

鹿茸加工过程中 5-羟甲基糠醛的产生及影响因素探讨

宫瑞泽, 王燕华, 赵 卉, 孙印石*

中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112

摘 要:目的 探讨鹿茸加工过程中 5-羟甲基糠醛(5-HMF)的产生及影响因素。方法 采用 HPLC 法对不同加工方式、不同部位鹿茸中的 5-HMF 含量进行测定。进一步对影响其含量的总糖、还原糖、氨基酸和 Ca、Mg、Fe、Cu 含量进行测定,通过比较不同加工方式鹿茸中上述物质含量的差异,讨论几种影响因素对加工过程中 5-HMF 产生的影响。**结果** 煮炸茸各部位 5-HMF 含量均显著高于冻干茸($P < 0.05$),高温加剧了焦糖化反应和美拉德反应,使煮炸茸产生更多的 5-HMF;带血茸各部位 5-HMF 含量均显著高于排血茸($P < 0.05$),总糖、还原糖和氨基酸含量丰富的带血茸为产生更多 5-HMF 提供充足底物;蜡片中 5-HMF 含量均显著高于其他部位($P < 0.05$),含量丰富的总糖、还原糖、氨基酸和差异分布的矿质元素均促进蜡片中 5-HMF 的产生。**结论** 鹿茸加工过程中 5-HMF 的产生是总糖、还原糖、氨基酸和矿质元素含量在不同温度下共同作用的结果。

关键词: 鹿茸; 5-羟甲基糠醛; 影响因素; 温度; 总糖和还原糖; 氨基酸; 矿质元素; Ca; Mg; Fe; Cu

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)14-3270-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.012

Production of 5-hydroxymethylfurfural in processing of *Cervi Cornu Pantotrichum* and investigation on its influencing factors

GONG Rui-ze, WANG Yan-hua, ZHAO Hui, SUN Yin-shi

Institute of Special Wild Economic Animal and Plant, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

Abstract: Objective To investigate the causes and influencing factors of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) during the processing of *Cervi Cornu Pantotrichum* (CCP). **Methods** HPLC was used to determine the content of 5-HMF in CCP with different processing methods and different parts. Moreover, the contents of total sugar, reducing sugar, amino acid, and Ca, Mg, Fe, and Cu in velvet antler were determined, and the effects of several factors on 5-HMF production during processing were discussed by comparing the contents of above mentioned substances in velvet antler with different processing methods. **Results** The contents of 5-HMF of boiled CCP were significantly higher than that of freeze-dried CCP ($P < 0.05$) in same parts, indicating that high temperature intensified caramelization reaction and Maillard reaction to produce more 5-HMF in boiled CCP; The contents of 5-HMF of CCP with blood were significantly higher than that of CCP without blood ($P < 0.05$), CCP with blood was rich in total sugar, reducing sugar and amino acid and these substances can provide sufficient substrate to produce more 5-HMF; The content of 5-HMF in wax slices was significantly higher than other parts ($P < 0.05$), and rich content of total sugars, reducing sugars, amino acids, and differentially distributed mineral elements all contribute to the production of 5-HMF in wax slices. **Conclusion** The production of 5-HMF in processing CCP is the result of the combined action of total sugar, reducing sugar, amino acid, and mineral elements at different temperatures.

Key words: *Cervi Cornu Pantotrichum*; 5-hydroxymethylfurfural; influencing factors; temperature; total sugar and reducing sugar; amino acids; mineral elements; Ca; Mg; Fe; Cu

早在《中国药典》1985 年版即对葡萄糖注射液 的检测做了规定;臧清策等^[1]利用 LC-MS/MS 法建立了快速筛查中药注射液中 5-HMF 的方法,结果

收稿日期: 2018-02-06

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20170309002YY, 20170311027YY, 20180201076YY); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2016-ISAPS)

作者简介: 宫瑞泽(1993—),男,山东青岛人,硕士研究生,研究方向为野生动植物保护与利用。E-mail: grz2017caas@163.com

*通信作者 孙印石(1980—),男,内蒙古兴安盟人,博士,研究员,主要从事特种动植物贮藏与产品开发。E-mail: sunyinshi2015@163.com

表明市售中药注射液质量差异很大,并建议对中药注射液中 5-HMF 的安全性予以关注,制定统一的限量标准,以提高中药注射液的用药安全。国内诸多学者也对黄精、党参、地黄、山萸肉、五味子、苍术、白茅根等不同炮制品中的 5-HMF 进行了报道^[2-8]。大部分中药在加工和炮制过程中会产生 5-HMF,其主要来源于加工过程中所发生的美拉德反应(Maillard reaction)及焦糖化反应^[9-10]。尤其在含糖、氨基酸量高的中药中普遍存在,且含量较高。研究表明,5-HMF 对人体横纹肌、内脏、基因和神经等具有毒副作用^[11-13],对眼睛、皮肤、上呼吸道及黏膜有刺激作用^[14-17],并能与人体蛋白结合产生蓄积毒性。

鹿茸 *Cervi Cornu Pantotrichum* 是鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus*

Linnaeus 的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角,具有壮肾阳、益精血、强筋骨、调冲任、托疮毒的作用^[18-20]。鹿茸中富含能参与反应的糖类和氨基酸,在鹿茸热加工过程中也会发生一系列的焦糖化和美拉德反应,因此探讨鹿茸加工过程中 5-HMF 的产生和影响因素对指导鹿茸加工具有重要意义。

本研究从 5-HMF 的 2 种产生方式(图 1)入手,探讨影响鹿茸加工过程中 5-HMF 产生的因素。从焦糖化反应角度考虑(路径①),鹿茸中总糖的含量和加工过程中的温度是影响热分解的重要因素;从美拉德反应角度考虑(路径②),影响其反应程度的主要因素是鹿茸中还原糖、氨基酸的含量和加工过程中的温度,另外,基质中的 Ca、Mg 和 Fe、Cu 也能在一定程度上抑制或促进美拉德反应,进而影响 5-HMF 的产生。

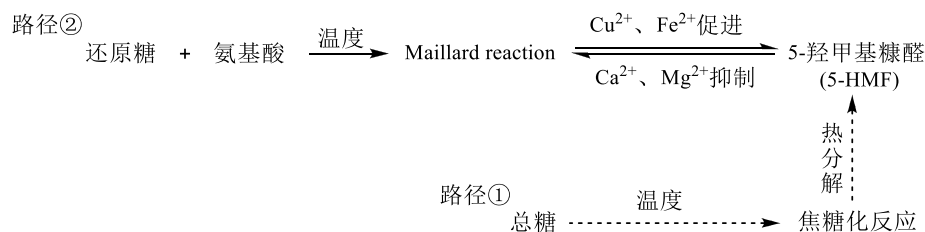


图 1 5-HMF 的 2 种产生途径

Fig. 1 Two methods for producing 5-hydroxymethylfurfural

1 仪器与材料

LC-16 高效液相色谱仪,岛津仪器(苏州)有限公司;752N 紫外可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;L-8900 全自动氨基酸分析仪,日本 Hitachi 公司;NexION 350X 电感耦合等离子体质谱仪,美国 Perkin Elmer 公司;Speed Wave MSW-4 微波消解仪,德国 Berghof 公司;MS204S 电子分析天平、XS205DU 电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;Milli-Q Advantage A10 超纯水器,美国 Millipore 公司;WP-UP-WF-40 微量分析型超纯水机,四川沃特尔水处理设备有限公司;JP-100ST 超声清洗机,广州市洁盟超声波清洗设备有限公司;XW-80A 微型漩涡混合仪,上海沪西分析仪器厂有限公司;TGL-16G 高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;低速台式大容量离心机,上海菲恰尔分析仪器有限公司;DHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;DZF-6090 真空干燥箱,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;HGC-36A 氮吹仪,天津市恒奥科技发展有限公司;0.22、0.45 μm 针头式过滤器,天津市津腾实验设备有限公司。

5-HMF 对照品,质量分数>99%,上海源叶生物科技有限公司;氨基酸混合标准液,H型,日本 Woke 公司;Cu、Fe、Ca、Mg 多元素混合标准液,质量浓度均为 1.000 mg/L,国家有色金属及电子材料分析测试中心;甲醇,色谱纯,美国 Fishser 公司;葡萄糖、石油醚、硫酸、苯酚、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、偏重亚硫酸钠、盐酸、硝酸,分析纯,北京化工厂;超纯水,电阻率 $\geq 18.25 \text{ M}\Omega$,由实验室超纯水机制备。

鲜鹿茸 12 对,购于吉林省长春市双阳区鹿乡镇,经中国农业科学院特产研究所李春义研究员鉴定为梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 的茸角(二杠)。参照文献方法^[21],随机选取其中 6 对进行排血茸(without blood)与带血茸(with blood)的对比加工,另外 6 对进行沸水煮炸(boiling processing)与冷冻干燥(freeze-drying processing)的对比加工。随机选取其中的 3 对排血茸与带血茸和 3 对煮炸茸和冻干茸进行整支粉碎。将剩余的 6 对鹿茸按蜡片(wax slices)、粉片(powder slices)、纱片(gauze slices)和骨片(bone slices)分别进行分段、切片、

粉碎、过筛、装袋、标记。

2 方法与结果

2.1 5-HMF 含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 参考标准 GB/T 18932.18-2003^[22]及文献方法^[4], 准确称取鹿茸样品粉末 0.5 g, 每个样品 3 份, 置于 5 mL 离心管中, 加 10% 甲醇 2.5 mL, 密塞, 精密称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 再次精密称定质量, 以 10% 甲醇补足减失的质量, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 沉淀重复提取 1 次, 合并 2 次上清液, 用 0.45 μ m 滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品 5-HMF 于 10 mL 量瓶中, 10% 甲醇定容至刻度, 配成质量浓度为 121 μ g/mL 的对照品储备液, 4 $^{\circ}$ C 低温保存。

2.1.3 色谱条件 Hypersil ODS2 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L; 流动相为水-甲醇, 梯度洗脱: 0~5 min, 5% 甲醇; 5~15 min, 5%~15% 甲醇; 15~20 min, 15%~0 甲醇; 检测波长 284 nm。色谱图见图 2。

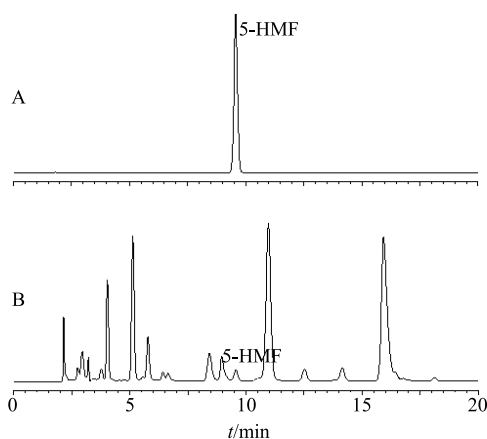


图2 5-HMF 对照品 (A) 和鹿茸样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of 5-hydroxymethylfurfural reference substances (A) and CCP sample (B)

2.1.4 线性关系考察 精密吸取 5-HMF 对照品储备液适量, 梯度稀释, 得到一系列质量浓度的对照品溶液, 按“2.1.3”项下的液相条件测定峰面积, 每个质量浓度平行进样 3 次, 以峰面积平均值为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y=158\,214X-67\,765.3$, $R^2=0.999\,9$, 结果表明 5-HMF 在 0.189~121.000 μ g/mL 线性关系良好。

2.1.5 检出限与定量限 将“2.1.2”项的对照品储备液用 10% 甲醇逐级稀释后, 按信噪比 (S/N) 为 3 的对照品溶液质量浓度为检测限 (LOD), 以 S/N 为 10 的对照品溶液质量浓度为定量限 (LOQ), LOD 和 LOQ 分别为 1.23、4.06 ng/mL。

2.1.6 精密度试验 精密吸取 5-HMF 对照品溶液 20 μ L, 按“2.1.3”项色谱条件进行分析, 连续进样 5 次, 测定峰面积, 计算 5-HMF 峰面积的 RSD, 结果 5-HMF 的 RSD 分别为 2.17%, 表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 精密称取煮炸茸 (整支) 样品 6 份, 每份 0.5 g, 按“2.1.1”项制得供试品溶液, 精密吸取 6 份供试品溶液各 20 μ L, 按“2.1.3”项色谱条件依次进样分析, 测定峰面积, 计算 5-HMF 的质量分数, 结果 5-HMF 质量分数的 RSD 为 2.81%, 表明本实验重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 精密吸取“2.1.1”项方法制备的煮炸茸 (整支) 供试品溶液 20 μ L, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 按“2.1.3”项色谱条件进样分析, 测定峰面积, 结果 5-HMF 峰面积的 RSD 为 1.84%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取 6 份已知 5-HMF 含量的鹿茸样品粉末 0.3 g, 加入适量的 5-HMF 对照品溶液, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项色谱条件测定峰面积计算质量分数, 计算回收率。5-HMF 的平均加样回收率为 100.01%, RSD 为 1.70%, 表明加样回收率良好。

2.1.10 不同加工方式鹿茸中 5-HMF 含量测定 不同加工方式不同部位鹿茸中 5-HMF 质量分数见表 1, 由表 1 可知, 冻干茸整支、蜡片、粉片、纱片、骨片部位 5-HMF 的质量分数分别为 4.83、4.94、4.72、4.49、4.38 mg/kg, 煮炸茸相应部位 5-HMF 的质量分数分别为 5.44、5.85、5.37、5.26、5.17 mg/kg, 排血茸相应部位 5-HMF 的质量分数分别为 4.86、5.45、5.30、4.82、4.55 mg/kg, 带血茸相应部位 5-HMF 的质量分数分别为 5.66、6.20、6.16、5.45、5.43 mg/kg。通过比较冻干茸和煮炸茸中 5-HMF 含量发现, 冻干茸各部位 5-HMF 含量差别较小, 冻干茸中 5-HMF 的来源是内源性的, 因此各部位之间差异不显著 ($P>0.05$); 煮炸茸各部位 5-HMF 含量均显著高于相同部位冻干茸 ($P<0.05$), 煮炸加工过程中的沸水煮炸和长时间的高温烘烤是产生上述差异的主要原因, 高温不仅加快了糖类物

表 1 不同加工方式、不同部位鹿茸中 5-HMF 质量分数

Table 1 5-Hydroxymethylfurfural content of CCP with different processing methods and different parts

加工方式	5-HMF/(mg·kg ⁻¹)				
	蜡片	粉片	纱片	骨片	整支
冻干茸	4.94±0.16	4.72±0.23	4.49±0.22	4.38±0.12	4.83±0.17
煮炸茸	5.85±0.09	5.37±0.18	5.26±0.19	5.17±0.14	5.44±0.19
排血茸	5.45±0.12	5.30±0.21	4.82±0.25	4.55±0.21	4.86±0.22
带血茸	6.20±0.21	6.16±0.24	5.45±0.17	5.43±0.19	5.66±0.14

质的脱水缩合，也加剧了鹿茸中糖类与氨基酸发生美拉德反应的程度。

在排血茸和带血茸中，蜡片、粉片中 5-HMF 含量均显著高于纱片和骨片 ($P<0.05$)，各部位对应发育程度不同的软骨组织，其中能通过反应产生 5-HMF 的糖类和氨基酸等底物含量可能也不同；带血茸各部位 5-HMF 含量均显著高于相同部位排血茸 ($P<0.05$)，排血茸在加工过程中通过高速离心将茸体中的血液排出，血液中含有丰富的糖类和氨基酸等能通过反应生成 5-HMF 的底物，这些物质的减少正是造成上述差异的重要原因。

2.2 总糖和还原糖含量测定

2.2.1 供试品溶液的制备 准确称取鹿茸样品粉末 0.50 g 于 10 mL 离心管中，加 5 mL 石油醚，超声 10 min，8 000 r/min 离心 5 min，弃上清，挥干溶剂，重复脱脂 3 次。加 2.5 mL 蒸馏水，精密称定质量，沸水浴中放置 2 h，放冷，再次精密称定质量，以蒸馏水补足减失的质量，8 000 r/min 离心 5 min，残渣加水 5 mL，重复提取 1 次，合并 2 次提取液，精密吸取 1 mL 作为测定还原糖的供试品溶液；另取 1 mL 作为测定总糖的供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取 105 °C 烘至恒定质量的葡萄糖对照品，以蒸馏水定容，配制成 1.0、1.2 g/L 的对照品溶液。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密吸取 1.0 g/L 的葡萄糖对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL

于 5 mL 离心管中，加蒸馏水至 2.5 mL，加 1.5 mL DNS 显色液，涡旋混匀后置沸水浴保持 5 min，放冷，以空白管为对照，测定 540 nm 波长处的吸光度 (A) 值。以葡萄糖质量浓度为横坐标 (X)， A 值为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，得总糖线性回归方程为 $Y=7.949\ 6\ X-0.032\ 4$ ， $R^2=0.999\ 1$ ，线性范围为 5~300 μg/mL。

精密吸取 1.2 g/L 的葡萄糖对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.6 mL 于 10 mL 试管中，加水补充至 1 mL，加 2.5 mL 硫酸、0.5 mL 6% 苯酚溶液，涡旋混匀，室温静置 30 min，于 490 nm 处测其 A 值。绘制 A -质量浓度曲线，得还原糖线性回归方程 $Y=0.011\ 8\ X$ ， $R^2=0.997\ 9$ ，线性范围为 15~480 μg/mL。

2.2.4 不同加工方式鹿茸中总糖和还原糖含量 不同加工方式不同部位鹿茸中总糖及还原糖质量分数见表 2。由表 2 可知，冻干茸整支、蜡片、粉片、纱片、骨片部位总糖的质量分数分别为 11.92、27.71、20.73、12.20、12.01 g/kg，还原糖的质量分数分别为 2.37、4.47、1.19、1.00、0.85 g/kg；煮炸茸相应部位总糖的质量分数分别为 11.71、17.43、16.75、10.32、11.30 g/kg，还原糖的质量分数分别为 0.96、1.43、0.97、0.92、0.44 g/kg；排血茸相应部位总糖的质量分数分别为 10.01、10.52、9.84、9.63、7.72 g/kg，还原糖的质量分数分别为 0.81、0.91、0.90、0.86、0.82 g/kg；带血茸相应部位总糖的质量分数分别为 11.82、16.93、16.40、13.17、10.13 g/kg，还

表 2 不同加工方式、不同部位鹿茸中总糖和还原糖质量分数

Table 2 Total sugar and reducing sugar content of CCP with different processing methods and different parts

加工方式	总糖/(g·kg ⁻¹)					还原糖/(g·kg ⁻¹)				
	蜡片	粉片	纱片	骨片	整支	蜡片	粉片	纱片	骨片	整支
冻干茸	27.71±0.45	20.73±0.32	12.20±0.18	12.01±0.19	11.92±0.22	4.47±0.13	1.19±0.16	1.00±0.18	0.85±0.11	2.37±0.14
煮炸茸	17.43±0.48	16.75±0.32	10.32±0.35	11.30±0.28	11.71±0.19	1.43±0.11	0.97±0.09	0.92±0.24	0.44±0.21	0.96±0.18
排血茸	10.52±0.23	9.84±0.24	9.63±0.35	7.72±0.33	10.01±0.28	0.91±0.21	0.90±0.13	0.86±0.22	0.82±0.19	0.81±0.14
带血茸	16.93±0.20	16.40±0.27	13.17±0.36	10.13±0.25	11.82±0.38	1.43±0.09	1.01±0.23	0.91±0.17	0.88±0.14	1.00±0.31

原糖的质量分数分别为 1.00、1.43、1.01、0.91、0.88 g/kg。

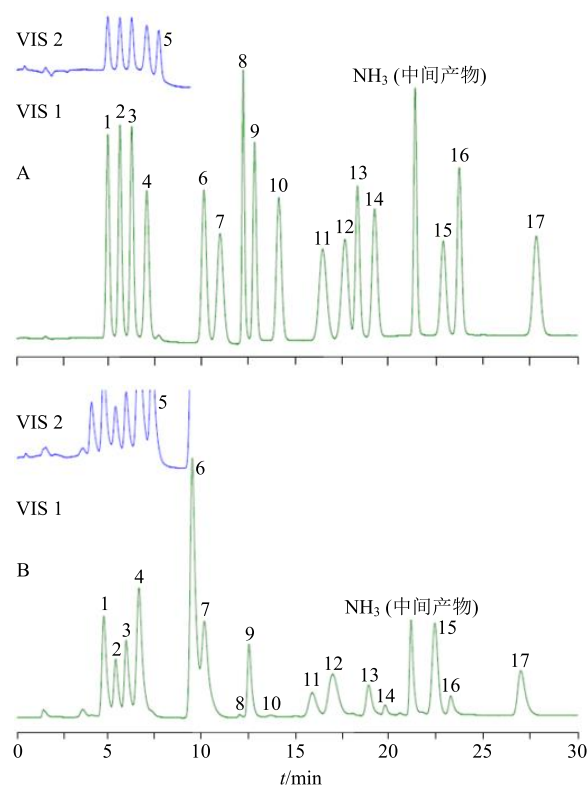
鹿茸中的 5-HMF 通过 2 种途径产生：一方面是糖的热解产物，包括葡萄糖、果糖、蔗糖等；另一方面是美拉德反应产物，由还原糖与氨基酸反应产生。通过对不同加工方式鹿茸中总糖和还原糖含量的检测发现，煮炸茸与冻干茸相比，相同部位总糖及还原糖的含量均显著减少 ($P < 0.05$)，与煮炸茸中相同部位 5-HMF 含量高于冻干茸相吻合；排血茸与带血茸相比，排血茸中总糖和还原糖含量均显著低于带血茸 ($P < 0.05$)，证实排血茸加工过程中通过物理离心排出血液的同时确实造成了糖类质量浓度的降低，导致带血茸同一部位中 5-HMF 含量高于排血茸。另外，通过对排血茸和带血茸相同加工方式不同部位中总糖和还原糖含量比较发现，同一加工方式不同部位鹿茸中总糖和还原糖含量呈现出蜡片最高，粉片、纱片、骨片含量依次递减的规律，这与蜡片、粉片中 5-HMF 含量均显著高于纱片和骨片的结果相吻合。

2.3 氨基酸含量测定

2.3.1 样品的前处理 参考标准 GB/T 5009.124-2003^[23]及文献方法^[24]，准确称取鹿茸样品 30 mg，置于 35 mL 水解管中；加 6 mol/L HCl 20 mL，拧紧螺旋塞密封；超声 10 min；于恒温干燥箱中 110 °C 水解 22 h；水解结束冷却至室温；每管取 800 μ L 至小试管，70 °C 真空干燥挥干溶剂；0.02 mol/L HCl 2 mL 定容，涡旋使充分溶解；用 0.22 μ m 水系针头式过滤器滤过至样品瓶，上机备用。

2.3.2 氨基酸标准谱图的绘制 氨基酸混合标准液组分：天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、脯氨酸(Pro)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、缬氨酸(Val)、甲硫氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)，各组分浓度均为 2.5 mmol/L。用 0.1 mol/L HCl 将混合标准液稀释 1 000 倍，取适量置于进样瓶，参考标准 GB/T 5009.124-2003 对标准品进行上机测试，得到如图 3-A 所示的标准品色谱图。鹿茸样品典型氨基酸色谱图见图 3-B。其中，通道 1 (VIS 1) 为 570 nm 波长通道，通道 2 (VIS 2) 为 440 nm 波长通道，除 Pro 在 VIS 2 显示外，其余 16 种氨基酸组分均在 VIS 1 显示。

2.3.3 不同加工方式鹿茸中氨基酸含量 不同加工



1-Asp 2-Thr 3-Ser 4-Glu 5-Pro 6-Gly 7-Ala 8-Cys 9-Val
10-Met 11-Ile 12-Leu 13-Tyr 14-Phe 15-Lys 16-His 17-Arg

图 3 氨基酸标准品 (A) 和鹿茸样品 (B) HPLC 图
Fig. 3 HPLC of amino acid standards (A) and CCP sample (B)

方式、不同部位鹿茸中氨基酸量见表 3。由表 3 可知，冻干茸整支、蜡片、粉片、纱片、骨片部位总氨基酸的质量分数分别为 68.00%、88.64%、62.51%、61.75%、58.20%，煮炸茸相应部位总氨基酸的质量分数分别为 67.59%、87.48%、62.29%、60.97%、55.62%，排血茸相应部位总氨基酸的质量分数分别为 63.55%、86.74%、66.65%、62.35%、52.34%，带血茸相应部位总氨基酸的质量分数分别为 64.31%、91.02%、74.06%、66.94%、61.06%。

煮炸茸各部位总氨基酸含量均低于相应部位冻干茸，比较更易发生美拉德反应的 3 种碱性氨基酸 (Lys、His、Arg) 均呈现相同结果，推测煮炸过程中发生美拉德反应并生成 5-HMF 等产物是造成氨基酸含量降低的主要原因；带血茸各部位总氨基酸含量及碱性氨基酸含量均明显高于相应部位排血茸，同糖类物质相同，该结果是加工过程中通过物理排出血液造成的；同一加工方式不同部位鹿茸中的总氨基酸和碱性氨基酸含量表现出蜡片显著高于其他部位 ($P < 0.05$)，粉片、纱片、骨片无明显差

表 3 不同加工方式、不同部位鹿茸中氨基酸质量分数

Table 3 Amino acids content of CCP with different processing methods and different parts

样品		质量分数/%								
		Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met
冻干茸	蜡片	7.29±0.49	3.51±0.17	3.85±0.11	10.90±0.44	11.96±0.61	7.18±0.48	0.58±0.02	4.61±0.11	0.32±0.01
	粉片	5.30±0.10	2.49±0.07	2.65±0.04	7.53±0.59	8.80±0.58	5.24±0.08	0.28±0.01	3.39±0.01	0.19±0.01
	纱片	4.88±0.07	2.24±0.08	2.52±0.02	7.22±0.22	10.01±0.31	5.43±0.06	0.32±0.02	3.00±0.04	0.12±0.01
	骨片	4.30±0.12	1.92±0.09	2.23±0.18	6.68±0.22	10.79±0.25	5.40±0.17	0.18±0.04	2.57±0.12	0.04±0.02
	整支	5.15±0.21	2.33±0.15	2.65±0.23	7.79±0.31	10.99±0.26	5.79±0.09	0.33±0.03	3.11±0.14	0.18±0.01
煮炸茸	蜡片	7.13±0.31	3.47±0.12	3.82±0.15	10.94±0.93	11.87±0.45	6.96±0.33	0.71±0.02	4.56±0.05	0.16±0.02
	粉片	5.15±0.04	2.42±0.04	2.64±0.05	7.75±0.42	9.49±0.15	5.47±0.22	0.36±0.02	3.24±0.04	0.15±0.01
	纱片	4.76±0.03	2.15±0.06	2.42±0.01	7.08±0.23	10.19±0.05	5.56±0.06	0.23±0.00	2.95±0.06	0.06±0.01
	骨片	4.10±0.05	1.84±0.12	2.13±0.14	6.37±0.21	10.43±0.14	5.28±0.14	0.19±0.08	2.43±0.11	0.05±0.01
	整支	5.22±0.11	2.40±0.08	2.76±0.12	8.00±0.22	11.50±0.23	6.09±0.31	0.20±0.07	3.16±0.09	0.05±0.02

样品		质量分数/%								
		Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Pro	总量 (TAA)
冻干茸	蜡片	2.64±0.10	6.64±0.13	2.30±0.01	3.65±0.09	5.87±0.20	2.04±0.04	6.69±0.41	8.61±0.54	88.64±3.30
	粉片	1.65±0.02	4.86±0.09	1.28±0.01	2.62±0.04	3.96±0.11	1.68±0.03	4.52±0.21	6.07±0.22	62.51±1.84
	纱片	1.49±0.05	4.20±0.05	1.21±0.01	2.37±0.02	3.76±0.03	1.39±0.02	4.76±0.07	6.83±0.09	61.75±0.90
	骨片	1.25±0.12	3.50±0.13	1.01±0.17	2.01±0.15	3.40±0.21	1.10±0.17	4.63±0.45	7.15±0.52	58.20±1.17
	整支	1.70±0.09	4.35±0.24	1.28±0.09	2.42±0.14	4.02±0.13	1.37±0.07	5.12±0.34	7.42±0.49	68.00±1.23
煮炸茸	蜡片	2.98±0.02	6.49±0.24	2.14±0.03	3.52±0.04	5.67±0.22	1.89±0.02	6.87±0.36	8.30±0.34	87.48±1.78
	粉片	1.72±0.05	4.59±0.13	1.23±0.01	2.53±0.04	3.92±0.14	1.49±0.07	4.65±0.10	6.49±0.12	62.29±0.82
	纱片	1.39±0.01	4.09±0.03	1.13±0.00	2.32±0.02	3.69±0.10	1.37±0.02	4.62±0.12	6.96±0.06	60.97±0.28
	骨片	1.17±0.12	3.28±0.11	0.91±0.04	1.93±0.11	3.15±0.12	1.04±0.11	4.33±0.35	6.99±0.17	55.62±1.74
	整支	1.70±0.09	4.35±0.05	1.30±0.02	2.44±0.09	4.09±0.29	1.37±0.09	5.20±0.42	7.76±0.21	67.59±1.82

样品		质量分数/%								
		Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met
排血茸	蜡片	6.82±0.32	3.28±0.12	3.67±0.11	10.72±0.63	12.57±0.35	7.07±0.13	0.60±0.01	4.38±0.03	0.10±0.01
	粉片	5.20±0.21	2.44±0.02	2.73±0.05	8.35±0.26	10.62±0.21	5.67±0.11	0.45±0.01	3.18±0.07	0.22±0.00
	纱片	4.71±0.07	2.14±0.01	2.46±0.01	7.50±0.13	10.31±0.41	5.80±0.21	0.39±0.01	2.81±0.02	0.06±0.01
	骨片	3.87±0.21	1.77±0.11	2.05±0.12	6.34±0.25	9.45±0.33	4.72±0.27	0.30±0.18	2.27±0.09	0.05±0.01
	整支	4.47±0.19	1.98±0.04	2.35±0.09	7.25±0.34	12.46±0.41	6.01±0.32	0.32±0.03	2.60±0.11	0.06±0.02
带血茸	蜡片	7.16±0.11	3.43±0.07	3.84±0.03	11.11±0.36	13.59±0.21	7.54±0.14	0.68±0.01	4.46±0.08	0.09±0.01
	粉片	5.88±0.12	2.80±0.02	2.99±0.03	8.52±0.12	11.19±0.10	6.54±0.05	0.48±0.01	3.84±0.05	0.18±0.01
	纱片	5.47±0.07	2.62±0.05	2.81±0.01	8.11±0.09	9.49±0.30	5.73±0.03	0.37±0.01	3.53±0.05	0.25±0.00
	骨片	4.36±0.19	1.95±0.11	2.29±0.08	6.95±0.15	11.84±0.21	5.85±0.07	0.11±0.05	2.61±0.11	0.04±0.02
	整支	5.04±0.18	2.33±0.13	2.46±0.10	7.40±0.14	10.37±0.14	5.88±0.05	0.33±0.03	3.25±0.18	0.12±0.00

样品		质量分数/%								
		Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Pro	总量 (TAA)
排血茸	蜡片	2.96±0.01	6.11±0.17	2.14±0.00	3.35±0.02	5.56±0.11	1.74±0.02	6.89±0.21	8.78±0.21	86.74±0.18
	粉片	1.99±0.03	4.49±0.11	1.35±0.00	2.48±0.04	4.01±0.09	1.27±0.03	5.01±0.11	7.19±0.14	66.65±0.74
	纱片	1.53±0.03	3.81±0.07	1.11±0.01	2.18±0.01	3.76±0.11	1.13±0.01	5.00±0.07	7.65±0.01	62.35±0.48
	骨片	1.26±0.11	3.15±0.14	0.89±0.14	1.74±0.14	3.01±0.12	0.88±0.11	4.11±0.21	6.28±0.15	52.34±0.72
	整支	1.42±0.05	3.54±0.12	1.05±0.03	2.11±0.09	3.58±0.15	1.05±0.05	5.09±0.13	8.21±0.19	63.55±0.82
带血茸	蜡片	2.96±0.03	6.30±0.14	2.11±0.02	3.42±0.07	5.66±0.12	1.75±0.01	7.28±0.12	9.44±0.11	91.02±0.46
	粉片	1.77±0.04	5.33±0.07	1.57±0.02	3.01±0.02	4.81±0.02	1.83±0.01	5.42±0.05	7.90±0.09	74.06±0.34
	纱片	1.78±0.04	5.06±0.03	1.44±0.05	2.81±0.02	4.26±0.07	1.75±0.03	4.78±0.13	6.48±0.05	66.94±0.49
	骨片	1.31±0.08	3.52±0.11	1.02±0.14	2.04±0.09	3.48±0.15	1.05±0.05	4.88±0.15	7.89±0.18	61.06±0.46
	整支	1.48±0.06	4.50±0.13	1.24±0.22	2.52±0.12	4.03±0.17	1.53±0.07	4.74±0.17	7.09±0.19	64.31±0.56

异,该结果与王燕华等^[25]的研究结果一致,这与蜡片中 5-HMF 含量显著高于其他部位的结果相吻合。

2.4 Ca、Mg、Fe、Cu 含量测定

2.4.1 样品前处理 准确称取鹿茸样品粉末 0.40 g,参考文献的方法^[26]对样品进行微波消解。同法制备空白试样。

2.4.2 标准曲线的绘制 分别准确量取一定体积的各元素标准储备液,配成一系列梯度浓度的标准溶液,2% HNO₃定容,摇匀,备用。线性回归方程分别为 Ca $Y=3.91 \times 10^{-4}+5.542 \times 10^{-3} X$, Mg $Y=0.059\ 52+0.389\ 142 X$, Fe $Y=20\ 345.6 X+445.3$, Cu $Y=1\ 118.28 X-90.2$, 相关系数均 $>0.999\ 5$,线性范围分别为 Ca 1~5 mg/L、Mg 0.1~1 mg/L、Fe 0.5~5 mg/L、Cu 0.5~2 mg/L。

2.4.3 不同加工方式鹿茸中 Ca、Mg、Cu、Fe 含量 不同加工方式、不同部位鹿茸中 Ca、Mg、Cu、Fe 质量分数见表 4。

Ramonaityte 等^[27]研究表明,基质中的 Ca²⁺和 Mg²⁺对美拉德反应有一定程度的抑制作用,且相同浓度下 Mg²⁺的抑制效果更显著;Fe²⁺和 Cu²⁺对美拉德反应有促进作用。通过对不同加工方式不同部位鹿茸中的 Ca、Mg、Fe 和 Cu 含量检测发现,不同加工方式对鹿茸中 Ca、Mg 和 Cu 元素含量的影响较小,但对于 Fe 来说,排血茸因加工时将血液排出,血液中含大量的 Fe,导致各部位 Fe 的含量均低于带血茸;不同部位鹿茸上述矿质元素含量表现出蜡片、粉片、纱片和骨片中 Ca 和 Mg 含量依次递增,Cu 含量依次递减。

不同部位对应发育程度不同的软骨组织,其生长分化能力不同,鹿茸从顶部到基部切片分别对应蜡片、粉片、纱片、骨片。蜡片对应生长分化迅速的组织,骨化程度低,Ca 和 Mg 含量低;基部组织逐渐钙化,骨化程度逐渐增加,相应 Ca 和 Mg 含量高;Cu²⁺作为构成体内众多参与生化反应相关酶的辅基,在生长分化能力强的顶部含量高,在生长分化能力相对较弱的基部含量低。鹿茸这种从顶部到基部 Ca 和 Mg 含量逐渐增高的元素分布,在一定程度上抑制了基部发生美拉德反应;从顶部到基部 Cu 含量逐渐降低的元素分布,又在一定程度上促进了顶部发生美拉德反应。正是鹿茸中参与反应的总糖、还原糖、氨基酸和矿质元素的不均等分布等因素的综合作用导致不同部位鹿茸中 5-HMF 含量呈现出蜡片、粉片均显著高于纱片和骨片。

表 4 不同加工方式、不同部位鹿茸中 Ca、Mg、Fe 和 Cu 含量

Table 4 Ca, Mg, Fe, and Cu contents of CCP with different processing methods and different parts

加工方式	部位	质量分数/(mg·kg ⁻¹)			
		Ca	Mg	Fe	Cu
冻干茸	蜡片	904.0	467.0	167.0	4.0
	粉片	103 000.0	2 190.0	232.0	2.2
	纱片	137 000.0	2 630.0	186.0	1.6
	骨片	148 000.0	2 820.0	199.0	2.4
	整支	116 000.0	3 030.0	168.0	1.5
煮炸茸	蜡片	4 320.0	529.0	112.0	3.7
	粉片	112 000.0	2 380.0	167.0	2.0
	纱片	136 000.0	2 600.0	168.0	1.7
	骨片	160 000.0	2 990.0	117.0	1.3
	整支	123 000.0	3 130.0	281.0	1.8
排血茸	蜡片	2 930.0	531.0	39.9	3.2
	粉片	92 000.0	2 170.0	51.9	1.6
	纱片	137 000.0	2 800.0	63.4	1.4
	骨片	148 000.0	2 960.0	69.7	4.7
	整支	128 000.0	2 550.0	85.3	1.7
带血茸	蜡片	4 420.0	556.0	61.7	2.9
	粉片	106 000.0	2 390.0	212.0	1.9
	纱片	132 000.0	2 670.0	196.0	1.7
	骨片	145 000.0	2 840.0	184.0	2.1
	整支	109 000.0	2 150.0	187.0	1.4

3 讨论

3.1 鹿茸中 5-HMF 的提取和分析

5-HMF 易溶于甲醇、乙醇、水等极性较大的溶剂,本实验在参考标准 GB/T18932.18-2003^[22]和朱梅芬等^[4]方法的基础上,选择 10%甲醇按料液比 1:10 对鹿茸中的 5-HMF 进行提取,该方法具有操作简单、提取率高等特点。《中国药典》2015 年版^[28]中采用紫外-可见分光光度法在 284 nm 条件下对葡萄糖注射液中 5-HMF 进行监测,该方法准确性较差。本实验应用高效液相色谱法按外标法检测鹿茸中的 5-HMF,该方法具有专属性强、准确性高和重现性好的优点。

3.2 不同加工方式鹿茸中 5-HMF 的含量

研究表明,一定剂量的 5-HMF 被人体吸收后,会对肝脏、肾脏、心脏等器官产生不良影响。本研究首次报道了鹿茸中 5-HMF 的含量,对指导鹿茸加工具有重要意义。煮炸茸各部位 5-HMF 含量均

显著高于相同部位冻干茸；带血茸各部位 5-HMF 含量均显著高于相同部位排血茸；排血茸和带血茸中，蜡片、粉片中 5-HMF 含量均显著高于纱片和骨片。

3.3 影响鹿茸加工过程中 5-HMF 产生的因素

本研究从 5-HMF 的 2 种产生途径入手，探讨影响鹿茸加工过程中 5-HMF 产生的因素。鹿茸加工过程中 5-HMF 的产生是总糖、还原糖、氨基酸和矿质元素含量在不同温度下共同作用的结果。温度既能影响糖的热分解又能加剧美拉德反应，因此沸水煮炸和高温烘烤加工而成的煮炸茸中 5-HMF 的含量要高于低温干燥而成的冻干茸。糖类能发生焦糖化反应产生 5-HMF，因此煮炸茸与冻干茸相比，消耗总糖产生更多的 5-HMF，总糖含量高的带血茸更易产生较多的 5-HMF，蜡片也较其他部位更易产生较多的 5-HMF。刘苗苗等^[6]以果糖和葡萄糖为底物构建的模拟苍术麸炒反应体系研究 5-HMF 的转化机制，结果表明苍术麸炒过程中产生的 5-HMF 来自糖类的转化。刘潇潇等^[29]也从糖类热分解角度对参芪扶正注射液中 5-HMF 的来源进行了初步探讨。

还原糖和氨基酸是美拉德反应的底物，二者可以通过反应产生 5-HMF，因此与冻干茸相比，煮炸茸消耗了还原糖和氨基酸产生了更多的 5-HMF，带血茸比排血茸具备更多能通过反应产生 5-HMF 的还原糖和氨基酸，同样，蜡片也较其他部位更易产生较多的 5-HMF。能够抑制美拉德反应的 Ca 和 Mg 从鹿茸顶部到基部含量逐渐增高，能够促进美拉德反应的 Cu 却恰恰相反，这种矿质元素的不均等分布同其他因素综合作用导致不同部位鹿茸中 5-HMF 含量呈现出蜡片、粉片均显著高于纱片和骨片。

参考文献

- [1] 臧清策, 何菁菁, 白进发, 等. 快速筛查中药注射液有害物质 5-羟甲基糠醛的 LC-MS/MS 方法及其质量评价研究 [J]. 药科学报, 2013, 48(11): 1705-1709.
- [2] 宋艺君, 郭涛, 周晓程. 不同产地黄精经不同方法炮制后多糖、5-羟甲基糠醛的含量变化 [J]. 中国药房, 2017, 28(16): 2256-2258.
- [3] 邹利, 邱炳勋, 刘珂, 等. 党参米炒前后党参多糖与 5-羟甲基糠醛的变化及其对胃肠平滑肌运动的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 149-154.
- [4] 朱梅芬, 刘向前, 吴柱熹, 等. 地黄的炮制对梓醇和 5-羟甲基糠醛含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1155-1157.
- [5] 吴莉, 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.
- [6] 刘苗苗, 陈祥胜, 陈琪瑶, 等. 苍术麸炒过程中 5-羟甲基糠醛的转化机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1327-1331.
- [7] 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.
- [8] 曹雨诞, 和颖颖, 张丽, 等. 白茅根炒炭前后 5-羟甲基糠醛的变化研究 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1475-1477.
- [9] 赵玲, 周臣清, 朱婉清, 等. 生物安全性和生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2016, 11(37): 372-377.
- [10] 张玉玉, 宋弋, 李全宏. 食品中糠醛和 5-羟甲基糠醛的产生机理、含量检测及安全性评价研究进展 [J]. 食品科学, 2012, 33(5): 275-280.
- [11] Zhang X M, Chan C C, Stamp D, *et al.* Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethylfurfural [J]. *Carcinogenesis*, 1993, 14(4): 773-775.
- [12] 中华人民共和国农业行业标准. 蜂胶中总黄酮的测定方法 [S]. 2006.
- [13] 郭明, 何玲, 鲁小旺. 5-羟甲基糠醛与不同血清白蛋白的结合反应机制研究 [J]. 药科学报, 2012, 47(3): 385-392.
- [14] Guo M, Xu X T, Wu Z W. Binding mechanism of rhaponticin and human serum albumin [J]. *Acta Pharm Sin*, 2011, 46(9): 1084-1092.
- [15] Pasiakos I N, Kiriakou I K, Proestos C. HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration [J]. *Food Chem*, 2017, 12(229): 425-431.
- [16] Qin L, Zhang Y, Xu X, *et al.* Isotope dilution HPLC-MS/MS for simultaneous quantification of acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in thermally processed seafood [J]. *Food Chem*, 2017, 12(232): 633-638.
- [17] Olivares-Tenorio M, Verkerk R, van Boekel M A J S, *et al.* Thermal stability of phytochemicals, HMF and antioxidant activity in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) [J]. *J Funct Foods*, 2017, 8(32): 46-57.
- [18] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [19] 桂丽萍, 郭萍, 郭远强. 鹿茸化学成分和药理活性研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 237-240.
- [20] 王楠, 高晓霞, 代子彦, 等. 鹿茸药效物质基础、药

- 理作用、临床应用及质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4784-4790.
- [21] 李和平, 王春生. 生态养鹿 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [22] 中华人民共和国国家标准. 蜂蜜中羟甲基糠醛含量的测定方法 [S]. 2003.
- [23] 中华人民共和国农业行业标准. 鹿茸中氨基酸的测定 [S]. 2008.
- [24] 张 嵩, 李 峰. 不同规格鹿茸商品药材中氨基酸含量分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 32(12): 1919-1923.
- [25] 王燕华, 张秀莲, 赵 卉, 等. 不同加工方式对鹿茸中粗蛋白与水解氨基酸量的影响研究 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3085-3091.
- [26] 罗益远, 刘娟秀, 侯 娅, 等. 何首乌不同产地及商品药材中无机元素的 ICP-MS 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1056-1064.
- [27] Ramonaityte D T, Keriene M, Andams A, *et al.* The interaction of metal ions with Maillard reaction products in a lactose-glycine model system [J]. *Food Res Int*, 2009, 42(3): 331-336.
- [28] 中国药典 [S]. 二部. 2015.
- [29] 刘潇潇, 杨立伟, 于江泳, 等. HPLC 法测定参芪扶正注射液中 5-羟甲基糠醛的含量及其来源的初步探讨 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 639-642.