

山茱萸炮制过程中美拉德反应的理化参数变化

张玉玲^{1,2}, 李伟东¹, 杨光明^{*}, 潘扬^{1,2*}, 蔡宝昌¹

- (1. 南京中医药大学, 江苏省中药炮制重点实验室, 国家中医药管理局中药炮制标准重点研究室, 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210023;
2. 南京中医药大学药用菌与中药生物技术研究所, 南京 210023)

[摘要] 目的: 从美拉德反应的角度出发, 阐明山茱萸的炮制机制。方法: 采用不同炮制方法处理山茱萸, 分析反应体系的理化参数变化。在炮制过程中不同时间点分别测定 pH 以指示酸碱变化, 紫外分光光度法检测炮制过程中的褐变程度, HPLC 检测美拉德反应产物 5-羟甲基糠醛(5-HMF)的含量变化。结果: 山茱萸炮制前 12 h, pH 降低, A_{284} 和 A_{420} 增大, 5-HMF 含量升高显著, 12 h 后变化趋势变缓, 24 h 后趋于稳定。结论: 从美拉德反应入手研究山茱萸炮制过程, 不仅有助于从新的角度揭示炮制的机制, 也为山茱萸炮制工艺的优化提供了科学的依据。

[关键词] 山茱萸; 中药炮制; 美拉德反应; 理化参数

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0028-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210028

Physicochemical Parameters of Maillard Reaction During Processing of Corni Fructus ZHANG Yu-ling^{1,2}, LI Wei-dong¹, YANG Guang-ming^{1*}, PAN Yang^{1,2*}, CAI Bao-chang¹ (1. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Standardization of Chinese Medicine Processing & Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Laboratory of Medical Fungi and Phyto-Biotech, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the processing mechanisms of Corni Fructus from the viewpoint of Maillard reaction. **Method:** Corni Fructus was processed in several different methods and the changes of physicochemical parameters in reaction system were analyzed. pH values were measured in different time points in processing to show acid-base variables. Determination of browning degree was carried out by UV spectrophotometry. The content changes of 5-HMF, one of the products of Maillard reaction, was determined by HPLC. **Result:** The 12 h before Corni Fructus processing, the pH values were decreased, A_{284} and A_{420} values were increased and contents of 5-HMF were increased significantly. All the changes slowed down and became stable after 24 h. **Conclusion:** Study on processing of Corni Fructus from the viewpoint of Maillard reaction could not only reveal the mechanism of processing from a new perspective, but also provide the scientific basis for the optimization of processing technology.

[Key words] Corni Fructus; Chinese medicine processing; Maillard reaction; physicochemical parameters

美拉德反应(Maillard reaction)^[1-2]是一种非酶褐变反应,由法国化学家 Louis-Camille Maillard 于 1912 年发现,反应指的是含游离氨基的化合物(动

植物中的有机胺、氨基酸、蛋白质和中药中的生物碱)和羰基化合物(还原糖、脂质和中药中蒽酮、黄酮、环烯醚萜、挥发油及甾酮类)在常温或加热时,

[收稿日期] 20150119(012)

[基金项目] 江苏省高校自然科学研究重大项目(12KJA360001);江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

[第一作者] 张玉玲,在读硕士,从事中药学研究, Tel:18252066802, E-mail: 957946608@qq.com

[通讯作者] * 杨光明,博士,副研究员,从事中药炮制及中药质量标准研究, E-mail: ygmm0901@hotmail.com;

* 潘扬,博士,教授,从事生物制药及中药作用机制研究, E-mail: y.pan2006@163.com

初始阶段经过羰氨缩合及分子重排,生成一些香味物质的前体成分;中间阶段前体成分通过进一步脱水,缩合或分解生成呈色呈香类物质;最终阶段主要是一些复杂高分子色素的形成过程,最终生成类黑精,此阶段反应复杂,机制尚不清楚。中药材中含有丰富的美拉德反应底物,美拉德反应广泛存在于中药炮制中。

美拉德反应中酸碱度的变化对反应体系很重要,体系的 pH 随 Maillard 反应产物的生成而改变^[3];色泽的变化则反映美拉德反应的速率^[4]。5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)是美拉德反应中的代表性产物,5-HMF 的积累与褐变程度密切相关,可以作为预测褐变速度的重要指标^[5-6]。

山茱萸主要包括环烯醚萜类、氨基酸、多糖、挥发性等成分^[7-10]。山茱萸生品敛阴止汗力强,蒸制后补肾涩精、固精缩尿力胜,具有补益肝肾、涩精固脱的功能。山茱萸入药多用其炮制品。有研究表明,山茱萸炮制后滋阴补肾、提高机体免疫等药效的升高与环烯醚萜苷类或多糖类成分有关^[11-13],但炮制后山茱萸中这 2 类成分的含量均有所降低^[14-15],其相关药效却反而增强,这个问题始终困扰着研究者。山茱萸炮制后颜色加深是不争的事实,我们猜想可能是炮制过程中发生了美拉德反应,其褐变程度及产物是否影响山茱萸的药效值得进一步探讨。

本研究从美拉德反应的角度出发,通过检测山茱萸炮制过程中理化参数,包括 pH,色泽和 5-HMF 含量的变化反映其中发生的美拉德反应,不仅有助于从新的角度揭示中药炮制的机制,也为炮制方法及工艺的优化提供了科学的依据。

1 材料

1.1 仪器 AB204-S 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo),pHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂),UV-2401PC 型紫外检测器(日本岛津),LC-10AT 系列高效液相色谱仪(双泵,CMB-10AT 系统控制器,SPD-10A 紫外检测器,CLASS-LC10 化学工作站,日本岛津)。

1.2 试药 5-羟甲基糠醛(5-HMF,纯度 99%,上海融禾医药科技发展有限公司,批号 130107),黄酒(会稽山绍兴酒股份有限公司,批号 20110930A),食用盐(江苏盐业集团有限公司,批号 20110423),醋(江苏恒顺醋业股份有限公司,批号 20130203/A3),蜂蜜(南京隆福源农产品发展有限公司,批号 20120912),甲醇、乙腈分析纯。

山茱萸由安徽丰原铜陵中药饮片有限公司提供,经南京中医药大学药用菌与中药生物技术研究所潘扬教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* 的干燥成熟去核果肉。

2 方法与结果

2.1 山茱萸样品溶液的制备

2.1.1 山茱萸样品的制备 通过查阅各省的中药炮制规范,选择酒蒸、醋蒸、清蒸、盐蒸、蜜蒸 5 种常见的炮制方法,考察不同炮制品在山茱萸炮制过程中美拉德反应的变化。取净山萸肉 40 g 为 1 份,分别加黄酒,10% 食盐水和米醋、炼蜜等液体辅料拌匀、润透(辅料用量 20%),置于蒸锅中,常压蒸制,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48 h 取出,50 ℃ 干燥,作为不同炮制时间的各山茱萸炮制的样品。

2.1.2 山茱萸样品溶液的制备 将上述常压蒸制的山茱萸样品分别打粉,过三号筛,取粉末 3.0 g,置具塞锥形瓶中,加水 30 mL,室温下超声提取 30 min,过滤,重复提取 3 次,合并滤液,定容至 100 mL,得 30 g·L⁻¹水提液。

2.2 山茱萸炮制过程中 pH 测定 取 2.1.2 项下制备的山茱萸样品水提液分别测定 pH,每个样品平行测定 3 次,绘制 pH-t 曲线,观察山茱萸炮制过程中 pH 的变化。

2.3 山茱萸炮制过程中褐变程度及中间产物吸光度测定 取 2.1.2 项下制备的山茱萸样品水提液,参考文献[16],测定 284,420 nm 处的吸光度 A,蒸馏水为空白溶液,平行测定 3 次,绘制 A-t 曲线,观察炮制过程中 A₂₈₄,A₄₂₀ 的变化。

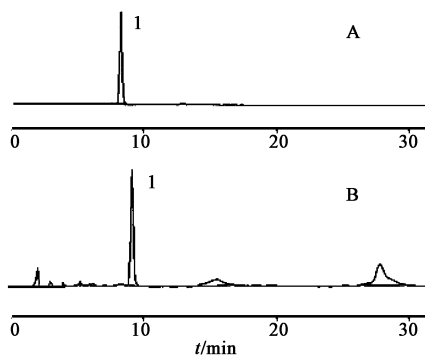
2.4 山茱萸炮制过程中 5-羟甲基糠醛(5-HMF)的含量测定

2.4.1 5-HMF 对照品溶液的制备 精密称定减压干燥至恒重的 5-HMF 对照品 12.9 mg,加甲醇定容至 10 mL,精密吸取 1 mL,加甲醇定容至 10 mL,得 129 mg·L⁻¹的 5-HMF 对照品储备液。

2.4.2 山茱萸样品溶液的制备 取 2.1.1 项下制备的各山茱萸样品粉末(过三号筛)约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 25 mL,称定质量,超声提取 25 min,放冷,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.4.3 色谱条件 Merck RP-18 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(7:93),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 240 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL,理论塔板数不少于 5 000,分离度良好

($R > 1.5$), 拖尾因子 1.0, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 5-HMF

图 1 山茱萸样品 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC of Corni Fructus

2.4.4 线性关系 分别精密吸取 2.4.1 项下制备的 5-HMF 对照品溶液, 用甲醇稀释成 25.8, 51.6, 77.4, 103.2, 129 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列溶液, 按 2.4.3 色谱条件测定 5-HMF 的峰面积, 每个样品平行测定 3 次。以峰面积平均值对进样量经线性回归处理得回归方程 $Y = 17\ 364X + 24\ 204$ ($r = 0.999\ 7$), 表明线性关系良好。

2.4.5 精密度 精密量取 5-HMF 对照品溶液 1 mL, 加甲醇 4 mL 稀释, 于 1 日内分别进样 6 次, 每次进样 10 μL , 测得 5-HMF 峰面积的 RSD 2.6%, 表明仪器的精密度良好。

2.4.6 重复性 精密称取山茱萸酒蒸 48 h 的样品粉末 0.1 g, 平行 5 份, 分别按 2.4.2 项下供试品溶液的制备方法制备, 进样 10 μL , 测得 5-HMF 质量分数的平均值 2.84%, RSD 2.6%, 表明该方法重复性良好。

2.4.7 稳定性 取新提取的同一份供试品溶液, 分别于室温放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h, 进样 10 μL , 测得 5-HMF 的峰面积的 RSD 3.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.8 加样回收率 取 2.4.6 项下同批次样品粉末 0.1 g, 平行 6 份, 分别加入 0.8, 1.0, 1.2 倍 5-HMF 含量的对照品溶液各 2 份, 精密加 80% 甲醇定容至 25 mL, 按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液 6 份, 进样 10 μL , 测定, 计算得回收率, 结果见表 1。

2.4.9 山茱萸样品的测定 取 2.4.2 项下制备的样品溶液, 在上述色谱条件下, 进样 10 μL , 测定 5-HMF 峰面积, 根据外标一点法计算 5-HMF 的百分含量, 绘制 5-HMF 含量- t 曲线。

2.5 炮制不同时间的山茱萸样品颜色变化 结果见图 2, 随着反应时间的延长, 样品的颜色不断加

表 1 山茱萸样品中 5-HMF 加样回收试验

Table 1 Results of recovery tests of Corni Fructus

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.100 3	0.002 9	0.002 3	0.005 1	95.65		
0.100 7	0.002 9	0.002 3	0.005 3	104.35		
0.100 2	0.002 8	0.002 8	0.005 5	96.43		
0.100 3	0.002 8	0.002 8	0.005 5	96.43	97.84	3.3
0.100 4	0.002 9	0.003 5	0.006 2	97.06		
0.100 9	0.002 9	0.003 5	0.006 3	97.14		

深, 由红色逐渐变为棕色, 最后到棕黑色, 反应 12 h 之后的样品颜色基本一致。

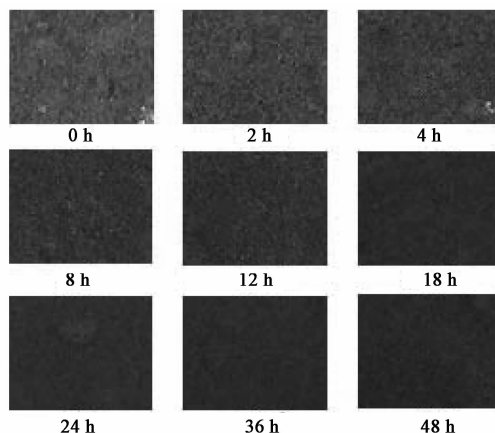


图 2 炮制不同时间的山茱萸样品颜色变化

Fig. 2 Color of Corni Fructus from different processing time

2.6 pH 的变化 山茱萸炮制过程中 pH 的变化情况见图 3 所示, 不同的炮制方法之间无显著性差异。炮制过程中美拉德反应体系的 pH 呈下降趋势。在炮制初期的 18 h 内 pH 快速下降, 尤其 8 h 内下降明显, 炮制 12 h 后 pH 仍然下降但是速度减缓, 炮制 24 h 后趋于平稳。研究表明^[17], 在美拉德反应初期会产生大量的甲酸、乙酸, 随着反应的进行, 大量的氨基会参与反应使得羧基增加, 从而使体系继续酸化。当反应达到平衡后酸碱值基本稳定。

2.7 中间产物吸光度的变化 引起 284 nm 光吸收的美拉德反应产物被普遍认为是反应高级阶段的无色小分子中间产物, 种类繁多, 主要是呋喃类、吡喃类、吡啶类、糠醛类等物质及其衍生物。炮制过程中 A_{284} 变化情况见图 4 所示, 随着炮制时间的延长, A_{284} 增加, 在炮制初期的 12 h 内上升明显, 炮制 18 h 后吸光度仍然上升但是较缓慢, 在炮制 24 h 后体系的吸光度趋于平稳, 不同炮制方法间无显著差异。

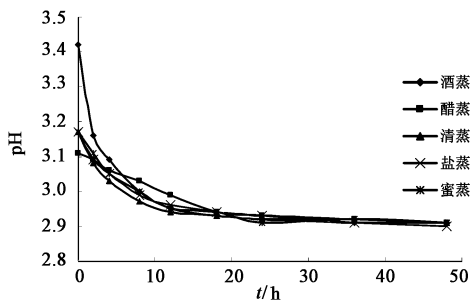


图 3 山茱萸炮制过程中体系的 pH 变化
Fig. 3 pH of Corni Fructus from different processing time

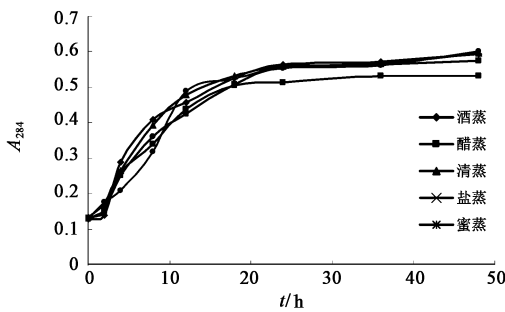


图 4 山茱萸炮制过程中体系的吸光度 (284 nm)
Fig. 4 Absorption of Corni Fructus from different processing time at 284 nm

2.8 褐变程度的变化 美拉德反应特征之一的类黑素是使整个反应体系褐变的主要物质,一般在 360~490 nm 处有吸收,研究一般测定 420 nm 处的吸光度来表征褐变程度^[18]。褐变程度的变化见图 5 所示,随着炮制时间的延长, A_{420} 增加,在炮制初期的 12 h 内增加明显,炮制 18 h 后吸光度仍然上升但是增速缓慢,在炮制 24 h 后体系的吸光度趋于平稳。这一结果与 2.5 项下的样品颜色性状变化情况一致。

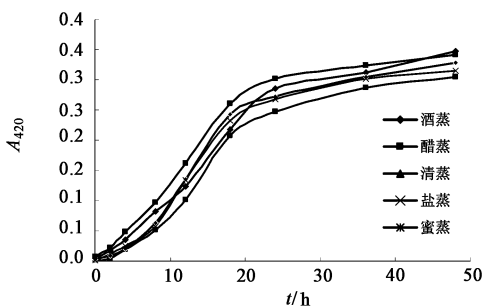


图 5 山茱萸炮制过程中体系的褐变程度
Fig. 5 Browning intensity of Corni Fructus from different processing time

2.9 5-HMF 含量测定 山茱萸炮制过程中 5-HMF 含量的变化情况见图 6。5-HMF 含量随着炮制时间

的延长而增加,在炮制初始的 18 h 内含量持续上升,尤其是 8~12 h 含量上升明显,18 h 后上升速度减缓,在炮制 24 h 后趋于平缓。蜜蒸山茱萸中 5-HMF 的含量明显高于其他炮制方法,推测由于蜂蜜中含有的氨基酸、蛋白质和糖类等成分促进了体系的美拉德反应。所有炮制方法中 5-HMF 含量在 4~8 h 内有一个平台期,这个变化的机制尚不明确,有待进一步的研究。

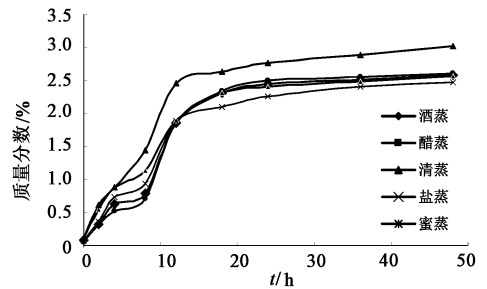


图 6 山茱萸炮制过程中 5-HMF 的含量变化
Fig. 6 Contents of 5-HMF in Corni Fructus from different processing time

3 讨论

美拉德反应广泛存在于中药加工过程中,其中共同产物 5-HMF 和类黑素是美拉德反应的特征性产物,研究其反应特点及其产物活性,对阐明其与中药药效之间的关系、指导中药炮制实践具有重要意义^[19]。本研究结果表明山茱萸美拉德反应的程度受反应时间的影响显著,虽然炮制方法不同,但各理化参数的变化趋势基本一致。山茱萸炮制过程中 pH 下降, A_{284} 增大, A_{420} 增大,5-HMF 含量增加,表明美拉德反应贯穿了山茱萸的整个炮制过程。炮制初期的 12 h 内体系的 pH 下降迅速, A_{284} , A_{420} ,5-HMF 的含量增加明显都表明美拉德反应快速,后期变化趋势平缓,可能与体系的酸碱度、氨基酸含量的改变有关,使美拉德反应的类型发生了变化。研究表明^[20],pH 对美拉德反应的影响很大,反应随着 pH 的降低而变得明显的缓慢,在 pH 很低的条件下美拉德反应很不显著。 A_{284} 和 5-HMF 含量的变化表明美拉德反应中间产物的积累,而 A_{420} 表明作为美拉德反应终产物的类黑素在不断积累。这些美拉德反应产物被证实具有一定的生物活性^[21-26],我们推测山茱萸炮制后药效增强与这些物质有关;但是又有一定的毒性。因此研究美拉德反应产物在饮片中的含量及炮制前后的含量变化,对山茱萸饮片质量标准的建立、炮制工艺及机制的研究有着重要的意义,需进行深入的实验与分析。

[参考文献]

- [1] Hodge J E. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems [J]. J Agric Food Chem, 1953, 1(15): 928-933.
- [2] 周逸群, 贺福元, 杨岩涛, 等. 美拉德反应研究现状及对中药炮制和制剂工艺研究方法的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 125-129.
- [3] Gu F L, Jin M K, Khizar H, et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system [J]. Food Chem, 2009, 117(1): 48-54.
- [4] 孙倩, 尹姿, 景浩. 四种氨基酸和单糖美拉德模式反应体系的颜色特征和自由基清除活性 [J]. 食品科学, 2009, 30(11): 118-123.
- [5] 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): 84-90.
- [6] 孙文, 巢志茂, 王淳, 等. HPLC 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): 73-78.
- [7] 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, 2010: 26-27.
- [8] 潘扬, 王天山. 植物山茱萸化学成分的研究概况 [J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 1998, 14(1): 61-62.
- [9] 袁菊丽, 姜红波. 山茱萸的主要化学成分及药理作用 [J]. 化学与生物工程, 2011, 28(5): 7-9.
- [10] 韩淑燕, 潘扬, 杨光明, 等. 超临界 CO₂ 萃取山茱萸成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1148-1151.
- [11] 李建民, 周勇, 项静辰, 等. 山茱萸总甙对正常小鼠 T 淋巴细胞免疫功能影响的实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(6): 30-33.
- [12] 李平, 王艳辉, 马润宇. 山茱萸多糖 PFCIII 抗氧化性能研究 [J]. 北京化工大学学报, 2003, 30(3): 35-38.
- [13] 杜伟锋, 王明艳, 蔡宝昌. 山茱萸炮制前后多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中药材, 2008, 31(5): 715-718.
- [14] 杜伟锋, 蔡皓, 蔡宝昌. HPLC-DAD 法同时测定山茱萸饮片中 5 个成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(17): 1342-1345.
- [15] Du W F, Cai H, Wang M Y, et al. Simultaneous determination of six active components in crude and processed *Fructus Corni* by high performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(1): 194-197.
- [16] 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, 2001, 66(7): 926-929.
- [17] 史敏. 美拉德反应和熟地黄炮制机理的关系研究 [D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [18] 孔保华, 李菁, 刘骞. 美拉德反应产物抗氧化机理及影响因素的研究进展 [J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(11): 9-11.
- [19] 刘月新, 潘雪, 邹茜, 等. 探讨 5-羟甲基糠醛在中药及复方中的存在意义 [J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(15): 3-5.
- [20] 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): 442-444.
- [21] 曹治云, 陈旭征, 杜建. 美拉德产物的生物学效应研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(7): 1491-1493.
- [22] 张程荣, 曹岗, 张云, 等. 山茱萸的化学、药理与炮制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(9): 2002-2004.
- [23] 唐修静, 张羽斌, 文运, 等. 不同炮制方法对白及中 *militarine* 及浸出物含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 67-69.
- [24] 孙志明, 焦亮, 张志斐, 等. HPLC 同时测定山茱萸总苷分散片中莫诺苷和马钱苷的血浆浓度 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 174-176.
- [25] 王兴焱, 王天晔, 陈巧云, 等. 山茱萸水提取物对黑素瘤细胞与角质形成细胞共培养模型黑素合成的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 141-143.
- [26] 王俊霞, 武晓红, 李昌勤, 等. 山茱萸提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 74-76.

[责任编辑 顾雪竹]