

HPLC 对市售瓜蒌中 5-羟甲基糠醛的含量测定

孙文,巢志茂*,王淳,吴晓毅,谭志高
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

[摘要] 目的:建立常用中药瓜蒌中 5-羟甲基糠醛(5-HMF)的高效液相色谱(HPLC)测定方法。方法:采用 HPLC 法, ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),甲醇-水(15:85)为流动相,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 284 nm,柱温 30 ℃。结果:建立了瓜蒌饮片中 5-HMF 的 HPLC 测定方法,18 批市售瓜蒌样品中 5-HMF 的含量范围为 11.10~193.6 μg·g⁻¹。结论:各地的商品瓜蒌中 5-HMF 的含量差异较大,该方法可作为评价瓜蒌饮片质量的指标之一。

[关键词] 瓜蒌; 5-羟甲基糠醛; 高效液相色谱; 含量测定; 麦拉德反应

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0073-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1204.017.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 12:04

Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Commercial Trichosanthis Fructus by HPLC

SUN Wen, CHAO Zhi-mao*, WANG Chun, WU Xiao-yi, TAN Zhi-gao

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

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for content determination of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) in commercial Trichosanthis Fructus, a commonly used Chinese material medica. **Method:** The HPLC analysis was performed on an ODS column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) and the mobile phase consisted of methanol-water (15:85) at a flow rate of 0.8 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 Trichosanthis Fructus was established. 5-HMF was detected in 18 batches of commercial Trichosanthis Fructus, the content of which were in the range of 11.10-193.6 μg·g⁻¹. **Conclusion:** The content of 5-HMF in commercial

[收稿日期] 20120205(004)

[基金项目] 2011 年中医药行业科研专项(201107009)

[第一作者] 孙文,硕士研究生,从事中药化学和分析研究,Tel:010-64014411-2869

[通讯作者] *巢志茂,研究员,博士生导师,从事中药化学和分析研究,Tel:010-64014411-2869,E-mail:chaozhimao@yahoo.com.cn

[11] 陈凯,窦月,陈智,等. 板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解药药效作用及化学基础研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):275.

[12] 张慧晔,罗杰,黄亦南,等. HPLC 法同时测定复方板蓝根颗粒中的尿苷、腺苷和表告依春的含量[J]. 今日药学, 2011, 21(6):337.

[13] 肖珊珊,金郁,郭怀中,等. RP-HPLC 法测定板蓝根药材中核苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(1):48.

[14] 辛敏通,傅欣彤,陈有根,等. 快速液相色谱法同时

测定板蓝根颗粒中 4 种核苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8):1571.

[15] 张元杰,钱正明,陈肖家,等. HPLC 法同时测定补益中药中尿苷、腺嘌呤、鸟苷和腺苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1):33.

[16] 石燕红,谢志勇,吴迎春,等. RP-HPLC 测定板蓝根制剂中 R, S-告依春 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8):128.

[责任编辑 顾雪竹]

Trichosanthis Fructus is quite different. This method is suitable for the quality control of Trichosanthis Fructus.

[Key words] Trichosanthis Fructus; 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF); HPLC; content determination; Maillard reaction

葫芦科栝楼属植物栝楼的干燥成熟果实经压扁、切丝或切块后就构成了常用中药瓜蒌的饮片,具清热涤痰、宽胸散结、润燥滑肠之功效,主要用于肺热咳嗽、痰浊黄稠、胸痹心痛、结胸痞满、乳痈、肺痈、肠痈、大便秘结等症^[1]。根据我们对全国各地的实地调查,市场上的瓜蒌饮片大多是切丝品,也有极少量的是采用尚未成熟的栝楼果实切片后烘蒸而成^[2]。为了防止干燥的果实在压扁、切丝过程中出现破碎影响切丝品的外观,往往先把干燥的果实用热的水蒸气蒸数小时,待果实内外均变软后压扁和切丝,干燥后分装,作为饮片销售。

大多数的研究认为,5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural,5-HMF)是糖类成分与蛋白质或氨基酸在一定温度、湿度条件下,发生麦拉德(Maillard)反应而生成的主要产物之一^[3-4]。伴随着的主要现象是食品和中药材色泽由浅到深,从白色或淡黄色经黄色、深黄色、棕色、以至褐色^[5]。也就是说,经过加热处理,中药材的色泽逐渐加深,5-HMF的含量快速升高。5-HMF作为中药饮片加热炮制中一个重要的含量指标,已越来越受到人们的重视^[6]。我们的调查显示,市售商品瓜蒌同样存在色泽的变化,且人们已经从瓜蒌饮片中曾获得了5-HMF化合物^[7]。

为了判断瓜蒌饮片的质量,我们从全国各地有代表性的药店或饮片公司直接收集了一些商品瓜蒌,建立了瓜蒌中5-HMF的高效液相色谱(HPLC)测定技术,并对这些饮片进行了含量测定。

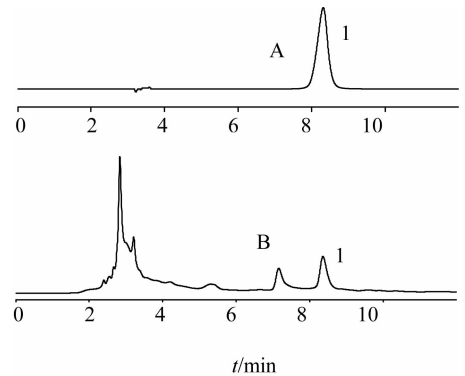
1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),KQ-100E 超声波清洗器(功率 100 W,昆山市超声仪器有限公司),1/10 万电子分析天平,北京 Sartorius 仪器系统有限公司),FW100 型高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

5-HMF 对照品(批号 BCBF6127V)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,纯度 $\geq 99\%$,供含量测定用;甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司),水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。瓜蒌饮片均为市售,购自当地中药材销售部门,经中国中医科学院中药研究所巢志茂研究员鉴定为栝楼的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 甲醇-水(15:85),检测波长 284 nm,柱温 30 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。对照品和瓜蒌样品分离的色谱图见图 1。



1. 5-羟甲基糠醛

图 1 对照品(A)、瓜蒌供试品(B)的 HPLC

2.2 对照品储备溶液的制备 精密称取 5-HMF 对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.103 0 mg 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取瓜蒌饮片,粉碎(过 40 目筛),取粉末 1 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 20 mL,密塞,称定质量,超声 20 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足失重,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,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 对照品储备溶液,配制成 0.5150,1.030,2.060,4.120,8.240,12.36 mg·L⁻¹的溶液,依次分别进样 10 μL,按上述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,得回归方程, Y = 10 192X + 1.486 6 (r = 0.999 9),5-HMF 进样量在 0.005 15 ~ 0.123 6 μg 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液(2.060 mg·L⁻¹)10 μL,连续进样 6 次,测定 5-HMF 峰面积值,其 RSD 0.18%,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,室温放置,分别在 0,2,4,8,12 h 进样分析,测定 5-HMF 峰面积值,其 RSD 0.51%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一供试品(No. 1 河

北安国药材市场)粉末6份,按上述供试品溶液的制备方法制备6份供试品溶液,分别进行测定,测得5-HMF平均含量为 $0.1936\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 0.64%,表明本试验方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取重复性项下的瓜蒌样品粉末6份,每份约0.5g,精密称定,分别精密加入5-HMF对照品储备液1mL,按供试品溶液处理并测定5-HMF含量,结果平均加样回收率为100.69%,RSD 0.83%,见表1。

2.9 检测限及定量限 在选定的色谱条件下,将5-HMF对照品储备溶液逐级稀释,最终确定检测限为 $6.85\times 10^{-3}\text{ ng}$ (S/N=3),定量限为 $2.06\times 10^{-2}\text{ ng}$ (S/N ≥ 10)。

表1 瓜蒌中5-HMF加样回收率

称样量 /g	样品中 含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
0.5040	97.59	103	200.85	100.25	100.69	0.83
0.5023	97.26	103	199.59	99.35		
0.5000	96.82	103	200.83	100.98		
0.5003	96.88	103	201.67	101.74		
0.5043	97.65	103	201.30	100.63		
0.5028	97.36	103	201.59	101.20		

2.10 样品含量测定 分别按2.3项方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,以峰面积代入回归方程中计算5-HMF的含量,结果见表2。

表2 各地瓜蒌饮片中5-HMF含量

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	购买地	果瓢色泽	5-HMF含量
1	河北安国药材市场	深褐色	193.6
2	北京华渺中药工程技术开发中心	褐色	139.2
3	山西平遥恒瑞药店	深棕色	67.39
4	山西太原长城药店	深棕色	47.75
5	山东肥城科达平民大药房	深棕色	45.94
6	甘肃兰州安泰堂中药饮片有限公司	深棕色	41.24
7	黑龙江大庆市某中药店	深棕色	40.80
8	宁夏银川某中药店	深棕色	39.89
9	吉林长春同仁堂药店	深棕色	36.58
10	黑龙江第一附院药房	棕色	29.65
11	陕西西安同仁堂药店	棕色	28.32
12	北京卫仁中药饮片厂	橙黄色	17.36
13	河北安国药材市场	橙黄色	17.22
14	河南安阳宏济国药馆	近白色	13.29
15	内蒙古呼伦贝尔宏远大药房	近白色	11.10
16	浙江平湖石龙村加工店	白色切片 ¹⁾	-
17	青海西宁某药店	虫蛀,无瓢 ²⁾	-
18	天津华丰大药房	虫蛀,无瓢 ³⁾	-

注:1)为尚未成熟的栝楼果实切片烘蒸而成^[2];2)青海西宁和天津来源的两份瓜蒌切丝品已遭受印度谷螟的深度危害,只剩下种子和少量的外皮,没有果瓢^[8];3)低于检测限。

3 讨论

3.1 提取方法的选择 考察了超声提取法与回流提取法,结果表明回流提取法含量略高于超声提取法,但由于加热回流提取是在80℃高温条件进行,可能导致或加速麦拉德反应的发生^[9],额外产生5-HMF,因此不采用水浴回流提取法。

3.2 提取溶剂和提取时间的选择 考察了甲醇(100%,80%,50%,30%)、乙醇(100%,80%,

50%,30%)的提取效果。结果表明,50%甲醇提取液5-HMF峰面积最大,且干扰较少;对超声时间(10,30,50min)进行了考察,结果表明超声30min提取时5-HMF的峰面积最大。故采用50%甲醇超声提取30min。

除了烘蒸片(No.16)和被虫蛀过的商品瓜蒌(No.17,18)没有检测到5-HMF外,其他瓜蒌饮片中均能检测到5-HMF,含量从11.10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 到

193.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 不等,差异较大。含量最高的来源于河北安国药材市场(No. 1)。进一步的溯源调查认为,北京华渺中药工程技术开发中心的瓜蒌饮片(No. 2)来源于河北安国药材市场。

栝楼干燥成熟果实中果瓢的色泽一般为橙黄色,而市售商品瓜蒌中果瓢的色泽均有不同程度的加深,且 5-HMF 的含量也有不同程度的升高,说明瓜蒌在加热蒸制过程中,其中含有的糖类化学成分^[10]有可能发生了 Maillard 反应。这种现象的发生和机制的产生,与何首乌^[4]、黄精^[11]在炮制过程中 5-HMF 含量升高的现象一致。而且,该现象与文献^[12]在安国购买的市售瓜蒌饮片中分离获得了 5-HMF,而文献^[10]在栝楼的干燥成熟果实中未获得该化合物的现象是一致的。另外,浙江平湖的烘蒸片(No. 16)系尚未成熟的果实经切片后烘蒸而成的,尽管也经受了加热烘蒸的过程,但并未测得 5-HMF,这可能是由于未成熟果实中糖分的含量过低,不足以产生 Maillard 反应。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:104.
[2] 巢志茂,何波. 瓜蒌的产地烘蒸加工[J]. 中药材, 1992,22(4):185.
[3] Brands C M J, Alink G M, Van Boekel M A J S, et al. Mutagenicity of heated sugar-casein systems; effect of the Maillard reaction[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48

(6):2271.
[4] Liu Z L, Chao Z M, Liu Y Y, et al. Maillard reaction involved in the steaming process of the root of *Polygonum multiflorum* [J]. Plant Med, 2009, 75 (1):84.
[5] Knerr T, Lerche H, Pischetsrieder M, et al. Formation of a novel colored product during the Maillard reaction of D-glucose [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49 (4):1966.
[6] 王超,王淳,李青,等. Maillard 反应在中药领域中的研究进展[J]. 中国药房,2011,22(11):1038.
[7] 范雪梅,陈刚,郭丽娜,等. 瓜蒌化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(11):871.
[8] 吴晓毅,巢志茂,田怡,等. 瓜蒌水分含量与印度谷螟为害的相关性研究[J]. 中国中医药信息杂志,2011, 18(10):58.
[9] 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.
[10] 巢志茂,何波. 栝楼果实的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,1999,24(10):612.
[11] 杨云,许闽,冯云霞,等. 黄精不同炮制品中 5-羟甲基糠醛的含量测定[J]. 中药材,2008,31(1):17.
[12] 范雪梅,陈刚,郭丽娜,等. 瓜蒌化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(11):871.

[责任编辑 顾雪竹]