

## 桑椹贮藏年份与其中 5-羟甲基糠醛含量的相关性分析

吴翠<sup>1,2</sup>, 徐靓<sup>1,2</sup>, 马玉翠<sup>1,2</sup>, 巢志茂<sup>1,2\*</sup>

1(中国中医科学院中药研究所, 北京, 100700) 2(国家中药材产业技术体系贮藏与包装岗位, 北京, 100700)

**摘 要** 该文探讨桑椹贮藏年份与 5-羟甲基糠醛(5-HMF)含量的相关性。收集贮藏了 1、2、3、5 年的桑椹样品, 日光下观察色泽, 烘干法测定水分, 高效液相色谱法(HPLC)测定 5-HMF 的含量。结果表明, 桑椹呈现紫黑色, 样品之间差异不明显, 水分含量为 6.35%~15.43%(质量分数)。贮藏 1 年和 2 年的共 4 批样品中 5-HMF 含量均低于检测限( $2.914 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ )或定量限( $9.925 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ )。贮藏 3 年的 9 批样品中 5-HMF 含量较高, 含量为 3.18~23.64  $\mu\text{g/g}$ 。贮藏 5 年的 2 批样品中 5-HMF 含量最高, 分别为 74.60  $\mu\text{g/g}$  和 83.78  $\mu\text{g/g}$ 。桑椹的色泽不能反映贮藏的年份, 水分含量与色泽、贮藏年份无关, 但 5-HMF 含量随着贮藏年份的延长从无到有、从低到高, 呈现快速上升趋势, 具有显著的相关性。该研究为评价和判断桑椹贮藏年份提供基础研究数据。

**关键词** 桑椹; 桑; 贮藏年份; 5-羟甲基糠醛; 色泽; 深色药材

桑椹(Mori Fructus, MF), 别名桑葚, 为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥成熟果穗<sup>[1]</sup>, 在 2002 年被原卫生部列入《既是食品又是药品的物品名单》, 在食品和医疗方面均使用广泛<sup>[2-13]</sup>。

色泽是药材固有的性状, 对于评价药材质量具有重要价值。通常, 中药材可以通过色泽的观察进行新货或陈货的判断, 也就是说可以根据色泽判断出贮藏的年份, 一般来说, 随着贮藏时间的延长, 药材色泽会出现加深的现象<sup>[14-16]</sup>, 5-羟甲基糠醛(5-HMF)的含量也显著升高。5-HMF 主要来源于焦糖化反应和 Maillard 反应。前者的反应需要在 140~170℃ 的高温下发生, 而后的反应在常温下即可发生。中药材在贮藏环节, 通常是不接触较高的温度的, 因此其中 5-HMF 应该主要来源于 Maillard 反应。同时, 在中药材较长时间的贮藏过程中, 随着 Maillard 反应的持续发生, 不断累积了 5-HMF, 因此导致中药材中 5-HMF 的含量随着贮藏时间的延长而逐渐升高。但是, 桑椹在干燥后即呈现紫黑色的外观, 人们很难通过色泽判断贮藏了多长时间, 导致桑椹在药材市场中经常出现新货和陈货混杂的现象。而对于桑椹来说, 传统观点认为新货的疗效较好, 陈货的质量欠佳。目前, 尚未见人们对桑椹新货与陈货之间进行过色泽、化学成分进行比较的文献报道。为此, 参照山萸肉、五味子色

泽与 5-HMF 具有显著相关性的文献报道, 我们首次对桑椹进行了 5-HMF 含量的测定, 并指出了贮藏年份与其中 5-HMF 含量的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

桑椹样品于 2017 年 12 月收集于药材市场、各地的药店, 其中 4 号样品采收于北京西山, 收集的样品封装在自封袋内, 放置于温度为 ( $16 \pm 0.5$ )℃, 湿度为 ( $40 \pm 5$ )% RH 的恒温恒湿箱中, 经某研究员鉴定为桑 *Morus alba* L. 的干燥成熟果穗, 详见表 1, 于 2018 年 3 月取出, 粉碎, 粉末封装于自封袋, 放置于常温条件的实验室中, 于 1 个月内完成全部实验工作, 未作特殊保存; 5-HMF 对照品(纯度  $\geq 99.09\%$ ), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 娃哈哈纯净水(电导率为 2.22  $\mu\text{S/cm}$ ), 杭州娃哈哈集团有限公司; 甲醇、乙腈(色谱纯), 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.2 仪器与设备

Shimadzu LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司, 配有 SIL-20A 型自动进样器, DGU-20A<sub>5</sub> 型自动脱气机, LC-20AT 型泵, SPD-M20A 型二极管阵列检测器, CTD-10ASvp 柱温箱, LC-solution 色谱工作站; NH310 型三恩驰便携式色差仪, 三恩驰科技有限公司; Ohaus CP224C 型电子天平(精度 0.1 mg), 奥豪斯(上海)仪器有限公司; XS105 Dual Range 型电子分析天平(精度 0.01 mg), Mettler Toledo 仪器系统有限公司; KC-02 高速粉碎机, 北京开创同和科技发展有

第一作者: 博士研究生(巢志茂研究员为通讯作者, E-mail: cha-zhimao@163.com)。

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-21)

收稿日期: 2019-04-30, 改回日期: 2019-06-01

限公司;KQ-100E 超声波清洗器(100 W,40 kHz),昆山市超声仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 色泽观察

取各样品约 50 g 于高速粉碎机中,25 000 r/min 粉碎约 40 s,过四号筛,取适量样品粉末置于白纸上,在日光下观察色泽。

#### 1.3.2 水分测定

取“1.3.1”项下粉末约 2.0 g,精密称定,按 2015 版《中国药典》第四部通则 0832 项下第二法,即烘干法测定水分。

#### 1.3.3 5-HMF 含量测定

##### 1.3.3.1 色谱条件

Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> (2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(体积比 5:95),流速 1 mL/min,检测波长设置为 284 nm,柱温 30℃,进样 10 μL。

##### 1.3.3.2 对照品储备溶液的制备

精密称取 5-HMF 对照品 19.85 mg,置于 50 mL 棕色量瓶中,加适量体积分数为 50% 的甲醇使溶解,并逐渐加至刻度,制成质量浓度为 0.397 mg/mL 的对照品储备溶液。

##### 1.3.3.3 供试品溶液的制备

取“1.3.1”项下粉末约 1.0 g,精密称定后置于 25 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,称重后超声 25 min(100 W,40 kHz),取出放冷至室温,用 50% 甲醇补足减失的重量,滤过,取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液即得。

##### 1.3.3.4 方法学考察

参考文献<sup>[17]</sup>方法对所建立的方法进行了方法学考察,主要包括,线性关系考察、精密度试验、稳定性试验、重复性试验、加样回收率试验并测定了检测限和定量限。用 50% 甲醇稀释对照品储备溶液,稀释成浓度分别为 0.116 6、0.291 4、1.457、1.985、2.914、3.97 μg/mL 的系列对照品溶液,分别进样 10 μL,按“1.3.3.1”项下的色谱条件测定 5-HMF 峰面积,得出线性方程。将浓度为 3.97 μg/mL 的 5-HMF 对照品溶液连续进样测定 6 次,每次均为 10 μL,测定 5-HMF 的峰面积,计算 RSD。将 18 号供试品溶液室温放置,在 0、2、4、8、12、24 h 分别进样测定 5-HMF 的峰面积,计算 RSD。取 6 份 18 号样品粉末,制备供试品溶液后,进样测定,计算平均含量和 RSD。取 6 份 18 号样品粉末,每份约 0.5 g 并精密称

定,精密加入浓度为 0.039 7 mg/mL 的 5-HMF 对照品溶液 1.0 mL,制备供试品溶液后,进样测定,计算平均加样回收率和 RSD。将对照品储备溶液逐级稀释,分别进样测定,最终确定检测限( $S/N=3$ )和定量限( $S/N=10$ )。

##### 1.3.3.5 样品含量测定

按“1.3.3.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.3.3.1”项下色谱条件测定,采用外标一点法计算干品中含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 色泽和水分分析

色泽和水分测定结果见表 1。

表 1 桑椹样品信息、色泽、水分和 5-HMF 的含量  
Table 1 Samples information, color, and water and 5-HMF contents of MF

编号	来源	产地	贮藏年份/年	色泽	水分/%	5-HMF 含量/ (μg · g <sup>-1</sup> )
1	大连药房	未知	1	紫黑	6.35	-
2	安国药材市场	山东	1	紫黑	12.27	-
3	北京同仁堂	河北	2	紫黑	12.62	1.193 *
4	北京西山	北京	1	紫黑	10.28	1.641 *
5	博古林中医馆	山东	3	紫黑	15.43	3.180
6	安国药材市场	新疆	3	紫黑	13.34	4.276
7	四川绵阳好医生鑫达药店	未知	未知	紫黑	14.43	5.439
8	安徽国盛大药房	安徽	3	紫黑	13.55	8.481
9	安国药材市场	河北	未知	紫黑	12.77	8.828
10	济南裕申堂	山东	3	紫黑	13.80	9.376
11	山东同心堂药店	山东	3	紫黑	13.11	12.02
12	安国药材市场	新疆	3	紫黑	12.19	13.37
13	南宁康全药业	未知	未知	紫黑	8.23	13.50
14	安国药材市场	新疆	3	紫黑	13.27	13.72
15	江苏春天药房	未知	3	紫黑	8.42	14.36
16	北京永安堂大药房	山西	3	紫黑	14.26	23.64
17	安国药材市场	山东	5	紫黑	11.07	74.60
18	安国药材市场	山东	5	紫黑	13.92	83.78

注:“-”表示低于检测限( $2.914 \times 10^{-4}$  μg);\* 表示低于定量限( $9.925 \times 10^{-4}$  μg)。

表 1 的结果显示,全部 18 个桑椹样品的色泽均较深,呈紫黑色,不同样品之间的色泽相似,很难通过肉眼判断出样品之间的差异。由表 1 可知,各样品的水分含量变化较大,水分与色泽之间的相关性不明显。其中,1 号样品的水分含量的质量分数为 6.35%,为所有样品中最低;5 号样品水分含量的质量分数为 15.43%,为水分含量最高的样品,超过了《中国药典》中“水分不得过 15%”的规定。各样品水分含量差异明显,可能原因:(1)干燥的方式和干燥后的水分含量有出入;(2)我们购置前该商品的贮藏环境中

湿度的不同。

2.2 5-HMF 含量分析

对照品与供试品的 HPLC 图见图 1。由图 1 可知,供试品色谱图中,在与对照品色谱图相应的保留时间处显示色谱峰,且该色谱峰峰型独立,说明该色谱条件下能够有效检测出供试品中的 5-HMF。

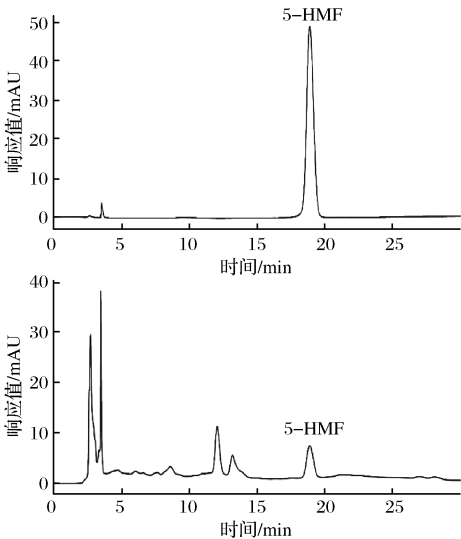


图 1 对照品及桑椹供试品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of 5-HMF and MF

通过方法学考察,计算测定方法的线性方程为  $Y = 8\,234\,771X - 1\,528$  ( $r^2 = 0.999\,2$ ),其中横坐标为进样量(g),纵坐标为峰面积(mAU),表明进样量在  $0.001\,166 \sim 0.039\,7\,\mu\text{g}$  与峰面积呈良好的线性关系。精密度试验、稳定性试验的 RSD 分别为 0.78% 和 0.82%。重复性试验结果显示,18 号供试品溶液的 5-HMF 的平均含量为  $0.084\,23\,\text{mg/g}$ ,RSD 为 1.85%。加样回收率试验结果见表 2,由表可知,平均回收率为 98.92%,RSD 为 0.74%。检测限 ( $S/N = 3$ ) 和定量限 ( $S/N = 10$ ) 分别为  $2.914 \times 10^{-4}\,\mu\text{g}$  和  $9.925 \times 10^{-4}\,\mu\text{g}$ 。以上结果均显示,所建立的用于测定 5-HMF 含量的方法准确可行。

表 2 5-HMF 的加样回收率试验结果

Table 2 Recovery results of 5-HMF in MF

称样量/g	样品中含量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.502 2	36.41	39.70	76.01	99.75	98.92	0.74
0.500 6	36.29	39.70	75.44	98.62		
0.501 6	36.37	39.70	75.79	99.28		
0.501 8	36.38	39.70	75.90	99.55		
0.500 3	36.27	39.70	75.11	97.83		
0.501 4	36.35	39.70	75.45	98.49		

各样品含量测定结果见表 1。由表 1 可知,各样

品中 5-HMF 的含量差异很大。在可以明确贮藏年份的样品中,1~4 号样品为贮藏 1 年或 2 年的桑椹,含量低于检测限( $2.914 \times 10^{-4}\,\mu\text{g}$ )和定量限( $9.925 \times 10^{-4}\,\mu\text{g}$ )。贮藏了 3 年的样品,其中 5-HMF 的含量则相对较高,达到了  $3.180 \sim 23.64\,\mu\text{g/g}$ 。贮藏 5 年的 2 个样品,5-HMF 高达  $74.60$  和  $83.78\,\mu\text{g/g}$ 。该结果说明,随着贮藏年份的延长,桑椹中 5-HMF 的含量变化为从无到有,从少到多,与贮藏年份具有显著的相关性。这种随着贮藏时间的延长,5-HMF 含量逐渐升高的现象与龙眼肉<sup>[13]</sup>、牛膝<sup>[14]</sup>等药材一致。

5-HMF 是葡萄糖、果糖等单糖发生 Maillard 反应生成的一种醛类小分子化合物<sup>[18]</sup>,对  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起的人体肝细胞损伤具有保护作用( $0.79\,\mu\text{mol/L}$ )<sup>[19]</sup>,可抑制 A375 肿瘤细胞的增殖( $4.8\,\text{mmol/L}$ )<sup>[20]</sup>,但是高剂量的 5-HMF ( $>75\,\text{mg/kg}$ ) 对人眼部、上呼吸道、皮肤和黏膜具有刺激性<sup>[21]</sup>等毒性作用。目前关于 5-HMF 的药理活性存在争议,且 5-HMF 广泛存在于烘焙、加热的食品中,对于人体的副作用也存在争议<sup>[22]</sup>。2015 版《中国药典》对甲硝唑、己酮可可碱等葡萄糖注射液中的 5-HMF 的含量进行了不得高于葡萄糖标示量 0.02% 的规定。就桑椹来说,测定的最高含量为 0.008%,低于 0.02%。由于桑椹属于药食同源药材,摄入过多也许会对人体产生潜在的副作用,但是具体的摄入量还有待进一步研究。

Maillard 反应在常温下即可发生,说明在桑椹的贮藏环节,发生了 Maillard 反应,生成了 5-HMF,造成了随着贮藏年限的延长,桑椹中 5-HMF 含量显著的升高现象。该现象提示我们应该控制桑椹贮藏的年限,尽量采用新货而不使用陈货。陈货中较高的 5-HMF 含量可以作为新货与陈货的判别依据。

3 结论

牛膝、山萸肉等药材的色泽本身比较浅,随着贮藏年份的延长引起了色泽的加深,人眼可以观察到色泽的明显变化,贮藏年份与色泽、5-HMF 含量之间均具有显著的相关性。而对于色泽本身就很深的桑椹来说,人眼未能观察到贮藏年份与色泽变化的相关性,但是通过测定 5-HMF 的含量可以说明其与贮藏年份具有显著的相关性,表明由于发生 Maillard 反应致使 5-HMF 含量的升高已不足以导致色泽的进一步加深了。这种首次发现,对于色泽很深的一类中药材具有示范性的研究价值。通过 5-HMF 含量的测定进而推测桑椹的贮藏年份,对于制定桑椹的质量标准、

指导桑椹的贮藏具有重要的意义。

## 参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:300.
- [2] 钮成拓,李正学,范林旭,等. 桑葚果酒发酵过程中功能性物质的检测及其变化情况[J]. 食品与发酵工业, 2019,45(3):83-88.
- [3] 崔素芬,廖芬,何全光,等. 采用离心喷雾干燥技术制备桑葚果粉[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(11):73-78.
- [4] 邓娜娜,马永昆,张龙,等. 不同杀菌处理桑椹果醋香气质量的主成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(4):172-177.
- [5] 李春英. 更年期综合征的中医治疗[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 10(8):57-62.
- [6] 郎海燕,陈信义,杨文华. 缺铁性贫血中医药防治康复一体化专家共识[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8):3487-3492.
- [7] 胡佑志. 桑葚芝麻蜂蜜膏治少白头[J]. 蜜蜂杂志, 2018, 38(12):38.
- [8] 孔凡刚,张丽,巩丽丽,等. DPPH法测定桑椹不同极性部位的抗氧化活性[J]. 山东中医杂志, 2015, 34(11):865-868.
- [9] 朱翠玲,陈铭,汪孟涵,等. 桑葚提取物体外抗炎作用及机制的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(4):61-66.
- [10] 尹爱武,田润,邓胜国,等. 桑椹多糖对急性酒精中毒小鼠的护肝作用[J]. 现代食品科技, 2016, 32(12):13-19.
- [11] 杨美莲,樊志峰,蔡圣宝,等. 桑葚花色苷提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2019, 28(1):9-15.
- [12] 陈诚,王柳萍,辛华. 桑椹的质量分析方法研究[J]. 广西中医药, 2016, 39(5):396-399.
- [13] 刘洋,周玉,肖会敏,等. HPLC法测定桑椹颗粒中绿原酸的含量[J]. 中医药导报, 2017, 23(1):63-65.
- [14] 吴翠,马玉翠,巢志茂. 龙眼肉理化指标与两类贮藏库温度积的动态分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(8):1158-1161.
- [15] 吴翠,马玉翠,晋文慧,等. 简易库和冷藏库贮藏中牛膝理化指标的月动态变化研究[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(24):2151-2156.
- [16] 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.
- [17] 吴翠,高岳瑞,巢志茂,等. 五味子中5-羟甲基糠醛含量与仓储和色泽的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15):24-27.
- [18] 王超,王淳,李青,等. Maillard反应在中药领域的研究进展[J]. 中国药房, 2011, 22(11):1038-1040.
- [19] WANG M Y, ZHAO F M, PENG H Y, et al. Investigation on the morphological protective effect of 5-hydroxymethylfurfural extracted from wine-processed fructus corni on human L02 hepatocytes [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130(2):424-428.
- [20] 梅国栋,赵玲,陈建平,等. 5-HMF抑制A375细胞增殖的信号转导通路[J]. 中国科技论文, 2014, 9(9):1005-1008.
- [21] ULBRICHT R J, NORTHUP S J, THOMAS J A. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions [J]. Fundamental and Applied Toxicology, 1984, 4(5):843-853.
- [22] HARDT-STREMYR M, MATTIOLI S, GREILBERGER J, et al. Determination of metabolites of 5-hydroxymethylfurfural in human urine after oral application [J]. Journal of Separation Science, 2013, 36(4):670-676.

## Correlation between storing-year and 5-hydroxymethylfurfural content in mori fructus

WU Cui<sup>1,2</sup>, XU Liang<sup>1,2</sup>, MA Yucui<sup>1,2</sup>, CHAO Zhimao<sup>1,2\*</sup>

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

2(Storage & Packaging Position, Chinese Materia Medica, China Agriculture Research System, Beijing 100700, China)

**ABSTRACT** This study aims at exploring the correlation between storing-year of Mori Fructus (MF) and its 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) content. MF samples stored respectively for 1, 2, 3 and 5 years were collected to observe their color under sunlight, measure their water content by oven-drying method and determine their 5-HMF content by HPLC method. Results showed that the color of MF was purple in black with no obvious variation between samples, that the mass fraction of water content ranged from 6.35% to 15.43%. Among all samples of which the storing year could be clearly defined, the 5-HMF contents in a total 4 batches of MF samples stored for 1 or 2 years were below the limit of detection ( $2.914 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ ) or limit of quantitation ( $9.925 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ ), the 5-HMF contents of 9 batches of MF samples stored for 3 years were higher, ranging from 3.180  $\mu\text{g/g}$  to 23.64  $\mu\text{g/g}$ ; while the 5-HMF contents of 2 batches of MF samples stored for 5 years were the highest, respectively 74.60  $\mu\text{g/g}$  and 83.78  $\mu\text{g/g}$ . The color of MF cannot indicate the storing year, and the water content was irrelevant to the color or the storing-year of MF; However, the 5-HMF content showed a sharp increase from zero, with significant correlation with storing-year. As the first study on the correlation between storing-year and chemical components of dark-colored Chinese medicinal materials, this study has provided basic research data for the evaluation and determination of storing-year.

**Key words** Mori Fructus; *Morus alba*; storing-year; 5-hydroxymethylfurfural; color; Chinese medicinal materials with dark color