

苍术麸炒过程中 5-羟甲基糠醛的转化机制研究

刘苗苗¹, 陈祥胜^{1,2}, 陈琪瑶¹, 刘艳菊^{1,2*}, 付伟¹, 许安安¹, 容艳芬¹

1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065

2. 湖北省中药炮制工程技术研究中心, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 研究苍术麸炒后 5-羟甲基糠醛(5-HMF)量的增加机制。方法 在模拟苍术麸炒工艺条件下, 对果糖和葡萄糖分别加热处理, 采用 HPLC 法测定果糖和葡萄糖转化为 5-HMF 的量; 并对麸炒前后苍术中的果糖进行定量测定, 比较其量变化。结果 在模拟条件下葡萄糖中未能检测到 5-HMF, 而果糖在相同条件下则能检测到 5-HMF, 且在最佳麸炒工艺下果糖的量明显降低, 5-HMF 的量增加最多。结论 苍术麸炒后 5-HMF 的量显著增加的主要原因是麸炒过程中果糖的转化。关键词: 苍术; 麸炒; 5-羟甲基糠醛; 转化机制; 果糖; 葡萄糖

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)08-1327-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.013

Conversion mechanism of 5-hydroxymethylfurfural in process of bran-fried *Atractylodes lancea*

LIU Miao-miao¹, CHEN Xiang-sheng^{1,2}, CHEN Qi-yao¹, LIU Yan-ju^{1,2}, FU Wei¹, XU An-an¹, RONG Yan-fen¹

1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Hubei Province, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To study the mechanism of the content of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) increasing after *Atractylodes lancea* in bran-processed. **Methods** The fructose and glucose were processed with *A. lancea* bran-processed conditions and their contents were determined by HPLC. Besides, the content of fructose was measured and the changes were compared before and after processing. **Results** Glucose samples did not detect 5-HMF in the processing conditions, but fructose samples detected 5-HMF in the same conditions. In addition, the content of fructose was significantly decreased in the best conditions while the content of 5-HMF increased the most. **Conclusion** The content of 5-HMF remarkably increases mainly due to the conversion of fructose.

Key words: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; bran-frying; 5-hydroxymethylfurfural; conversion mechanism; fructose; glucose

苍术为菊科苍术属植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 或北苍术 *Atractylodes chinensis* Koidz. 的干燥根茎^[1]。生苍术温燥而辛烈, 麸炒可缓和苍术燥性, 增强健脾和胃的作用^[2-3]。本课题组前期在对苍术麸炒炮制机制研究中发现^[4-5], 苍术麸炒后比相应生品 5-羟甲基糠醛(5-HMF)的量均增加 10 倍以上, 生苍术中 5-HMF 的量为 12.9~32.2 μg/g, 而麸炒苍术的量均大于 0.150 mg/g, 两者的量差距大, 且无交叉重叠, 该结果对生苍术、麸炒苍术具指示性鉴别意义。文献研究表明^[6-8], 果糖和葡萄糖在干热条件下, 可以发生反应转化为

5-HMF, 而苍术含有大量果糖和葡萄糖, 在麸炒工艺条件下能否转化为 5-HMF, 值得深入研究。为明确苍术麸炒过程中 5-HMF 量明显增加的机制, 本实验模拟了麸炒苍术炮制工艺, 对果糖及葡萄糖进行加热处理, 测定其 5-HMF 的量变化及其转化率, 并对 10 批苍术样品麸炒前后果糖的量变化进行验证, 最终确定 5-HMF 量增加的机制。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 电热套、坩埚, 天津市泰斯特仪器有限公司; 万分之一天平、十万分之一天平, 德国 Sartorius

收稿日期: 2015-12-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81541080, 81073051); 科技基础性专项(2014FY111100-2)

作者简介: 刘苗苗, 女, 硕士研究生。Tel: (027)68890231 E-mail: 614593522@qq.com

*通信作者 刘艳菊, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制研究。Tel: (027)68890231 E-mail: lyj1965954@sohu.com

公司; SK7200HP 型超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司; 0.45 μm 微孔滤膜, 50 mL 锥形瓶, 一次用注射器。

纯水、色谱纯乙腈, Tedia 公司; 果糖、葡萄糖, 化学纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 5-HMF 对照品 (批号 wkq-00766, 20 mg, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$), 四川省维克奇生物科技有点公司; 果糖对照品 (批号 PS151224-10, 20 mg, 质量分数 98.0%), 成都普思科技有点公司。苍术饮片经湖北中医药大学药学院陈科力教授鉴定为菊科苍术属植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的干燥根茎; 麸炒苍术按照《中国药典》2015 年版炒制方法自制。苍术样品来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 模拟苍术麸炒工艺条件对果糖和葡萄糖转化为 5-HMF 的影响

2.1.1 色谱条件^[9] 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (95 : 5), 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 284 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。理论塔板数按 5-HMF 峰计

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

编号	产地	采集时间
S1	安徽六安	2012-11
S2	安徽六安	2012-12
S3	安徽六安	2013-01
S4	河南桐柏	2013-07
S5	湖北英山石正镇	2012-12
S6	湖北英山草盘地镇	2012-12
S7	湖北蕲春	2012-10
S8	湖北英山	2012-10
S9	江苏茅山	2013-08
S10	江苏茅山	2012-10

算不低于 3 000。色谱图见图 1。

2.1.2 样品制备 参照《中国药典》2015 年版苍术麸炒工艺, 电热套加热坩埚预热 5 min, 将果糖和葡萄糖分别取 0.1 g 按照表 2 分组放入预热好的坩埚中加热, 每组平行 3 次。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取 5-HMF 对照品 1.00 mg 配成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的水溶液。

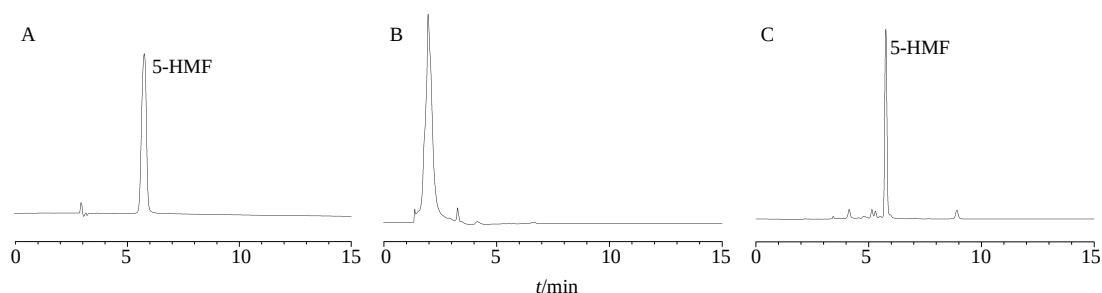


图 1 5-HMF 对照品 (A)、葡萄糖 8 号供试品 (B) 及果糖 8 号供试品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of 5-HMF reference substances (A), glucose No. 8 (B), and fructose No. 8 (C) samples

表 2 葡萄糖及果糖在不同工艺条件下转化为 5-HMF 的量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Contents of 5-HMF in various glucose and fructose samples under different processing conditions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	加热温度/ $^{\circ}\text{C}$	加热时间/ min	葡萄糖样品中 5-HMF/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	葡萄糖转 化率/%	果糖样品中 5-HMF/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	转化为 5-HMF 消耗的 果糖量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	果糖转 化率/%
1	120	2.0	—	—	0.887 ± 0.014	1.267	0.126 7
2	150	2.0	—	—	4.898 ± 0.047	6.997	0.699 7
3	180	2.0	—	—	1.774 ± 0.024	2.534	0.253 4
4	120	3.5	—	—	1.477 ± 0.020	2.110	0.211 0
5	150	3.5	—	—	30.338 ± 1.156	43.341	4.334 1
6	180	3.5	—	—	3.524 ± 0.098	5.034	0.503 4
7	120	5.0	—	—	11.218 ± 0.385	16.026	1.602 6
8	150	5.0	—	—	94.160 ± 3.490	134.516	13.451 6
9	180	5.0	—	—	20.494 ± 0.801	29.278	2.927 8

2.1.4 供试品溶液的制备 将“2.1.2”项样品自然冷却至室温，纯水溶解定容至 50 mL 量瓶中，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.5 线性关系考察 精密称取 5-HMF 对照品适量，按“2.1.3”项下方法配制成质量浓度分别为 100.0、50.0、20.0、10.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液，按“2.1.1”项色谱条件测定峰面积。以峰面积积分值为纵坐标 (Y)，进样质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线，得回归方程为 $Y=1.8623X-8.435$ ， $r=0.9999$ ，结果表明 5-HMF 在 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液 20 μL ，重复进样 6 次，测得 5-HMF 峰面积，RSD 值为 2.7%，表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 按“2.1.2”项 8 号样品制备方法将果糖制备成样品，并按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液 6 份，按“2.1.1”项下色谱条件操作，取 20 μL 依次进样，测定峰面积，计算 5-HMF 的质量分数。结果其 RSD 为 2.74%，表明本实验重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 精密吸取 8 号供试品溶液 20 μL ，分别在 2、4、6、8、12 h 进样测定，结果 RSD 为 1.02%，在 12 h 内稳定性良好。

2.1.9 加样回收率试验 取果糖 50 mg，精密称定，放入 180 $^{\circ}\text{C}$ 条件下坩埚中加热 5 min (组别 9)，自然冷却至室温，纯水溶解至 50 mL 量瓶中，加入质量浓度为 1.00 mg/mL 的对照品溶液 1 mL，定容，其余按“2.1.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1.1”项方法测定，计算得加样回收率分别为 100.30%、99.88%、100.25%、98.98%、99.40%、99.72%，平均加样回收率为 99.76%，RSD 为 0.51%，表明加样回收率较好。

2.1.10 定量测定^[9] 按“2.1.1”项色谱条件，测定葡萄糖、果糖在不同加热工艺条件下各组样品中 5-HMF 的量，计算其平均值及转化率。结果见表 2。

统计结果表明，葡萄糖样品在模拟苍术麸炒工艺条件下未能检测到 5-HMF，推测葡萄糖在此条件下未能发生可以转化为 5-HMF 的化学反应或转化量极低达不到仪器检测限；果糖在相同条件下，均能检测到不同质量分数的 5-HMF，提示果糖在此条件下可以转化为 5-HMF，且随着加热的温度和时间等因素的改变，其转化率各不相同^[10]。

2.2 苍术麸炒前后果糖的测定

2.2.1 色谱条件^[11] 以十八烷基硅烷键合硅胶为

填充剂，Kromasil C₁₈ 分离柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；以乙腈-水 (2:98) 为流动相；体积流量 0.6 mL/min；进样量 1 μL 。ELSD 不分流模式检测，漂移管温度 110 $^{\circ}\text{C}$ ，载气体积流量 3.1 L/min。色谱图见图 2。

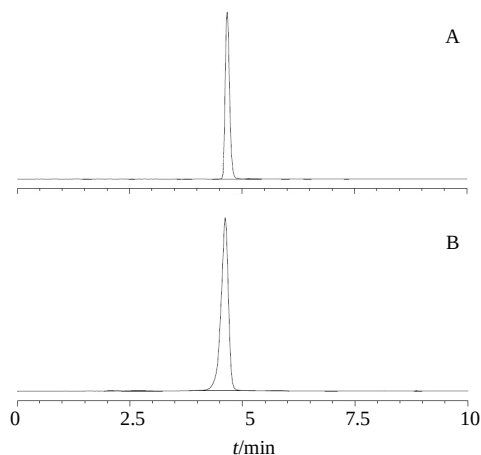


图 2 果糖对照品 (A) 及苍术饮片供试品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of fructose reference substance (A) and *A. lancea* samples (B)

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取果糖对照品 20 mg，溶于纯水中，定容至 5 mL 量瓶中制成 4 mg/mL 的溶液，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取 10 批生苍术饮片粉末及对应的麸炒苍术饮片 (麸炒苍术按照《中国药典》2015 年版炒制方法自制) 粉末各 1.00 g，精密称定，入锥形瓶中精密加纯水 20 mL，称定质量。超声处理 (功率 250 W，频率 40 kHz) 1 h，冷却，补足减失的质量，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.4 线性关系考察 精密称取果糖对照品适量，按“2.2.2”项下方法配制成质量浓度分别为 10.0、6.0、4.0、2.0、1.0 mg/mL 的溶液，按“2.2.1”项色谱条件测定峰面积。以峰面积积分值为纵坐标 (Y)，进样质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线得回归方程为 $Y=2365579.52X-2689934.1$ ， $r=0.9999$ ，结果表明果糖在 1~10 mg/mL 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 1 μL ，重复进样 6 次，测得果糖峰面积，其 RSD 值分别为 2.71%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 按“2.2.3”项下制备 S1 号生苍术供试品溶液 6 份，按“2.2.1”项下色谱条件操

作, 取 20 μL 依次进样进行峰面积的测定, 计算果糖质量分数。结果其 RSD 为 2.74%, 表明本实验重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取 S1 号生苍术供试品溶液 20 μL , 分别在 2、4、6、8、12 h 进样测定, 结果果糖峰面积的 RSD 为 1.02%, 在 12 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已测定的同一批生苍术饮片 (S6) 粉末 0.50 g, 精密称定, 加入锥形瓶中; 向锥形瓶中加入质量浓度为 2.00 mg/mL 的果糖对照品溶液 1 mL, 精密加纯水 19 mL 溶解, 其余按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项方法测定, 测得加样回收率分别为 99.07%、98.41%、99.01%、101.13%、98.41%、101.52%, 平均回收率为 99.59%, RSD 为 1.38%, 回收率符合要求。

2.2.9 定量测定 按“2.2.1”项色谱条件, 测定生苍术及麸炒苍术饮片中果糖的量, 计算果糖变化量。结果见表 3。

实验结果表明, 生苍术饮片含有大量果糖, 且在麸炒后果糖的量降低。从表 3 结果可知, 生苍术饮片在麸炒以后果糖的减少量均超过了 1.7 mg/g, 根据表 2 中在模拟苍术麸炒工艺条件下果糖的最大转化率 13.451 6% 可以计算出: 1 g 苍术饮片在麸炒以后经过果糖 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 转化得到的 5-HMF ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$) 的量至少为 0.016%, 这与前期研究中麸炒苍术饮片中 5-HMF 的量不少于 0.015% 一致^[12],

表 3 生苍术及麸炒苍术饮片中果糖的量及其变化量

Table 3 Content and changes of fructose in *A. lancea* and bran-processed *A. lancea* before and after processing

样品	生苍术中果糖/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	麸炒苍术中果糖/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	果糖减少量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
S1	88.3	86.1	2.2
S2	64.1	60.4	3.7
S3	94.4	92.7	1.7
S4	140.9	139.1	1.8
S5	79.4	77.7	1.7
S6	69.3	66.5	2.8
S7	91.6	89.2	2.4
S8	100.7	98.6	2.1
S9	89.3	87.4	1.9
S10	101.4	98.3	3.1

说明在炮制过程中消耗的果糖几乎 100% 转化为 5-HMF。

3 讨论

3.1 葡萄糖、果糖转化 5-HMF 机制

果糖为呋喃型结构, 较容易脱水缩合成 5-HMF。而葡萄糖具有稳定的吡喃型结构, 其中的氢键需在负离子的作用下发生质子转移, 使 α -葡萄糖旋光异构为 β -葡萄糖, 再生成烯醇式中间物, 从而导致葡萄糖异构化为果糖, 再由果糖脱水生成 5-HMF, 由此说明葡萄糖生成 5-HMF 的路径长、需要能量高, 相比果糖更为困难^[13-15]。本实验中葡萄糖样品经加热之后产物没有检测到 5-HMF, 可能是炮制工艺达不到葡萄糖转化 5-HMF 的条件或转化量极低达不到仪器检测限, 因此推断苍术在麸炒后 5-HMF 的量增加与葡萄糖转化关系不大, 主要由果糖转化而得。表 2 和表 3 结果表明, 果糖转化为 5-HMF 转化率最高的工艺条件与苍术麸炒工艺相吻合。

3.2 苍术中的其他成分对 5-HMF 的产生过程无明显的协同或拮抗作用

苍术含有大量果糖、葡萄糖以及少量还原糖和糖苷类物质, 都可能在实验条件下发生反应, 生成 5-HMF; 但是结合本实验结果: 葡萄糖样品在模拟苍术炮制工艺条件下未能检测到 5-HMF, 而果糖在相同条件下检测到 5-HMF, 且苍术炮制后 5-HMF 增加量与果糖减少而生成的 5-HMF 量十分吻合, 于是推测 5-HMF 量增加的主要原因是果糖的转化, 其他成分对 5-HMF 的产生无明显拮抗或协同作用。

3.3 麸炒工艺与果糖转化条件关系

《中国药典》2015 年版炒制方法中并未明确规定麸炒温度, 相关炮制通则对苍术的麸炒条件也仅提到使用中火加热, 中火温度范围为 170~190 $^{\circ}\text{C}$; 课题组前期的苍术麸炒工艺研究表明, 最佳投药温度为 150 $^{\circ}\text{C}$ ^[2,5], 与本实验模拟条件最佳温度一致。分析认为苍术中的果糖成分被包含在药材和麦麸之中, 炒制过程中其实际接触温度应该低于 170 $^{\circ}\text{C}$, 这与果糖 150 $^{\circ}\text{C}$ 时转化率最高相吻合。

3.4 麦麸所含果糖与 5-HMF 量变化关系

麦麸中也含有果糖, 但在苍术麸炒过程中温度达到 170~190 $^{\circ}\text{C}$, 在此温度下麦麸基本炭化, 其化学成分已被破坏^[16], 同时炒制过后麦麸被筛出, 因此认为麦麸所含果糖对 5-HMF 量增加没有贡献。

实验结果表明, 苍术所含果糖在麸炒过程中转

化为 5-HMF, 是麸炒过程中 5-HMF 产生的主要方式, 也是麸炒苍术中 5-HMF 量显著增加的主要原因。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- [3] 庞雪, 刘玉强, 刘小丹, 等. 麸炒苍术不同部位对大鼠脾虚的影响 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(7): 763-767.
- [4] 陈雯雯. 苍术麸炒前后氯仿和挥发油部位药效学及化学成分对比研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学药学院, 2013.
- [5] 刘艳菊, 许腊英, 李水清. 麸炒苍术炮制工艺研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(15): 1267-1269.
- [6] 张红伟, 张振凌. 中药炮制对 5-羟甲基糠醛成分的影响 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(15): 149-151.
- [7] Ajandouz E H, Tchiakpe L S, Ore F D, *et al.* Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems [J]. *J Food Sci*, 2006, 66(7): 926-931.
- [8] 吴惠玲, 王志强, 韩春, 等. 影响美拉德反应的几种因素研究 [J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 441-444.
- [9] 鲜洁晨, 张宁, 冯怡, 等. 中药蜜丸炼蜜过程中果糖、葡萄糖、5-羟甲基糠醛的热稳定性研究 [J]. 中药材, 2011, 34(9): 1434-1437.
- [10] 曾林燕, 宋志前, 魏征, 等. 黄精炮制过程中新产生成分分离及含量变化 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1584-1588.
- [11] 李先端, 钟银燕, 顾雪竹, 等. 中药炮制辅料蜂蜜中葡萄糖、果糖、蔗糖的含量测定 [J]. 中成药, 2008, 30(6): 885-888.
- [12] 季光琼, 刘艳菊, 王萍, 等. HPLC 法测定苍术及麸炒苍术中 5-羟甲基糠醛的含量 [J]. 湖北中医杂志, 2014, 36(2): 73-74.
- [13] Li C Z, Zhang Z H, Zhao Z B K. Direct conversion of glucose and cellulose to 5-hydroxymethyl furfural in ionic liquid under microwave irradiation [J]. *Tetrahedron Lett*, 2009, 50(38): 5403-5405.
- [14] Cheriot S, Billaud C, Pöchltrager S, *et al.* A comparison study between antioxidant and mutagenic properties of cysteine glucose-derived Maillard reaction products and neoformed products from heated cysteine and hydroxymethylfurfural [J]. *Food Chem*, 2009, 114(1): 132-138.
- [15] Lan X H, Liu P, Xia S Q, *et al.* Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from xylose-soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking [J]. *Food Chem*, 2010, 120(4): 967-972.
- [16] 刘艳菊, 曾敏, 陈雯雯, 等. 气-质联用法分析苍术、麸炒苍术及其辅料麦麸的挥发性成分 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(11): 847-849.