Maillard reaction

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 的干燥成熟果实。秋季果实成熟时采摘,

[收稿日期] 20151013(014)

[基金项目] 中医药行业科研专项(201407005)

[第一作者] 吴翠,在读硕士,从事中药质量的过程控制系统研究,Tel: 13671056773,E-mail:wucuidalian@163.com

[通讯作者] *巢志茂,研究员,博士生导师,从事中药质量的过程控制系统研究,Tel: 13522705161,E-mail:chaozhimao@163.com

晒干或蒸后晒干,除去果梗和杂质,即为临床使用的生五味子。采用醋蒸法蒸至黑色,则加工成醋五味子。五味子表面红色、紫红色或暗红色,皱缩,显油润,长于敛肺生津,主要用于咳喘、津亏^[1]。醋五味子表面乌黑,油润,稍有光泽,有醋香气,能增强酸涩收敛作用,涩精止泻作用比五味子更强,多用于遗精滑泄、久泻不止^[2]。木脂素类化合物是五味子降酶保肝的主要成分,醋蒸后五味子甲素、五味子乙素和五味子醇甲的含量相对生品均有不同程度的提高^[3]。多糖具有保肝、抗衰老、增强免疫等功效,五味子采用高压醋蒸后多糖含量也会升高^[4]。对五味子炮制前后挥发油变化的研究表明,五味子经醋蒸后,均会使其挥发油总量降低^[5]。醋制可提高有机酸的水煎出率^[6]。市售五味子主要是五味子和醋五味子。

5-羟甲基糠醛(5-HMF)是葡萄糖、果糖等单糖在高温或弱酸条件下脱水产生的醛类化合物。糖的热降解反应(蔗糖的焦化及还原糖的分解)和美拉德反应都会产生 5-HMF,并可用其来指示反应进行的程度^[7]。5-HMF 有一定程度的毒副作用,对眼、黏膜、皮肤有刺激性,过量食用会引起中毒,造成动物横纹肌麻痹和内脏损害^[8-13]。也有文献认为,适量的 5-HMF 具有一定的药效,有研究发现生脉散具抗心肌缺血作用,而 5-HMF 是生脉散抗心肌缺血的物质基础之一^[14]。乌梅中所含的蔗糖经加工炮制后可生成 5-HMF,具有 Ca²⁺ 拮抗活性;同时,乌梅具有抗过敏作用,其抗过敏机制可能是非特异性刺激产生的游离抗体中和侵入体内的过敏原的结果,有人认为该作用机制可能与其中所含的 5-HMF 有关^[15]。

已有研究认为,五味子鲜果果肉在加热烘干过程中,会产生一定量的 5-HMF^[16]。五味子在炮制过程中,随着加热时间的延长及温度的升高,5-HMF 的含量明显增加^[17]。但是,对于市售的五味子与醋五味子的饮片,以及与仓储时间、色泽变化的相关性,尚未进行过 5-HMF 的含量测定,也没有对其含量的高低进行过相关因素的研究和讨论。因此,本文建立了五味子饮片中 5-HMF 的高效液相色谱测定方法,并进行与仓储时间、色泽加深等因素的分析和评价,以期对五味子和醋五味子的饮片进行深入的质量控制。

1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪(DGU-20A₅ 型自动脱气机,LC-20AT 型泵,SPD-M20A 型二极管阵列

检测器,SIL-20A 型自动进样器,CTD-10AS 柱温箱,LC-Solution 色谱工作站,日本岛津公司),KQ-100E 型超声波清洗器(100 W,40 kHz,昆山市超声仪器有限公司),DHG-9063A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),CP224C 型电子天平[奥豪斯(上海)仪器有限公司],XS105 DualRange 型分析天平(Mettler Toledo),SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),FW100 型高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),MJX-150B 型恒温恒湿箱(天津泰斯特仪器有限公司)。

5-HMF 对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 BCBF6127V,纯度 ≥ 99%)。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。醋五味子饮片购自北京的中药房,五味子饮片购自河北安国药材市场,经中国中医科学院中药研究所巢志茂研究员鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 的干燥成熟果实,见表 1。

表 1 市售生五味子和醋五味子中 5-HMF 的质量分数
Table 1 Content of 5-HMF in commercially available *Schisandra Chinensis Fructus* and vinegar proceed *Schisandra Chinensis Fructus*

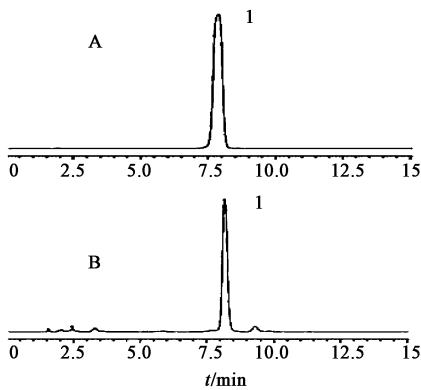
No.	饮片名	采购地	外观色泽	仓储时间/年	5-HMF /mg·g ⁻¹
1	醋五味子	北京同仁堂	黑色	3	14.49
2	醋五味子	北京利君堂	黑色	1	13.55
3	醋五味子	保兴大药房	黑色	1	12.07
4	醋五味子	白塔寺药店	黑色	1	11.70
5	醋五味子	北京永安堂	黑色	1	8.506
6	醋五味子	爱心大药房	黑色	1	3.719
7	五味子,陈货	河北安国	红褐色	2	0.003 6
8	五味子,陈货	河北安国	红褐色	2	0.054 3
9	五味子,陈货	河北安国	暗红色	2	0.070 2
10	五味子,陈货	河北安国	暗红色	2	0.062 0
11	五味子	河北安国	红色	1	0.035 9
12	五味子	河北安国	红色	1	0.015 3
13	五味子	河北安国	红色	1	0.015 1
14	五味子	河北安国	红色	1	0.012 7

注:全部 14 份饮片,均产自辽宁。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(5:95),检测波长 284 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL。5-HMF 对照品和五味子样品 HPLC 色谱见图 1。

2.2 对照品储备溶液的制备 精密称取 5-HMF 对



1. 5-HMF; A. 对照品; B. 供试品

图 1 五味子 HPLC

Fig. 1 HPLC of Schisandra Chinensis Fructus

照品 19.75 mg, 加甲醇定容至 50 mL, 制成 0.395 0 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取五味子样品, 粉碎, 醋五味子取粉末 0.5 g, 五味子取粉末 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声 30 min, 放至室温, 再称定质量, 50% 甲醇补足失重, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密吸取 5-HMF 对照品溶液, 配制成 0.000 039 5, 0.000 395, 0.003 95, 0.039 5, 0.079, 0.158, 0.237, 0.316 g·L⁻¹ 的系列溶液, 依次分别进样 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件测定峰面积, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 进样量 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得线性方程为 $Y = 7\,291\,697X + 64\,809$ ($r = 0.999\,9$), 进样量在 0.000 395 ~ 3.16 g 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取 5-HMF 对照品溶液 (0.237 0 g·L⁻¹) 10 μL, 连续进样 6 次, 测定 5-HMF 峰面积, 结果峰面积 RSD 为 0.2%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (1 号样品), 室温放置, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 测定 5-HMF 峰面积, 结果峰面积 RSD 为 0.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一供试品 (1 号样品) 粉末 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别进样测定。测得 5-HMF 平均质量分数为 14.729 mg·g⁻¹, 结果质量分数 RSD 为 1.7% ($n = 6$), 保留时间 RSD 为 0.3% ($n = 6$), 表明本试验方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取同一供试品 (6 号

样品) 粉末 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 分别精密加入 5-HMF 对照品溶液 5 mL, 按供试品溶液制备方法处理并测定 5-HMF 含量, 测得平均加样回收率为 99.55%, RSD 为 1.0%, 结果见表 2。

表 2 五味子中 5-HMF 加样回收率

Table 2 Recovery test of 5-HMF in Schisandra Chinensis Fructus

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.258 9	0.962 8	1.897	99.67		
0.251 2	0.934 1	1.862	98.99		
0.252 3	0.938 2	1.870	99.34	99.54	1.0
0.252 3	0.938 2	1.875	99.89		
0.249 8	0.928 9	1.879	101.30		
0.252 9	0.940 4	1.862	98.29		

注: 加入量均为 0.937 5 mg。

2.9 检测限及定量限 按照 2.1 项下色谱条件, 将 5-HMF 对照品溶液逐级稀释并测定, 确定检测限 (S/N = 3) 为 1.185×10^{-4} ng, 定量限 (S/N = 10) 为 3.95×10^{-4} ng。

2.10 样品含量测定 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 将峰面积代入 5-HMF 的回归方程中, 计算出 5-HMF 的含量, 结果见表 1。

3 讨论

在建立 HPLC 分析方法方面, 提取方式不采用加热回流提取法, 而采用超声提取法, 对提取溶剂、提取时间、流动相等也进行了条件的优化, 以更适应五味子中 5-HMF 的测定^[18-19]。

对五味子来说, 5-HMF 的质量分数从 0.003 6 ~ 0.070 2 mg·g⁻¹, 平均质量分数为 0.033 6 mg·g⁻¹, 最高值是最低值质量分数的 19.5 倍。对醋五味子来说, 5-HMF 的质量分数从 3.719 ~ 14.49 mg·g⁻¹, 平均质量分数为 10.67 mg·g⁻¹, 最高值是最低值质量分数的 3.90 倍。一方面, 说明五味子在醋制过程中引起了 5-HMF 的大量生成, 与美拉德反应的产生有关; 另一方面, 说明五味子和醋五味子的质量均存在一定程度的不确定性。

全部 6 份醋五味子, 溯源产地均是辽宁, 都按照《北京市中药饮片炮制规范》进行炮制, 但是 5-HMF 的含量出现明显的不等。究其原因, 有可能与原料、炮制的参数有关。这种现象, 与瓜蒌饮片中 5-HMF 含量不等的现象一致, 与生产厂家的因素很有关系^[20]。

就色泽来说,除了红褐色的 7,8 号样品外,由红色,暗红色,到黑色,5-HMF 的含量由低到高,呈现明显的相关性。随着色泽的加深,5-HMF 的含量显著升高。该现象与瓜蒌、山萸肉、牛膝饮片的现象一致,说明外观的判断与内在的质量存在明显的相关性^[20-22]。

就仓储时间来说,3 年仓储的 1 号样品,比 1,2 年的样品中的含量都要高。2 年仓储的五味子,除了样品 7 外,均比 1 年的五味子中的含量要高。随着仓储时间的延长,引起 5-HMF 含量升高的现象,与山萸肉的现象一致^[21]。仓储时间的延长,不仅加深了感官的色泽,同时引起 5-HMF 含量的升高,说明五味子的仓储时间不宜过长,应尽量采用当年的新货。该结论与仓储 1 年后引起五味子品质下降的观点^[23]一致。

[参考文献]

[1] 孙毅,张晓利,程慎令. 五味子的炮制与应用研究[J]. 中国民族民间医药,2010,19(10):25.
[2] 陆兔林,马新飞,苏丹,等. 醋蒸五味子炮制工艺研究[J]. 中药材,2006,29(12):1283-1284.
[3] 白晶. 不同炮制工艺对五味子饮片中木质素类成分含量的影响[J]. 北京联合大学学报:自然科学版,2013,27(2):46-48.
[4] 黄玮. 五味子饮片炮制规范化研究[D]. 南京:南京中医药大学,2009.
[5] 韩红祥,郑培和,鲍成胜. 炮制对五味子挥发油成分的影响[J]. 特产研究,2011,4(4):33-36.
[6] 李丽,肖永庆,于定荣,等. 五味子醋制前后主要有效成分的变化规律[J]. 中国中药杂志,2012,37(23):3545-3548.
[7] 耿放,王喜军. 5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF)在中药复方中的研究现状及相关药效探讨[J]. 中药基础研究,2005,7(6):52-56.
[8] 王妙飞,张水华,郭新东,等. 高效液相色谱法测定酱油中的 5-羟甲基糠醛[J]. 现代食品科技,2008,24(2):188-190.
[9] 侯平然,刘佐才,方贞华. 转化糖浆中 5-羟甲基糠醛的形成[J]. 冷饮与速冻食品工业,2001,7(1):1-3.
[10] 王云凤,常春艳,葛宝坤,等. 饮料中棒曲霉素和 5-羟

甲基糠醛的液相色谱-质谱测定方法[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(5):841-842.

[11] Erika T, Moyano E, Santos F J, et al. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods [J]. J Chromatogr A, 2008, 1185(2):102-108.
[12] 陈娟,张雯,倪莉. 高效液相色谱法定量黄酒中的 5-羟甲基糠醛[J]. 酿酒科技,2009,177(3):106-108.
[13] 锥翠霞,孙国祥. 反相高效液相色谱法测定知柏地黄丸中 5-羟甲基糠醛含量[J]. 中南药学,2008,6(2):188-190.
[14] 夏云,李志明,朱丹妮,等. 化生脉散复方动态变化与药效关系的研究—生脉散复方化学研究(1)[J]. 中国中药杂志,1998,23(4):230-231.
[15] 许腊英,余鹏. 毛维伦,等. 中药乌梅的研究进展[J]. 湖北中医学院学报,2003,5(1):52-57.
[16] 李越,安开龙,李德坤,等. HPLC-UV 法测定五味子中 5-羟甲基糠醛[J]. 中成药,2015,37(1):141-144.
[17] 李英华,吕秀阳,朱晓慧. 炮制对北五味子中 5-羟甲基糠醛含量的影响[J]. 中国现代应用药学,2010,27(11):992-995.
[18] 侯平然,刘佐才,方贞华. 转化糖浆中 5-羟甲基糠醛的形成[J]. 冷饮与速冻食品工业,2001,7(1):1-3.
[19] Chen S L, Jin S Y, Chen C S. Relative reactivities of glucose and galactose in browning and pyruvaldehyde formation in sugar/glycine model systems [J]. Food Chem, 2005, 92(4):597-605.
[20] 孙文,巢志茂,王淳,等. HPLC 法对市售瓜蒌中 5-羟甲基糠醛的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):73-76.
[21] 于莉,吴晓毅,梁曜华,等. 山萸肉不同仓储时间与 5-羟甲基糠醛含量的相关性研究[J]. 中国中医药信息杂志,2015,22(6):95-98.
[22] 刘振丽,宋志前,王淳,等. 泛糖程度不同的牛膝中 5-羟甲基糠醛含量测定[J]. 中国中药杂志,2009,34(3):298-300.
[23] 孟祥才,颜丙鹏,杨国辉,等. 不同贮藏条件的五味子的有效成分含量变化的初步研究[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(1):25-27.

[责任编辑 顾雪竹]