

余甘子药材表面白霜的化学成分及“析霜”科学内涵初探

谭庆尧¹, 黄浩洲¹, 林俊芝², 仇敏¹, 李莞¹, 谭鹏³, 樊三虎⁴, 韩丽^{1*}, 张定堃^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源省部共建国家重点实验室, 四川 成都 611137
2. 成都中医药大学附属医院, 代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室, 四川 成都 610072
3. 四川省中医药科学院, 国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室, 四川 成都 610041
4. 成都市三勒浆药业集团, 四川 成都 610000

摘要: 目的 研究余甘子 *Phyllanthus emblica* 药材表面白霜的化学组成及析霜对其生津作用的影响, 以期对余甘子“析霜者佳”的传统认知提供科学依据。方法 收集余甘子药材表面形成的白霜, 采用扫描电镜、能谱仪、傅里叶变换红外光谱仪和 UPLC-Q-TOF-MS 分析余甘子药材在贮藏过程中表面形成的白霜的化学成分; 采用电子舌 (E-tongue) 结合志愿者的感官评定, 研究药材表面析霜前后生津作用的变化; 采用质谱成像技术对余甘子中化合物的含量和空间分布信息进行研究, 分析其“析霜”代谢物的可能变化规律。结果 扫描电镜观察表明余甘子药材表面析出白霜主要由细小的团簇晶体结构组成, 能谱仪分析表明白霜主要为有机物组成, 主要含有 R-COOH、C-C、C-O 等官能团; UPLC-Q-TOF-MS 研究发现, 白霜的主要成分是小分子有机酸和多酚, 如粘酸、柠檬酸、DL-(+)-苹果酸和没食子酸等。感官评价及 E-tongue 研究发现, 表面析霜后, 余甘子药材滤液的酸味、涩味和苦味均不同程度增加, 生津作用更加明显; 质谱成像结果发现随着余甘子的干燥, 其内部的 DL-(+)-苹果酸、没食子酸等成分会发生表面迁移。结论 余甘子药材表面白霜主要是小分子有机酸及多酚类物质, “析霜”后酸味、涩味和苦味有所增强, 有效成分含量增加, 生津与健胃消食作用增强。

关键词: 余甘子; 成分变化; 析霜; 感官评价; 粘酸; 柠檬酸; DL-(+)-苹果酸; 没食子酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)11-3487-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.11.027

Preliminary study on chemical composition from surface frost of fruits of *Phyllanthus emblica* and scientific connotation of “frost precipitation”

TAN Qing-chu¹, HUANG Hao-zhou¹, LIN Jun-zhi², QIU Min¹, LI Wan¹, TAN Peng³, FAN San-hu⁴, HAN Li¹, ZHANG Ding-kun¹

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. TCM Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China
3. Key Laboratory of Biological Evaluation of TCM Quality of the State Administration of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China
4. Sanajon Pharmaceutical Group, Chengdu 610000, China

Abstract: Objective To study the chemical composition from the white frost on the surface of the fruits of *Phyllanthus emblica* and the effect of frost precipitation on its fluid production, in order to provide a scientific basis for the traditional cognition of “frost precipitation is better” of *P. emblica*. **Methods** The white frost formed on the surface of the fruits of *P. emblica* was collected. The chemical components of the white frost formed on the surface of the fruits of *P. emblica* during storage were analyzed by scanning electron microscope (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS), fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and

收稿日期: 2021-10-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973493); 四川省重点研发项目 (2021YFN0100); 三勒浆药业-成都中医药大学联合实验室项目 (2019-YF04-00086-JH); 四川省中医药管理局项目 (2021MS018)

作者简介: 谭庆尧, 男, 在读硕士, 从事中药制剂新技术研究。E-mail: 2842054278@qq.com

*通信作者: 张定堃, 男, 副教授, 从事中药制剂新技术与品质评价研究。E-mail: zhangdingkun@cduetcm.edu.cn

韩丽, 女, 教授, 从事中药制剂新技术研究。E-mail: hanliyix@163.com

UPLC-Q-TOF-MS; Electronic tongue (E-tongue) combined with sensory evaluation of volunteers was used to study the changes of fluid generating effect before and after frost precipitation on the surface of medicinal materials; The content and spatial distribution of compounds in *P. emblica* were studied by mass spectrometry imaging technology, and the possible changes of "frost evolution" metabolites were analyzed. **Results** SEM observation showed that the white frost precipitated on the surface of the fruits of *P. emblica* was mainly composed of fine cluster crystal structure. EDS analysis showed that the frost was mainly composed of organic matter, mainly containing R-COOH, C-C, C-O and other functional groups; UPLC-Q-TOF-MS study found that the main components of white cream were small molecular organic acids and polyphenols, such as mucic acid, citric acid, DL-(+) malic acid and gallic acid. Sensory evaluation and E-tongue study found that after surface frosting, the acidity, astringency and bitterness of the filtrate of the fruits of *P. emblica* increased in varying degrees, and the effect of fluid generation was more obvious; Mass spectrometry imaging results showed that the surface migration of malic acid, gallic acid and other components occurred with the drying of *P. emblica*. **Conclusion** The white frost on the surface of the fruits of *P. emblica* is mainly small molecular organic acids and polyphenols. After "frost separation", the acidity, astringency and bitterness are enhanced, the content of effective components is increased, and the effects of promoting fluid, stomach and digestion are enhanced.

Key words: *Phyllanthus emblica* L.; composition change; frosting; sensory evaluation; mucic acid; citric acid; DL-(+) malic acid; gallic acid

余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 是大戟科叶下珠属热带、亚热带落叶小乔木, 其果实是中药余甘子, 俗名滇橄榄、油甘子、山油甘、庵摩勒等, 常见于中国南部、印度和部分非洲国家^[1]。余甘子风味独特、营养丰富、药用价值与保健功能显著, 在利咽、降糖、调节血脂代谢、预防牙龈炎等方面作用突出^[2-3], 含有丰富的维生素 C, 被称为“维 C 之王”, 此外, 可水解鞣质是余甘子中的主要酚类物质^[4]。在中国西北部少数民族聚居区喜食牛羊肉, 常将余甘子泡茶饮用, 用以消渴解腻; 泰国, 印度僧侣在日常生活中也经常含服余甘子, 用于生津止渴^[5]。目前, 余甘子在全球 17 个国家的传统医学系统中使用, 特别是中国藏医学和印度阿育吠陀医学^[6], 被联合国卫生组织指定为全世界推广种植的 3 种保健植物之一^[7]。

“析霜”是指某些药材长期暴露在空气中时可在其表面析出化学成分晶状物质的一种特殊现象^[8]。从历史源流来看, 五味子的“霜”发现最早, 首载于南北朝时期的《雷公炮炙论》^[9]。柿霜在宋代被《本草图经》中记载为“白柿”, 柿饼以表面挂白霜者品质佳, 具有清热生津止渴的功效^[10]。《药材学》记载不同产地的牡丹皮中, 以铜陵凤凰山所产的凤丹皮所具亮星最多, 质量亦最佳^[11], 可见对某些药材而言, “析霜”后其品质更优。余甘子富含有多酚类成分, 其药材在贮藏过程中也会发生类似析霜现象, 药材在干燥阴凉处存放 2~3 年后表面会析出一层白霜 (图 1)。药材流通从业者认为, 析霜后的余甘子药材品质更优, 有“析霜者佳”的说法。部分有经验的药工会依据余甘子表面析霜的程度来判断



图 1 余甘子药材图

Fig.1 Picture of *Phyllanthus emblica*

余甘子的品质, 但尚未发现相关研究报道。目前, 对于余甘子药材表面的白霜构成并不明确, 其“析霜”现象与药材品质的关联尚无科学依据。

针对上述问题, 本研究主要采用扫描电镜 (SEM) 及能谱仪 (EDS) 观察余甘子表面白霜的微观结构及元素组成, 采用傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR) 对余甘子表面白霜结构官能团进行鉴别, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 对霜中主要化学成分进行定性鉴别, 采用电子舌 (E-tongue) 及志愿者口尝法对析霜后余甘子味道及生津作用评价, 采用质谱成像技术对余甘子中化合物的含量和空间分布信息进行研究, 分析其“析霜”的代谢物可能变化规律。旨在揭示余甘子表面白霜的化学成分, 探讨白霜形成与余甘子品质的内在关联, 进一步解释余甘子传统认知“析霜者佳”的科学内涵, 为余甘子品质评价提供参考。

1. 材料

FEI Insepect F50 型扫描电镜 (美国赛默飞公司), EDAX Octane Super 能谱仪 (美国依达克斯有限公司), Vanquish 型超高效液相色谱联用

Q-Exactive 型四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国赛默飞公司), SA402B 系列智能味觉分析系统(日本 INSENT 公司), 傅里叶变换红外光谱仪(赛默飞 Nicolet), SYNAPT XS 高分辨率飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司)。BSA224S 型万分之一分析天平和 BT25S 型十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司), Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司), 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

余甘子药材经成都中医药大学药学院许润春副教授鉴定为大戟科植物余甘子 *P. emblica* L. 的干燥成熟果实, 样品信息见表 1。柠檬酸、粘酸、DL-(+)-苹果酸、没食子酸对照品(成都克洛玛生物科技有限公司, 批号 CHB210116、CHB210105、CHB210228、CHB2101131, 质量分数 \geq 98%), 鞣花酸和柯里拉京对照品(四川维克奇生物科技有限公司, 批号 wkq21010403、whq21040907, 质量分数 \geq 98%), 水为超纯水, 甲醇、甲酸为色谱级, 溴化钾, 其他试剂均为分析纯。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

样品编号	批号	产地	采收时间	备注
S1	180301	云南	2018-09	析霜
S2	180401	四川	2018-07	析霜
S3	181209	广西	2018-05	析霜
S4	180301	云南	2018-09	未析霜
S5	180401	四川	2018-07	未析霜
S6	181209	广西	2018-05	未析霜

2 方法

2.1 白霜的收集

选取各批次中表面析霜的余甘子药材, 用硬毛刷小心刷下药材表面白霜, 并按照各批次编号。

2.2 SEM-EDS 检测

取干燥余甘子表面白霜用导电胶粘贴于载物台上, 把样品粉末均匀分布于导电胶表面, 采用真空镀膜法在 4 Pa 以下高真空、电流 20 mA 条件下喷镀铂金属 2 min 使样品导电。仪器的加速电压为 15.0 kV, 工作距离为 10.3 mm。用 SEM 在 5000、10 000 倍下观察样品。

2.3 FT-IR 分析

取溴化钾于玛瑙研钵中, 在红外烤灯下研磨成细粉; 转移至压片模具中, 将模具置于压片机中压

实, 得半透明薄片, 即溴化钾空白片。取 3 份余甘子霜 S1、S2、S3 样品粉末(过六号筛)适量, 与溴化钾在玛瑙研钵中研磨, 压片制成样品片, 先将溴化钾空白片置于红外光谱仪中, 扫描, 得空白背景片的一维红外光谱。再将样品片置于红外光谱仪中, 扫描得到样品片的一维红外光谱。

2.4 UPLC-Q-TOF-MS 主要色谱峰的分析及鉴定

2.4.1 色谱条件 Thermo Scientific Accucore C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 2.6 μ m), 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~1 min, 2%B; 1~2 min, 2%~5%B; 2~4 min, 5%~7%B; 4~6 min, 7%~24%B; 6~10 min, 24%~42%B; 10~12 min, 42%~54%B; 12~15 min, 54%~76%B; 15~18 min, 76%~100%B), 体积流量为 0.2 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 进样量为 5 μ L。质谱条件: 采用加热电喷雾离子源(HESI), 正、负离子模式检测, 喷雾电压为 3.0 kV, 离子源温度为 350 $^{\circ}$ C, 鞘气体积流量为 35 arb, 辅助气体积流量为 10 arb, 离子传输管温度为 320 $^{\circ}$ C, 离子扫描范围为 m/z 100~1500^[12]。

2.4.2 供试品溶液的制备 按“2.1”项收集余甘子药材表面白霜, 精确称量 0.1 g 白霜置于量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 称定质量, 超声 30 min 使溶解, 静置冷却至室温, 加甲醇补足减失的质量, 用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取滤液作为供试品溶液。

2.4.3 对照品溶液的制备 准确称取各对照品适量, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 混匀, 配制含柠檬酸 0.235 mg/mL、粘酸 0.352 mg/mL、DL-(+)-苹果酸 0.245 mg/mL、没食子酸 0.225 mg/mL、柯里拉京 0.221 mg/mL、鞣花酸 0.231 mg/mL 的混合对照溶液, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用, 进样前用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过。

2.4.4 数据分析 使用 Xcalibur 3.0 软件进行质谱数据处理, 将二级碎片实测谱图与对照品、相关文献, 及在线数据库 [Mzcloud 网络数据库, 中药成分数据库 OTCML, MassBank, 人类代谢组数据库 (human metabolome database, HMDB)] 进一步分析和鉴定。

2.5 析霜余甘子与未析霜余甘子 E-tongue 分析

2.5.1 供试品的制备 取 3 个批次表面析霜余甘子与未析霜余甘子, 各称量 10 g, 分别用 150 mL 温水冲泡 20 s, 将余甘子捞出, 取滤液为供试品溶液。析霜余甘子溶液标号为 S1~S3, 未析霜余甘子溶液标号为 S4~S6。

2.5.2 正、负极清洗液及参比液的制备 ①正极清洗液:准确称量 7.46 g 氯化钾,用 500 mL 蒸馏水搅拌溶解,然后准确加入 300 mL 无水乙醇溶液,边搅拌边加入准确称量的 0.56 g 氢氧化钾,溶解完毕后,转移到 1000 mL 的量瓶,定容。②负极清洗液:准确量取 300 mL 无水乙醇,与 500 mL 蒸馏水震荡混合,然后加入 8.3 mL 的浓盐酸,搅拌混合后转移到 1000 mL 的量瓶,定容。③参比溶液:最后精密称定 2.236 5 g 氯化钾和 0.045 g 酒石酸,用 500 mL 蒸馏水溶解,转移到 1000 mL 量瓶中,定容。

2.5.3 E-tongue 测试方法 开始时正、负极分别放入正、负极清洗液中清洗 90 s,接着用参比液清洗 2 次,各 120 s,传感器在参比液中平衡归零,达到平衡条件后,开始测试,测试时间 30 s;在 2 组参比液中分别短暂清洗 3 s,传感器插入新的参比液中测试余味 30 s,循环测试 4 次,去掉第 1 循环,取后 3 次平均数据作为测试结果,每次清洗、平衡和测试余味的液体均分布在不同样品杯中^[13]。

2.5.4 样品测定 将每个样品液倒入电子舌测试专用塑料小杯中,每杯 25 mL,每个样品倒 2 杯,按“2.5.3”项方法测试,记录传感器涩味传感器(AE1)、鲜味传感器(AAE)、咸味传感器(CTO)、苦味传感器(COO)、酸味传感器(CAO)、甜味传感器(GL1)的响应值,收集 3 次平行测定数据,求得平均值。

2.6 析霜与未析霜余甘子溶液 pH 测定及志愿者风味评价

2.6.1 pH 测定 取 3 个批次表面析霜余甘子与未析霜余甘子,各称量 10 g,分别用 150 mL 温水冲泡 20 s,将余甘子捞出,取滤液为供试品溶液。通过 pH 计分别对每个样品测定溶液 pH 值 3 次取平均值,析霜余甘子溶液标号为 S1~S3,未析霜余甘子溶液标号为 S4~S6。

2.6.2 志愿者的筛选和训练 感官评定依据国家标准(GB/T 15038-2006)和 ISO 4121 进行筛选志愿者条件如下:年龄 22~28 岁,无严重过敏、遗传病史、无胆囊炎、无不良嗜好、无近期病史。制备 0.5、0.8、1.0 mg/mL 的鞣酸溶液,规定涩味分值为 2、5、10;制备 0.5、1.0、2.0 mg/mL 的柠檬酸溶液,规定酸味分值为 2、5、10;制备 0.1、0.2、0.3 mg/mL 的硫酸奎宁溶液,规定苦味分值为 2、5、10。分别定义为轻微、明显、剧烈,告知并要求志愿者记住不同样品的 3 个质量浓度梯度所对应风味分值^[14]。

2.6.3 供试品的制备 取 3 个批次表面析霜余甘子

与未析霜余甘子,各称量 10 g,分别用 150 mL 温水冲泡 20 s,将余甘子捞出,取滤液为供试品溶液。析霜余甘子溶液标号为 S1~S3,未析霜余甘子溶液标号为 S4~S6。

2.6.4 志愿者感官试验 选择 10 名训练合格的志愿者进行志愿者感官试验,试验前应具备以下条件:味觉敏感,1 d 内不饮酒、不吸烟,2 h 内不饮食,可自由饮用水。在每次品尝之前,小组成员用纯净水漱口,以舌背表面和舌缘为主要感受部位,每份样品口含 10 s 后吐出,分别记录每个样品 5、20、40、60、80、100、120、140 s 各个时间段在口腔中感知强度,然后对每个样本的每个属性的感知强度进行评分,每份样品评定结束后间隔 10 min 再进行下一份样品的评定。对于每个样品,感官评估一式 3 份进行,最后将每个时间段的评分相加得到这个样品的感知强度,再将结果取平均值^[15]。

2.7 质谱成像分析

2.7.1 样品制备 将余甘子切成均匀薄片,并在 -80 °C 冰箱中冷冻。取出后,覆盖并压缩载玻片,然后冷冻干燥,备用。

2.7.2 质谱条件及数据处理 负离子扫描,扫描范围为 m/z 100~1500,空间分辨率为 120 μm ,喷雾电压为 4.5 kV;采样锥电压为 40 V;喷雾器(氮气压力)为 0.5 MPa;溶剂为甲基甲酸(1000:1),体积流量为 2 $\mu\text{L}/\text{min}$;喷雾器入射角为 70°;收集器角度为 10°;离子源温度为 150 °C;采样电压为 -40 V。数据采集软件为 Masslynx V 4.2,数据处理软件为 Masslynx HDIV 1.5 软件。

3 结果

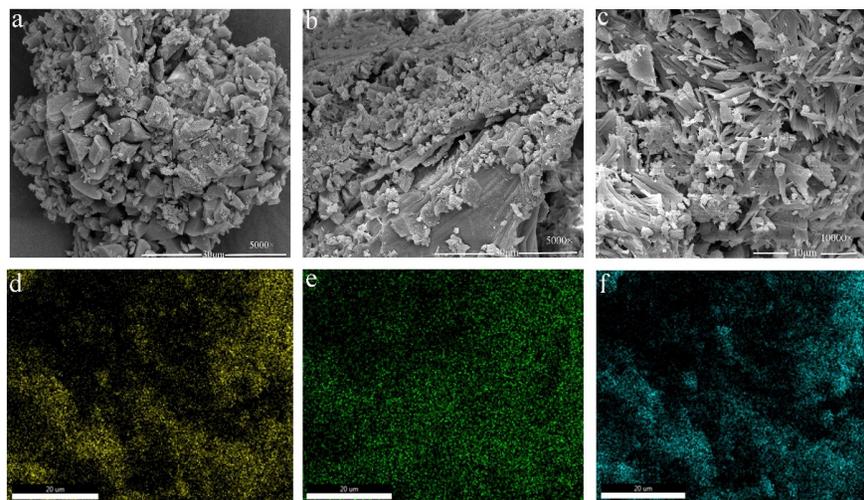
3.1 SEM 和 EDS 分析结果

3.1.1 SEM 形貌观察 通过 SEM 在 ($\times 5000$, $\times 10\ 000$) 下检查样品,结果如图 2 所示。能够观察到白霜的晶体结构是由多个不规则的小团簇晶体堆积而成 ($\times 5000$),小团簇晶体的直径为 2~3 μm ,在 10 000 倍下药材表面白霜结构更加明显。

3.1.2 EDS 元素测定 通过 SEM 在 $\times 5000$ 放大倍数下获得图像,结合 EDS 对白霜进行表面元素分析,元素分析结果如表 2 所示,表面白霜主要由 C、O、K 元素组成,C 元素相对含量 36.87%,O 元素相对含量 55.54%,K 元素相对含量为 7.59%。

3.2 FT-IR 分析结果

3 个批次的余甘子药材表面白霜的红外光谱相似(图 3),在 3 424.27~3 444.47、1 724.53~1 725.18、



a-果霜结构 (×5000) b-果霜结构 (×5000) c-果霜结构 (×10 000) d-C 元素分布图 e-O 元素分布图 f-K 元素分布图
a-×5000 SEM of white frostings for structure b-×5000 SEM of white frostings for structure c-×10 000 SEM of white frostings for structure
d-C-element distribution map e-O-elemental distribution map f-K-element distribution map

图 2 果霜微观结构及元素组成图

Fig. 2 Microstructure and element composition of fruit frost

表 2 样品中各元素的质量分数

Table 2 Quality scores of each element from sample

元素	质量百分比/%	原子百分比/%	静强度	原子强度
C	36.87	45.58	405.77	0.209 7
O	55.54	51.54	550.44	0.114 6
K	7.59	2.88	260.28	0.065 6

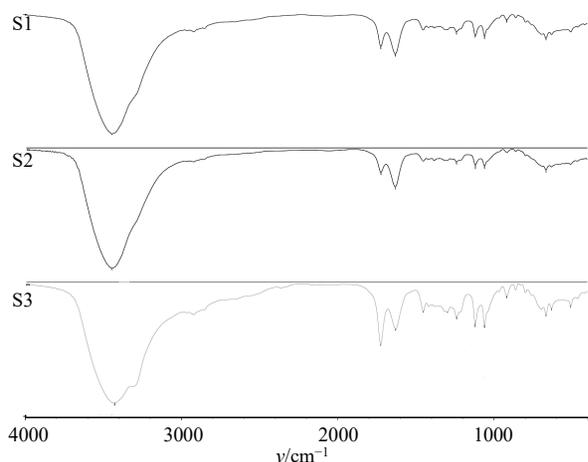


图 3 3 批样品 FT-IR 光谱图

Fig. 3 FT-IR spectra of three samples

1 628.98~1 632.21、1 452.85、1 239.34、1 060.64、918.13、667.50 cm^{-1} 处检查到主要吸收峰度，其中 3 424.27~3 444.47 cm^{-1} 可能是 -OH 拉伸振动吸收

峰，1724~1725 cm^{-1} 为 R-COOH 振动吸收峰，1628~1632 cm^{-1} 为 C=O 或 C=C 拉伸振动吸收峰，1 452.85 cm^{-1} 是 C-C 或 C=C 骨架振动吸收峰，1 060.64 cm^{-1} 可能是 C-O 伸振动吸收峰，918.13 cm^{-1} 可能是 OH 弯（面内）振动吸收峰，667.50 cm^{-1} 可能是 NH_2 振动吸收峰。

3.3 UPLC-Q-TOF-MS 分析结果

从余甘子表面白霜中鉴定出 12 个化合物，详细信息如表 3 所示。由表 3 信息可知，余甘子表面白霜的化学组成主要是一些小分子的有机酸类。

3.3.1 有机酸类化合物 在白霜中主要发现 3 种有机酸成分，主要有粘酸、柠檬酸、DL-(+)-苹果酸，这些有机小分子酸类，主要来源于植物细胞呼吸代谢中间体及产物，以化合物 1 粘酸为例， $t_R=0.52$ min，母离子峰 m/z 209.029 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ，二级离子碎片 m/z 191.020 1， m/z 165.038 8，相对保留时间和 m/z 比通常与对照品粘酸一致，通过比较确定该化合物为粘酸。化合物 6， $t_R=0.58$ min，母离子峰 m/z 191.019 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ，二级离子碎片 m/z 85.028 5， m/z 102.947 9，相对保留时间和 m/z 比通常与对照品柠檬酸一致，通过比较确定该化合物为柠檬酸。化合物 7， $t_R=0.58$ min，母离子峰 m/z 133.013 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ，二级离子碎片 m/z 115.002 8， m/z 71.012 8，相对保留时间和 m/z 比与对照品 DL-(+)-苹果酸保持一致。

3.3.2 鞣质类成分 余甘子中含有大量的鞣质类化

表3 余甘子药材表面白霜化学成分分析

Table 3 Analysis of white frosting chemical composition on surface of roots of *P. emblica*

序号	t_R /min	名称	分子式	理论值	实际值	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片离子
1	0.52	粘酸	$C_6H_{10}O_8$	209.030 2	209.029 9	$[M-H]^-$	-1.4 191.020 1, 165.038 8
2	0.55	<i>D</i> -脯氨酸	$C_5H_9NO_2$	116.070 6	116.070 8	$[M+H]^+$	1.7 70.055 7
3	0.56	没食子酸	$C_7H_6O_5$	171.028 7	171.028 7	$[M+H]^+$	0 127.039 0, 81.034 0
4	0.57	没食子酸甲酯	$C_8H_8O_5$	185.044 4	185.044 4	$[M+H]^+$	0 153.018 2, 126.031 3
5	0.55	粘酸-2- <i>O</i> -没食子酸酯	$C_{13}H_{14}O_{12}$	363.041 2	363.041 3	$[M-H]^-$	0.2 85.028 6, 209.030 0
6	0.58	柠檬酸	$C_6H_8O_7$	191.019 7	191.019 2	$[M-H]^-$	-2.6 85.028 5, 102.947 9
7	0.58	<i>DL</i> -(+)-苹果酸	$C_4H_6O_5$	133.014 2	133.013 5	$[M-H]^-$	-5.2 115.002 8, 71.012 8
8	8.26	二没食子酰葡萄糖	$C_{20}H_{20}O_{14}$	483.078 0	483.078 6	$[M-H]^-$	1.2 169.013 7, 241.046 2
9	14.60	柯里拉京	$C_{27}H_{22}O_{18}$	633.073 3	633.074 2	$[M-H]^-$	1.4 300.999 2
10	15.80	鞣花酸	$C_{14}H_6O_8$	300.998 9	300.999 3	$[M-H]^-$	1.3 257.008 0
11	16.50	1-(carboxymethyl) cyclohexanecarboxylic acid	$C_9H_{14}O_4$	187.096 4	187.096 5	$[M-H]^-$	0.5 141.091 4, 185.081 5
12	17.20	槲皮素	$C_{15}H_{10}O_7$	303.049 9	303.050 1	$[M+H]^+$	0.6 153.018 3

合物,分为可水解鞣质和缩合鞣质,可水解鞣质会进一步分解为没食子鞣质和鞣花鞣质,在余甘子药材表面白霜中鉴定出2个鞣质,化合物**8**, $t_R=8.26$ min,母峰离子 m/z 483.078 6 $[M-H]^-$,二级碎片离子 m/z 169.013 7、241.046 2,结合数据库推断为二没食子酰葡萄糖。化合物**9**, $t_R=14.6$ min,母峰离子 m/z 633.074 2 $[M-H]^-$,二级碎片离子 m/z 300.999 2,相对保留时间和 m/z 比与对照品柯里拉京一致。

3.3.3 酚酸类化合物 余甘子中酚酸类成分主要有没食子酸、没食子酸酯等,在余甘子药材表面白霜中鉴定出4个酚酸类成分。化合物**3**(没食子酸), $t_R=0.56$ min,母峰离子 m/z 171.028 7 $[M+H]^+$,二级碎片离子 m/z 127.039 0、81.034 0,相对保留时间和 m/z 比与对照品没食子酸一致。化合物**4**(没食子酸甲酯), $t_R=0.57$ min,母峰离子 m/z 185.044 4 $[M+H]^+$,二级碎片离子 153.018 2、126.031 3。化合物**5**(粘酸-2-*O*-没食子酸酯), $t_R=0.55$ min,母

离子峰 m/z 363.041 3 $[M-H]^+$,二级碎片离子 m/z 85.028 6、209.030 0,结合数据库推断为粘酸-2-*O*-没食子酸酯。化合物**10**(鞣花酸), $t_R=15.8$ min,母峰离子 m/z 300.999 3 $[M-H]^-$,二级碎片离子 m/z 257.008 0,相对保留时间和 m/z 比与对照品鞣花酸一致。

3.4 E-tongue 分析结果

E-tongue 通过传感器阵列模拟人类的味觉感知,从而提供接近人类感官的味觉结果^[10]。利用 α -Astree 感知系统分析对析霜及未析霜样品的口感进行评价,测定结果见表4,通过 E-tongue 系统分析可以发现析霜样品的酸味变化最大,明显增强,涩味和苦味也稍有增强,而余味及丰富度、咸味没有明显变化(图4)。E-tongue 分析说明余甘子析霜对余甘子风味影响变化明显,主要影响在余甘子酸味及涩味。

3.5 pH 测定及志愿者风味评价结果

3.5.1 pH 测定结果 分别测定了析霜余甘子药材

表4 不同稀释比下的味觉信息值 ($n=3$)Table 4 Taste information values of different dilution ratios ($n=3$)

序号	酸味	苦味	涩味	回味-B	回味-A	鲜味	丰富度	咸味
S1	-2.29	1.48	4.87	0.72	6.81	4.29	6.85	-1.91
S2	-1.75	1.23	4.00	0.61	6.29	4.00	6.95	-1.83
S3	-1.50	1.05	3.20	0.47	5.49	4.40	6.97	-1.26
S4	-22.31	6.58	4.97	0.00	2.25	8.92	5.93	-1.13
S5	-19.87	7.52	4.71	-0.15	1.38	8.65	6.01	-1.98
S6	-12.59	5.78	4.45	0.11	2.78	7.08	6.42	-2.84

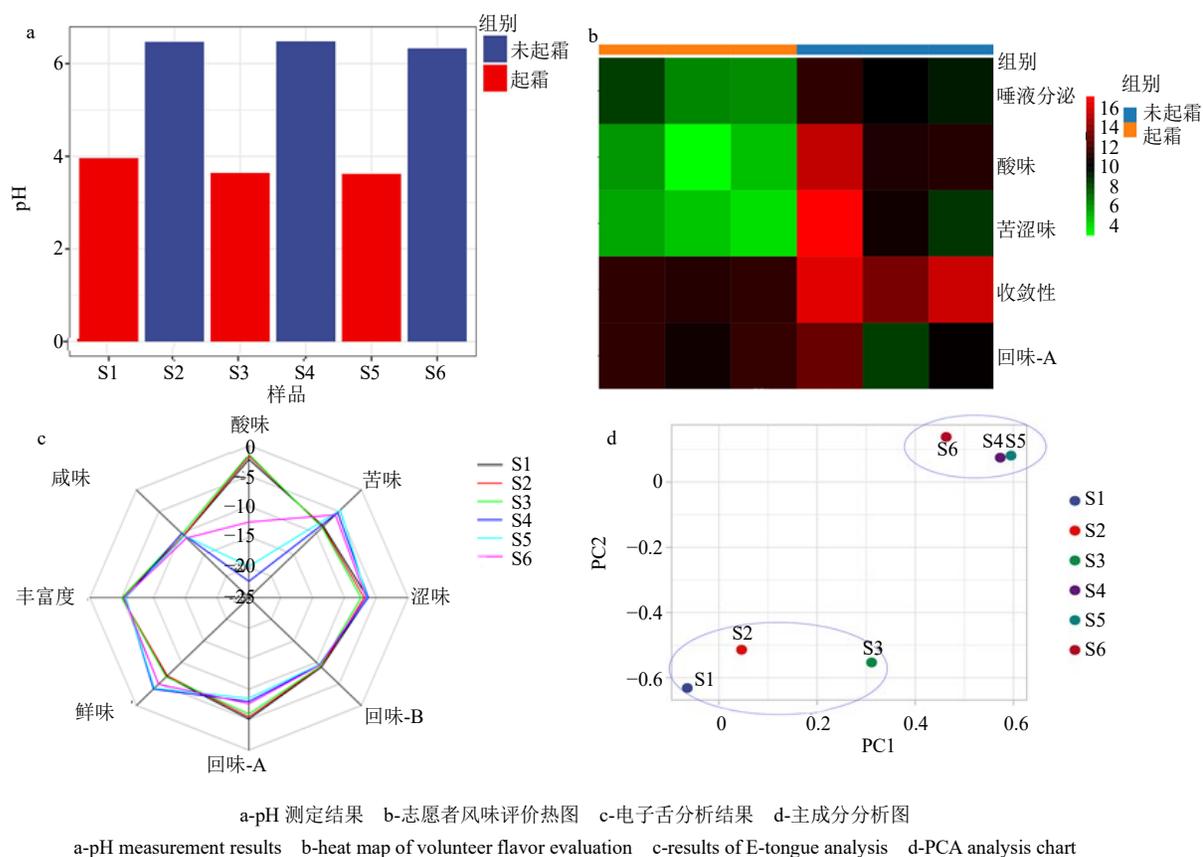


图4 余甘子味觉分析图

Fig. 4 Taste analysis of *P. emblica*

与未析霜余甘子药材的滤液 pH 值，表面析霜的余甘子药材滤液 pH 值低于未析霜药材的 pH 值。表面析霜的余甘子药材滤液 pH 值主要集中在 3.62~3.96，未析霜的余甘子药材滤液 pH 值主要集中在 6.31~6.48（图 4），即析霜余甘子药材的滤液酸性更强。

3.5.2 志愿者口尝实验结果 将口尝试验结果进行处理，先对志愿者评分做 Spearman 系数检验，将实验结果中达到剔除水平的数据进行循环剔除。按照“2.6.4”项的方法对余甘子风味评分进行统计，统计结果见表 5。利用 Hiplot 软件对志愿者评分进行热图分析。红、黑、绿代表高、中、低 3 个丰度，丰度越高代表感官感知能力越强。同一批次的余甘子药材，析霜后酸味明显高于未析霜者，涩味也是类似规律，析霜后苦味也略有增强，而生津作用在析霜后也明显增强（图 4）。采用 SIMCA-P 软件（version 14.0, Umea, 瑞典）对供试品进行主成分分析，选择集中法（Ctr）作为标度法，结果表明，主成分分析（principal component analysis, PCA）能充分反映表面析霜余甘子药材和表面无霜余甘子

表 5 志愿者味觉评价 (n = 3)

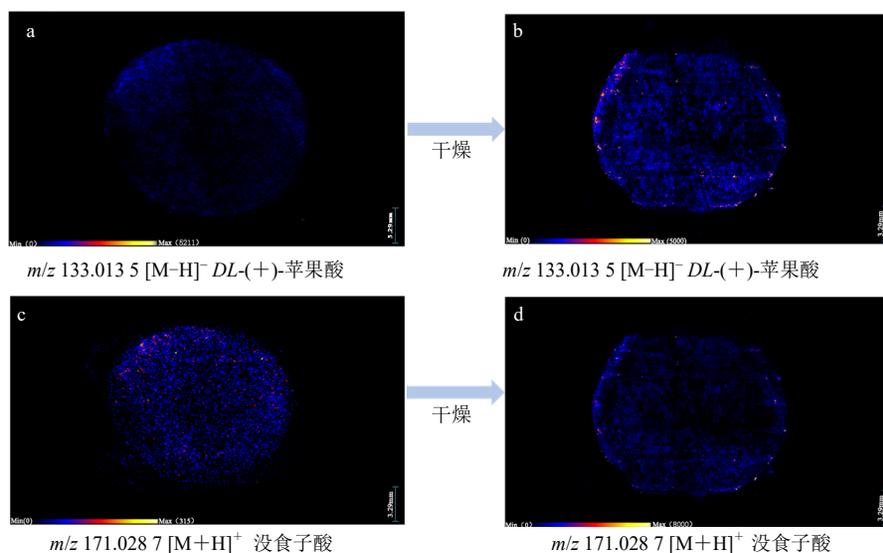
Table 5 Evaluation of artificial taste (n = 3)

序号	酸味	涩味	苦味	回味-A	唾液分泌
S1	6.83	9.79	9.90	12.04	7.81
S2	11.20	13.82	10.84	8.30	10.13
S3	11.43	16.24	8.60	10.48	9.40
S4	2.54	11.44	4.33	10.70	6.19
S5	4.50	11.71	3.55	11.92	5.94
S6	5.72	11.70	5.24	11.73	8.25

药材的基本特征和主要信息，PCA 分析后每批样品的得分图如图 4 所示。评分图显示，表面析霜的余甘子药材与表面未析霜的余甘子药材有明显区别，并且表面析霜的余甘子药材更加分散。

3.6 质谱成像结果

比较干燥前后的成分迁移（图 5），可以发现，干燥前 DL-(+)-苹果酸 (m/z 133.013 5 [M-H]⁻)，没食子酸 (m/z 171.028 7 [M+H]⁺) 在余甘子中心分布较多，在表层含量较低，主要集中在余甘子内部。干燥过程中，苹果酸与没食子酸成分随水分的散失，向余甘子表层发生迁移，这为储存过程的析



a-干燥前 *DL*-(+)-苹果酸质谱成像图 b-干燥后 *DL*-(+)-苹果酸质谱成像图 c-干燥前没食子酸质谱成像图 d-干燥后没食子酸质谱成像图
a-Mass spectrogram of *DL*-(+)-malic acid before drying b-mass spectrogram of *DL*-(+)-malic acid after drying c-mass spectrogram of gallic acid before drying d-mass spectrogram of gallic acid after drying

图5 成分迁移分析图

Fig. 5 Component migration analysis diagram

霜提供了物质条件。

4 讨论

研究发现,柠檬酸、苹果酸等小分子有机酸是余甘子药材表面白霜的主要成分,其形成过程可能与鲜果干燥过程中的持续呼吸代谢密切相关^[16]。在果实或果实类药材中,有机酸的组成和含量通常随果实发育而变化,如苹果^[17]、柑橘^[18]、柠檬^[19]等。有机酸通常在果实发育的早期积累,在果实成熟时作为呼吸底物,成熟果实中有机酸的最终浓度取决于有机酸生物合成、降解和液泡贮藏的平衡;在果实采收干燥阶段,果实内细胞尚存活,但表皮细胞由于直接受到干热胁迫作用,其呼吸和代谢作用增强,通过苯丙烷生物途径大量合成黄酮类、鞣质类和有机酸类等次生代谢产物,该过程导致其内部的活性次生代谢物含量增加^[20]。而在贮藏过程中,果实(药材)表皮细胞已经死亡,大量活性成分从表皮细胞中析出,同时随着表面微生物对鞣质类成分的水解转化等作用^[21],药材中的代谢物会发生迁移和转化,逐渐析出到余甘子药材表面上。因此,余甘子干燥阶段受干热胁迫作用表面成分含量逐渐增加,而在贮藏阶段由于微生物和细胞内成分迁移作用,霜类成分如没食子酸、柠檬酸等发生进一步富集作用,从而逐渐形成“析霜”现象。此外,在志愿者口尝实验中发现,含服表面析霜样品时,唾液分

泌次数及分泌量强于未析霜样品,生津止渴作用增强。而丰富的有机酸已被证明对人类健康有益^[22]。例如,柠檬酸、苹果酸等代谢后碱化可以预防低水平代谢性酸中毒。除了碱化作用外,有机酸还可以调节大肠中短链脂肪酸的生成,并且可能通过降低结肠 pH 值增加矿物质的吸收,特别是钙和镁离子的吸收^[23]。同时,对于不同种类的药材而言,“析霜”的成分具有一定差异,如厚朴经姜炮制析霜后,厚朴酚及和厚朴酚含量增加^[24-25]。综上所述,余甘子“析霜者佳”的科学内涵主要体现为以下 2 点:一是干热胁迫导致的表面细胞次生代谢物含量增加,如《中国药典》指标性成分没食子酸等在贮藏阶段逐步析出形成霜类成分,析霜代表有效成分含量的增加;二是霜内的有机酸成分使得余甘子生津作用及健胃消食作用增强,有利于其药效发挥。

本实验研究了余甘子表面白霜的化学本质及其析霜的可能途径,初步揭示了余甘子“析霜者佳”科学内涵,为余甘子商品规格划分和品质评价及中药炮制领域析霜类药材的品质与机理等研究提供一定的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄浩洲,冉飞,谭庆台,等.药食同源品种余甘子综合开发利用策略与思路[J].中国中药杂志,2021,46(5):

- 1034-1042.
- [2] Huang H Z, Qiu M, Lin J Z, *et al.* Potential effect of tropical fruits *Phyllanthus emblica* L. for the prevention and management of type 2 diabetic complications: A systematic review of recent advances [J]. *Eur J Nutr*, 2021, 60(7): 3525-3542.
- [3] 黄浩洲, 陈敬财, 张定堃, 等. 余甘子研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5533-5544.
- [4] Avula B, Wang Y H, Wang M, *et al.* Simultaneous determination and characterization of tannins and triterpene saponins from the fruits of various species of *Terminalia* and *Phyllanthus Emblica* using a UHPLC-UV-MS method: Application to triphala [J]. *Planta Med*, 2013, 79(2): 181-188.
- [5] Yang B R, Liu P Z. Composition and biological activities of hydrolyzable tannins of fruits of *Phyllanthus emblica* [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(3): 529-541.
- [6] Zhao T J, Sun Q, Marques M, *et al.* Anticancer properties of *Phyllanthus emblica* (Indian gooseberry) [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 950890.
- [7] Variya B C, Bakrania A K, Patel S S. *Emblica officinalis* (Amla): A review for its phytochemistry, ethnomedicinal uses and medicinal potentials with respect to molecular mechanisms [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 180-200.
- [8] 于大庆, 查良平, 彭华胜. “析霜”类药材的种类及其历史源流 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(12): 2624-2627.
- [9] 尚志均集. 雷公炮灸论 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1991: 40.
- [10] (明)李时珍. 本草纲目: 校点本 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1239.
- [11] 南京药学院药材教研组集体. 药材学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1960: 328.
- [12] 罗传红, 黄胜杰, 胡琪琪, 等. 去核对余甘子药材质量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 147-156.
- [13] 代悦, 于定荣, 刘颖, 等. 基于智能感官分析技术探讨古代经典方法炮制过程中苦参的气味和味道变化规律 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(24): 6410-6416.
- [14] Kobayashi Y, Habara M, Ikezaki H, *et al.* Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores [J]. *Sensors (Basel)*, 2010, 10(4): 3411-3443.
- [15] 李潘, 韩雪, 林俊芝, 等. 志愿者感官试验在药物味觉评价的运用及发展研究 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(22): 1971-1975.
- [16] Xi W P, Zheng H W, Zhang Q Y, *et al.* Profiling taste and aroma compound metabolism during apricot fruit development and ripening [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): E998.
- [17] Saradhudhat P, Paull R E. Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development [J]. *Sci Hortic*, 2007, 112(3): 297-303.
- [18] Albertini M V, Carcouet E, Pailly O, *et al.* Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless *Citrus* fruit [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(21): 8335-8339.
- [19] 李文云, 罗怿, 郑乾明, 等. 3个柠檬品种果实非可食部分初生代谢物分析 [J]. 中国南方果树, 2019, 48(5): 13-16.
- [20] 陈浩, 孙进华, 王树军, 等. 霜疫霉侵染对不同荔枝品种果皮苯丙烷类代谢的影响 [J]. 热带作物学报, 2021, 42(6): 1694-1699.
- [21] 胡梦, 程玉冰, 张培燕, 等. 百药煎中转化鞣质生成没食子酸的最佳菌种组合筛选 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(4): 453-457.
- [22] Demigné C, Sabboh H, Puel C, *et al.* Organic anions and potassium salts in nutrition and metabolism [J]. *Nutr Res Rev*, 2004, 17(2): 249-258.
- [23] Sabboh H, Besson C, Tressol J C, *et al.* Organic potassium salts or fibers effects on mineral balance and digestive fermentations in rats adapted to an acidogenic diet [J]. *Eur J Nutr*, 2006, 45(6): 342-348.
- [24] 吕玲玲, 谢松, 张凯媛, 等. 厚朴饮片标准汤剂的制备及质量标准研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(21): 3239-3243.
- [25] 钟凌云. 基于“析霜”特色的江西姜厚朴炮制机理研究 [A] // 2014年全国中药炮制学术年会暨中药饮片创新发展论坛及协同创新联盟会议会议讲义 [C]. 南京: 中国中药协会, 2014: 110-120.

[责任编辑 王文倩]