

• 药剂与工艺 •

半夏干燥过程中褐变机制的研究

严茂伟¹, 万 军², 楚 亮¹, 孙灵根^{1*}, 吴纯洁¹

1. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

2. 西南交通大学, 四川 成都 611756

摘 要: **目的** 研究导致半夏干燥过程中发生褐变的机制。**方法** 采用紫外分光光度法检测干燥过程中半夏中多酚氧化酶活性的变化, 使用色彩色差计测量半夏表面颜色的变化值, 考察酶促反应是否是发生褐变的唯一机制。采用 HPLC-ELSD 法检测半夏中还原性糖的种类及含量, 分析半夏中的氨基酸种类, 判断其发生羰氨反应的可能性。**结果** 导致半夏褐变的反应并不唯一, 酶促反应对其颜色变化的影响主要发生在干燥前期, 羰氨反应对半夏褐变也有影响。**结论** 导致半夏干燥过程中发生褐变的机制并不单一, 酶促反应和羰氨反应均对其颜色变化有影响。

关键词: 半夏; 颜色变化; 褐变机制; 多酚氧化酶; 羰氨反应; HPLC-ELSD

中图分类号: R283.1; R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)05-0877-04

Study on browning mechanism of drying *Pinelliae Rhizoma*YAN Mao-wei¹, WAN Jun², CHU Liang¹, SUN Ling-gen¹, WU Chun-jie¹

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Southwest Jiaotong University, Chengdu 611756, China

Abstract: Objective To study the browning mechanism of drying *Pinelliae Rhizoma*. **Methods** The activity of polyphenol oxidase (PPO) was detected by ultraviolet spectrophotometry, and the surface color data of drying *Pinelliae Rhizoma* were measured by chromaticity instrument. To draw a conclusion that whether Enzymatic browning was the unique factor of browning reaction or not by analyzing the relationship between the above two sets of data. To detect the kinds and content of reducing sugar by HPLC-ELSD and measure the kinds of amino acids in *Pinelliae Rhizoma* by amino acid analyzer. Through testing the results the possibility of Maillard reaction was analyzed. **Results** The factor of the color-change of *Pinelliae Rhizoma* is not unique, Enzymatic browning is in the prophase of the drying process and Maillard reaction also contributes to the color-change. **Conclusion** The factor in the process of *Pinelliae Rhizoma* color-change is not single. Both enzymatic browning and Maillard reaction impact on the color-change of *Pinelliae Rhizoma*.

Key words: *Pinelliae Rhizoma*; color change; browning mechanism; polyphenol oxidase (PPO); Maillard reaction; HPLC-ELSD

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎, 主要产于四川、云南、贵州、陕西、河南等省, 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结之功效, 用于痰多咳嗽、痰饮眩悸、风痰眩晕、呕吐反胃、胸脘痞闷等症, 用途广泛, 是需求量很大的常用药材^[1]。现代研究表明半夏中含有氨基酸(天门冬氨酸、酪氨酸等)、生物碱(麻黄碱等)、有机酸等, 另含有胆碱、微量挥发油、原儿茶

醛、β-谷甾醇及其葡萄糖苷等成分^[2-3]。新鲜半夏脱皮后表面洁白鲜亮, 但干燥后表面颜色变为黄色, 严重影响其外观品质及价格, 现多采取硫熏法对其进行处理以保证其表面洁白, 但硫熏法不仅影响药材质量, 导致出口受限, 亦对患者健康有很大危害。《中国药典》2010年版虽禁止使用硫熏法加工药材, 但表面颜色对价格的影响使得半夏产区仍采取此种加工方式, 因此研究半夏褐变机制, 找寻硫熏替代

收稿日期: 2010-08-09

基金项目: 四川省教育厅重点项目(08ZA119); 四川省科技厅科技支持计划(2009sz0110)

作者简介: 严茂伟, 男, 山东泰安人, 成都中医药大学在读硕士生, 研究方向为中药新制剂和新剂型的研究。E-mail: 279019166@qq.com

*通讯作者 孙灵根 Tel: (028)61801001 E-mail: wcj-one@263.net

加工方法势在必行。本实验从植物学及食品化学角度出发,探索导致半夏表面颜色变化的机制,拟寻找一种无损害的加工方法,保证半夏的表面颜色洁白鲜亮及药材质量,扩大出口,并为其他硫熏药材进行同类研究提供借鉴。

1 仪器与试药

Waters 液相色谱系统,包括 600SC HPLC 泵和 717 plus 自动进样器,蒸发光检测器 ELSD 2000 (美国 Alltech 公司)。日立 835—50 氨基酸分析仪 (日立中国),美能达 CR—410 色彩色差计 (柯尼卡美能达公司),TU—1901 可见-紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司)。

葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、木糖 (质量分数均大于 99.5%, Sigma 公司)。邻苯二酚、磷酸二氢钾、氢氧化钠、醋酸铅均为分析纯。新鲜半夏产地为四川省资阳市半夏道地产区,采收时间为 2009 年 6 月中旬,经成都中医药大学中药鉴定教研室李敏教授鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的块茎。

2 方法与结果

2.1 酶促反应对半夏干燥过程的影响

2.1.1 样品的制备 将新鲜半夏脱皮后放置自然条件下干燥 (室温),每隔 2 h 测定其酶活性及表面色差值,直至各测量值不再发生明显变化时止。

2.1.2 粗酶液的制备^[4] 取新鲜半夏脱皮,称取约 12 g,捣碎,转移至研钵中,按 1:10 比例加入冰冷纯净水 (5 ℃ 下预先放置 2 h),研磨,取研出液,将其离心,即得粗酶液。

2.1.3 多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 活性的测定 取 1 mL 粗酶液,分别加入预先配制好的 pH 7.4 磷酸缓冲液 1 mL 和 0.2% 邻苯二酚 4 mL,振摇混合,放置 3 min 后测定吸光度值。每隔 2 h 测定 1 次酶活性。每个样品平行测定 3 份,取均值;每份样品每隔 30 s 测定 1 次吸光度值,观察 4 min 内吸光度值的变化情况。酶活性通过测定 420 nm 下 4 min 内反应液吸光度的变化值 (ΔA) 来表示。1 个酶活性单位 (U) 定义为 $1 \times 10^3 \times \Delta A / (\text{min} \cdot \text{g})$ ^[5]。以酶活性对干燥时间作图,即得酶活性随干燥时间变化的趋势图 (图 1)。

2.1.4 表面色差值的测定^[6] 将新鲜半夏刚脱皮时的表面颜色值定为基准值,测得干燥过程中的颜色值为色差值 (与基准值对比的绝对变化值,用 ΔE^* 表示)。试验至表面颜色色差值无明显变化为止。分

别测定了干燥 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 h 的表面色差值,每个时间点的样品颜色色差值测定 5 次,取其均值。将颜色色差值对干燥时间作图,即得色差值随干燥时间变化的趋势图 (图 2)。

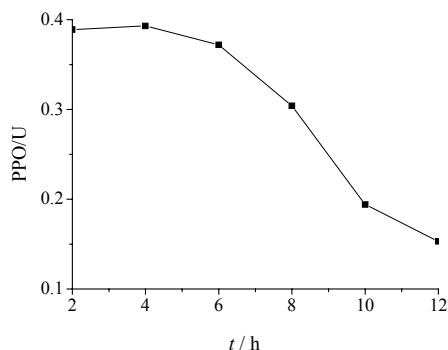


图 1 多酚氧化酶活性变化趋势

Fig. 1 Change tendency of PPO activity

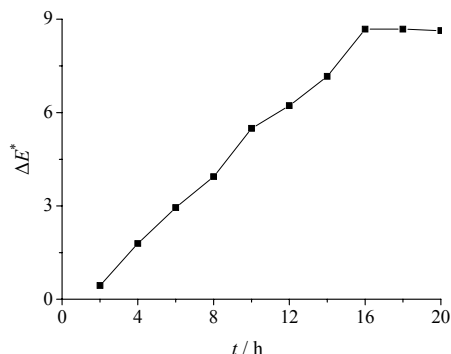


图 2 颜色变化趋势

Fig. 2 Color change tendency

半夏中含有原儿茶醛、酪氨酸等酚类物质,为 PPO 作用的底物。通过对比 PPO 活性变化曲线与半夏表面颜色变化曲线,可发现前者的变化趋势为先升后降直至平稳,即表示酶活性先是迅速增至最大值,然后开始下降并趋于稳定,此时为干燥 12 h 后,此后酶活性不再发生明显变化;后者曲线是先上升,一定时间后趋于平稳,此曲线说明半夏表面颜色的变化有一个时间范围,曲线上显示为干燥 16 h 内,半夏颜色在逐渐加深,超过 16 h 后颜色不再发生明显变化。在 12~16 h 这段时间内,半夏中的 PPO 活性已无明显变化,但其表面的颜色却一直在加深,说明半夏颜色发生变化的影响机制不仅仅是酶促反应。

2.2 羰氨反应对半夏干燥过程的影响

2.2.1 糖类成分的测定

(1) 色谱条件 色谱柱为 Aminex HPX-87P 糖

分析柱 (300 mm×7.8 mm, 9 μm, 美国 Bio-Rad), 柱温 85 °C, 以超纯水为流动相, 体积流量 0.6 mL/min, 蒸发光检测器漂移管 110 °C, 载气 (氮气) 压力 3.2×10^5 Pa, 进样量 20 μL。

(2) 对照品溶液的制备 称取葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、木糖各 0.1 g, 精密称定, 用重蒸水溶解, 定容至 100 mL 量瓶中。

(3) 供试品溶液的制备 称取脱皮半夏 25 g, 捣碎, 置 500 mL 锥形瓶中, 加蒸馏水 150 mL, 超声处理 3 次, 每次 20 min; 超声提取液移至 1 000 mL 烧杯中, 加无水乙醇 350 mL 醇沉处理, 用玻璃棒搅拌后放入冰箱中静置过夜; 醇沉液滤过, 滤液鼓风挥干, 加重蒸水溶解, 定容至 100 mL 量瓶中, 定容摇匀后 12 000 r/min 离心 20 min, 取 5 mL 上清液加入 1 mL 20% 中性醋酸铅, 85 °C 保温 20 min, 滤过。取 5 mL 溶液以 1.0 mL/min 的体积流量通过预活化好的反相 C₁₈ 固相萃取小柱, 弃去最初的 2 mL, 收集后面的 3 mL, 再用 0.22 μm 水系滤膜滤过, 即得供试品溶液。

(4) 样品测定 精密吸取对照品及供试品溶液各 20 μL, 注入高效液相色谱仪进行检测。色谱图见图 3。由色谱图可以看出, 样品中含有葡萄糖, 通过计算得出其质量浓度为 0.4 mg/mL。样品色谱图中还有一峰, 分析为半夏多糖。在糖类物质的 HPLC 检测中, 随着相对分子质量的减小, 各种糖的出峰时间逐渐延长, 样品色谱图中前一峰较葡萄糖峰出峰时间缩短近 2 min, 因此推测此峰为半夏多糖。

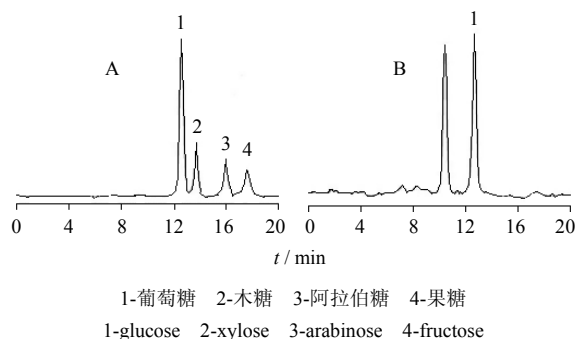


图 3 对照品 (A) 和供试品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 3 HPLC chromatogram of reference substance (A) and sample (B)

2.2.2 氨基酸的测定^[9-10]

(1) 试剂与材料 酸解剂为 6 mol/L 盐酸溶液 (将优级纯盐酸与水等体积混合), 柠檬酸钠缓冲液

(0.2 mol/L, pH 2.2, 上机用): 称取柠檬酸钠 19.6 g, 用水溶解后加入优级盐酸 16.5 mL, 硫二甘醇 5.0 g, 苯酚 1 g, 加水定容至 1 000 mL, 摇匀, 0.45 μm 滤膜滤过, 备用; 不同 pH 值和离子强度的柠檬酸钠缓冲液 (洗脱用): 按仪器说明书配制, 茚三酮溶液: 按仪器说明书配制, 混合氨基酸标准工作液: 脯氨酸 200 nmol/mL, 其他氨基酸浓度均为 100 nmol/mL; NaOH 溶液: 6 mol/L。

(2) 样品前处理 新鲜半夏脱皮自然晾干, 打成细粉。取半夏细粉约 20 g, 精密称定, 置 20 mL 水解管中, 加 10 mL 酸解剂, 冲入 N₂, 然后封口。将水解管放在 (110±1) °C 恒温干燥箱中, 水解 24 h。冷却、混匀、开管, 转移到 100 mL 量瓶中, 用 NaOH 溶液调 pH 值至 2.2, 用缓冲液定容, 0.45 μm 滤膜滤过, 供上机使用。

(3) 样品测定 准确吸取 0.2 mL 混合氨基酸标准液, 用 pH 2.2 的缓冲液稀释到 5 mL, 作为上机测定用的氨基酸标准, 用氨基酸自动分析仪以外标法测定样品测定液的氨基酸含量。半夏中含有天门冬氨酸等 17 种氨基酸, 氨基酸总量为 9.39%。见表 1。

表 1 氨基酸测定结果

Table 1 Determination of amino acid

氨基酸名称	质量分数/%	氨基酸名称	质量分数/%
天门冬氨酸	1.17	异亮氨酸	0.41
苏氨酸	0.35	亮氨酸	0.73
丝氨酸	0.49	酪氨酸	0.30
谷氨酸	1.02	苯丙氨酸	0.50
甘氨酸	0.55	赖氨酸	0.44
丙氨酸	0.41	组氨酸	0.23
胱氨酸	0.20	精氨酸	1.50
缬氨酸	0.60	脯氨酸	0.27
蛋氨酸	0.22	色氨酸	—

2.2.3 植物体外羰氨反应模拟研究^[11] 称取 9.9 g 葡萄糖与 3.75 g 甘氨酸放于缓冲液 (KH₂PO₄ 0.5 g 溶于 25 mL 纯净水中) 中, 室温下自然放置 12 h, 溶液由透明变为黄褐色, 24 h 后变为深褐色。说明羰氨反应发生不需要特殊条件, 自然条件下即可发生。后续试验中调整糖与氨基酸的量, 反应亦可发生, 表明糖与氨基酸的用量不影响反应的发生。若只选用还原性糖与氨基酸进行反应, 两种物质在未提供缓冲液环境下无论是自然放置还是对其进行加热, 羰氨反应都不能发生。

3 讨论

羰氨反应发生所需的反应物为还原性糖与氨基酸,通过对半夏 HPLC-ELSD 检测,表明新鲜半夏中含有葡萄糖;而对其氨基酸检测得出其中含有 17 种氨基酸。由此可知,新鲜半夏含有发生羰氨反应所需的物质基础。

植物体外模拟羰氨反应说明反应的发生除必备还原糖与氨基酸外,还需缓冲液环境。新鲜半夏细胞中的细胞质基质可提供类似于缓冲液的环境以保证羰氨反应的发生。

中药材在加工过程中的褐变现象比较普遍,传统的硫熏方法虽可保证其表面颜色洁白,但引入了外源性有害物质硫,过量硫对人体有害,所以研究药材的褐变机制,寻找新的既不影响药材质量又不影响患者使用的加工方法代替硫熏法势在必行,本实验对半夏褐变机制进行了初步探索,其思路可为其他药材进行同类研究提供实验依据。

本实验虽对糖及氨基酸进行了定量检测,但该检测结果仅作为定性鉴别用,只为证明半夏中含有发生酶促反应的物质基础。此外,通过研究发现,导致半夏干燥过程发生褐变的机制并不单一,酶促反应与羰氨反应在干燥过程中都会发生,都可能导致半夏干燥过程中的颜色变化,但是否还有其他机制存在,或是否还有其他物质参与褐变反应,有待进一步研究。

另外,半夏干燥后表面有色物质的成分结构、

性质及该成分对药材质量的影响亦应深入研究。

参考文献

- [1] 文燕,张明,廖志华,等. 半夏药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2008, 31(4): 504-507.
- [2] 郑汉臣,蔡少青. 药用植物学与生药学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [3] 李国亮. 半夏的毒性及临床应用 [J]. 中草药, 1999, 30(2): 156.
- [4] 黄绍华,胡晓波,王震宙. 山药中多酚氧化酶的活性测定及其护色研究 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(6): 27-29.
- [5] 司红起,马传喜,何克勤,等. 小麦多酚氧化酶活性检测方法的比较分析 [J]. 粮食与饲料工业, 2007(7): 8-10.
- [6] 黄学思,李文敏,张小琳,等. 基于色彩色差计和电子鼻的槟榔炒制火候判别及其指标量化研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14): 1788-1793.
- [7] 陶虹,陈冬云,马晓康. HPLC-ELSD 法测定甘草浸膏中的蔗糖含量 [J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(1): 71.
- [8] 张英,石雪萍,张卫明. HPLC-ELSD 法与 HPLC-RID 法检测蜂蜜中糖分的比较 [J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(1): 43-47.
- [9] GBT18246-2000 饲料中氨基酸的测定 [S]. 2000.
- [10] 王宝瑄,张金龙,任红波,等. 不同氨基酸自动分析仪氨基酸分析结果之比较 [J]. 饲料博览, 2005(9): 36-37.
- [11] Beck J, Ledl F, Sengl M, et al. Formation of acids, lactones and esters through the Maillard reaction [J]. Z Lebensm Unters Forsch, 1990, 190(3): 212-216.