

# 基于成分变化研究厚朴“发汗”过程中 颜色与酶促反应的关系

朱兴龙<sup>1,2</sup>, 卢丽洁<sup>1,2</sup>, 吴清华<sup>1,2\*</sup>, 魏担<sup>1,2</sup>, 晏宇杭<sup>1,2</sup>, 任超翔<sup>1,2</sup>, 裴瑾<sup>1,2\*</sup>

(1. 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137; 2. 成都中医药大学 药学院, 四川 成都 611137)

**[摘要]** 该研究为探索厚朴“发汗”过程中酶促反应对药材颜色的影响,通过 Q Exactive 测定厚朴“发汗”不同时期的主要代谢产物,对厚朴“发汗”过程中药材颜色指标进行量化,并通过 ELISA 法测定“发汗”不同时期多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、酪氨酸酶等酶活性,采用灰度关联法对药材颜色、化学成分和酶活性进行灰度关联分析。研究结果表明厚朴药材在不同方法“发汗”过程中代谢物质变化规律相近,其中变化较为明显的初级代谢产物为氨基酸类、核苷酸类和糖类等化合物,次级代谢产物为酚类和苯丙素类等化合物,不同“发汗”方法共同上调化合物包括 L-谷氨酸、乙酰精氨酸、次黄嘌呤、黄嘌呤等 11 种化合物,共同下调化合物包括 L-精氨酸、L-天冬氨酸、苯丙氨酸、胞苷等 6 种化合物。厚朴“发汗”过程中明度值( $L^*$ )、红绿色值( $a^*$ )、黄蓝色值( $b^*$ )持续降低;“发汗”期间 PPO 与 POD 的活性变化与药材颜色参数值变化规律一致。主要差异化合物、粉末色度参数与酶活性的灰度关联分析结果表明氨基酸、酚类等主要差异代谢物与色度参数  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  密切相关;POD 与氨基酸类和酚类化合物关联度较高,PPO 与酚类化合物关联度较高。结合 PPO 和 POD 的特性可知,厚朴“发汗”后颜色变化与 PPO 和 POD 主导的酶促褐变密切相关。该研究通过分析厚朴“发汗”过程主要差异代谢物-颜色参数-酶活性的关联性,揭示厚朴“发汗”物质变化的共性规律,探明厚朴“发汗”前后颜色变化与酶促反应的关系,为研究厚朴“发汗”机制提供一定参考,对保障厚朴药材品质具有重要意义。

**[关键词]** 厚朴;“发汗”;颜色;代谢产物;酶促反应;灰度关联分析

## Composition changes reveal relationship between color and enzymatic reaction of *Magnoliae Officinalis* Cortex during "sweating" process

ZHU Xing-long<sup>1,2</sup>, LU Li-jie<sup>1,2</sup>, WU Qing-hua<sup>1,2\*</sup>, WEI Dan<sup>1,2</sup>, YAN Yu-hang<sup>1,2</sup>, REN Chao-xiang<sup>1,2</sup>, PEI Jin<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China; 2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** In this study, we employed Q Exactive to determine the main differential metabolites of *Magnoliae Officinalis* Cortex during the "sweating" process. Further, we quantified the color parameters and determined the activities of polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), and tyrosinase of *Magnoliae Officinalis* Cortex during the "sweating" process. Gray correlation analysis was performed for the color, chemical composition, and enzyme activity to reveal the effect of enzymatic reaction on the color of *Magnoliae Officinalis* Cortex during the "sweating" process. *Magnoliae Officinalis* Cortex sweating in different manners showed similar metabolite changes. The primary metabolites that changed significantly included amino acids, nucleotides, and sugars, and the secondary metabolites with significant changes were phenols and phenylpropanoids. Despite the different sweating methods, eleven compounds were commonly up-regulated, including L-glutamic acid, acetylarginine, hypoxanthine, and xanthine; six compounds were commonly down-re-

**[收稿日期]** 2021-04-23

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81703654);四川省科技计划重点研发项目(2020YFN0152);国家中医药管理局全国名老中医专家传承工作室建设项目(国中医药人函[2019]41号)

**[通信作者]** \*裴瑾,教授,博士生导师,主要从事中药资源品种、品质研究,E-mail: peixin@163.com; \*吴清华,讲师,主要从事中药资源品种、品质研究,E-mail: 20122051@cdutcm.edu.cn

**[作者简介]** 朱兴龙,硕士研究生,E-mail: 798698365@qq.com

gulated, including L-arginine, L-aspartic acid, and phenylalanine. The brightness value ( $L^*$ ), red-green value ( $a^*$ ), and yellow-blue value ( $b^*$ ) of *Magnoliae Officinalis Cortex* kept decreasing during the "sweating" process. The changes in the activities of PPO and POD during sweating were consistent with those in the color parameter values. The gray correlation analysis demonstrated that the main differential metabolites such as amino acids and phenols were closely related to the color parameters  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ; POD was correlated with amino acids and phenols; PPO had strong correlation with phenols. The results indicated that the color change of *Magnoliae Officinalis Cortex* during "sweating" was closely related to the reactions of enzymes dominated by PPO and POD. The study analyzed the correlations among the main differential metabolites, color parameters, and enzyme activities of *Magnoliae Officinalis Cortex* in the "sweating" process. It reveals the common law of material changes and ascertains the relationship between color changes and enzymatic reactions of *Magnoliae Officinalis Cortex* during "sweating". Therefore, this study provides a reference for studying the "sweating" mechanism of *Magnoliae Officinalis Cortex* and is of great significance to guarantee the quality of *Magnoliae Officinalis Cortex*.

[Key words] *Magnoliae Officinalis Cortex*; "sweating"; color; metabolites; enzymatic reaction; gray correlation analysis

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20211110.302

厚朴为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹叶厚朴 *M. officinalis* var. *biloba* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、根皮或枝皮,其生品辛辣峻烈,内服对咽喉有刺激性。除 1963 年版《中国药典》规定厚朴干皮可直接阴干作药用外,其后历版《中国药典》均规定厚朴需“发汗”处理<sup>[1]</sup>。“发汗”在促使厚朴药材迅速干燥的同时,也会加快药材中化学成分的转变,是保证厚朴优良品质的关键加工方法<sup>[2-3]</sup>。研究表明,厚朴“发汗”后有效成分<sup>[4]</sup>、浸出物<sup>[5]</sup>与挥发油含量<sup>[6]</sup>均大幅增加。此外,厚朴“发汗”前后颜色也产生较大变化,其“发汗”前药材内表面为黄色,“发汗”后则显紫棕色或深紫褐色,断面呈紫褐色或棕色。查阅古籍发现厚朴不同时期“发汗”方法不同,但均以“发汗”至药材内表皮呈紫褐色为佳<sup>[7-9]</sup>,如《本草经集注》记载“厚朴出建平、宜都。极厚,肉紫色为好,壳薄而白者不如”<sup>[7]</sup>。传统厚朴产地初加工时将“发汗”至药材内表皮呈紫褐色作为“发汗”结束标准,但目前厚朴“发汗”的研究主要集中于“发汗”工艺优化,“发汗”对药材性状、化学成分、药理作用的影响等方面,关于厚朴“发汗”过程中厚朴颜色变化机制及影响因素尚不清楚。

药材外观颜色改变的实质是一系列物理化学反应引发的内在化学成分变化,如酶促反应即普遍存在于药材加工过程中,并通过催化底物转化生成有色产物来改变药材外观颜色;有研究发现酶促褐变是导致菊花<sup>[10]</sup>、金银花<sup>[11]</sup>和半夏<sup>[12]</sup>等药材在加工过程中颜色发生变化的重要因素。厚朴在“发汗”过程中所营造的高温高湿环境在加剧其组织细胞呼吸作用的同时,也会为厚朴细胞中酶的活动创造有

利条件。酶是引起药材性状发生转化的重要原因<sup>[13]</sup>,如刘洪亮<sup>[2]</sup>提出厚朴“发汗”后颜色变化为酪氨酸酶催化苯乙醇苷类化合物所致,故研究酶促反应是否是导致厚朴“发汗”后颜色变化的关键因素,具有重要的意义。

本研究选择本草记载及现代常用的几种厚朴“发汗”方法,从厚朴“发汗”前后及过程中厚朴差异代谢产物、粉末颜色参数<sup>[14-16]</sup>变化及相关酶活性变化等方面展开研究,利用灰度关联分析探究厚朴“发汗”过程中化学成分、颜色参数与酶活性之间的相关性,探明厚朴“发汗”过程中酶促反应与药材颜色变化之间的关系,并为揭示厚朴“发汗”机制奠定理论基础。

## 1 材料

### 1.1 样品

厚朴样品为 2019 年 6 月采于四川省大邑县斜源镇灰窑岗(N 30°36'59", E 103°18'48"),在阳面 50 m × 50 m 选取 5 株树龄 15 年的厚朴植株,分别剥取距地面 1 m,向上 2 m 的厚朴干皮,趁鲜带回实验室。经成都中医药大学裴瑾教授鉴定为厚朴 *M. officinalis*。

### 1.2 试剂

甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);甲醇(分析纯)、甲酸(分析纯),成都市科隆化工试剂厂;多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)和过氧化物酶(peroxidase, POD)、酪氨酸酶 ELISA 试剂盒均购于上海笃玛生物技术有限公司。

### 1.3 仪器

Vanquish 型超高效液相色谱联用 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 ThermoFisher Scientific 公司),DHG-9140A 电热恒温干

燥箱(上海精宏实验设备有限公司), YLS16-A 型水分测定仪(上海精密科学仪器有限公司), QUINTIX224-CN 电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司), KQ-500 DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Water Synergy<sup>®</sup>(德国 Merck Millipore 公司), A11 型分析研磨机(德国 IKA 公司), CM-5 Spectrophotometer 色差仪(柯尼卡美能达有限公司), Tissuelyser-48 型全自动样品快速研磨仪(上海净信科技有限公司), SQP 型万分之一电子天平[Sartorius 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], UPT-11-20T 优普超纯水器(成都超纯科技有限

公司), Spectra Max iD3 多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司], UV-1900 型紫外分光光度计, 移液枪(德国 Eppendorf 公司)。

## 2 方法

### 2.1 材料处理

**2.1.1 厚朴分组** 将厚朴样本树干皮切成 40 cm 短段, 均分为 5 组, 每组包含每株样本树的其中一段。查阅文献后选择 4 种常用“发汗”方法, 分别为水蒸堆置“发汗”、水煮堆置“发汗”、直接堆置“发汗”和切丝堆置“发汗”, 对照组做阴干处理, 分别标记为 A 组、B 组、C 组、D 组和 E 组, 具体操作过程见表 1。

表 1 厚朴不同“发汗”组别的处理

Table 1 Treatment methods for "sweating" of Magnoliae Officinalis Cortex

组别	前处理	“发汗”具体操作
A	以水沸腾后计时, 隔水蒸 15 min <sup>[17]</sup> , 样品变软后, 捞出, 沥掉多余水分	将药材置于棉絮和薄膜下, 放至阴凉通风处堆置, 堆置高度设置为 55 cm。“发汗”至内表面变紫褐色或棕褐色时, 取出, 就地摊放在纸板上, 阴干
B	沸水微煮 5~8 min <sup>[18]</sup> , 样品变软后, 捞出, 沥掉多余水分	将药材置于棉絮和薄膜下, 放至阴凉通风处堆置, 堆置高度设置为 55 cm。“发汗”至内表面变紫褐色或棕褐色时, 取出, 就地摊放在纸板上, 阴干
C	-	将药材置于棉絮和薄膜下, 放至阴凉通风处堆置, 堆置高度设置为 55 cm。“发汗”至内表面变紫褐色或棕褐色时, 取出, 就地摊放在纸板上, 阴干
D	将厚朴药材切成宽度为 3 mm 的厚朴丝, 装入厚型薄膜中, 扎紧	将药材置于棉絮和薄膜下, 放至阴凉通风处堆置, 堆置高度设置为 55 cm。“发汗”至内表面变紫褐色或棕褐色时, 取出, 就地摊放在纸板上, 阴干
E	-	在“发汗”的同一房间内, 摊放在纸板上, 阴干

注: 样品含水量低于 15%<sup>[1]</sup>时, 结束干燥。

本实验以厚朴内表面变紫褐色或棕褐色作为评定厚朴“发汗”结束的标准。A 组与 B 组“发汗”共需 3 d, C 组与 D 组“发汗”共需 4 d。对厚朴样品进行标记, 依次分为未“发汗”样品(A-0、B-0、C-0、D-0、E-0), 处理后样品(A-ap、B-ap), “发汗”不同天数样品(A-1、B-1、C-1、D-1、A-2、B-2、C-2、D-2、C-3、D-3), “发汗”结束样品(A-f、B-f、C-f、D-f)和阴干样品(E-f), 干燥后药材于 15℃下保存。

**2.1.2 样品含水率测定** 将样品剪碎后平铺在托盘上, 采用快速水分测定仪测定厚朴“发汗”过程中样品含水量, 每次测定样品质量为 5.0 g, 标准模式 105℃加热, 至样品质量 30 s 无变化, 读取并记录样品失水率。每份样品平行测定 3 次。

**2.1.3 样品制备** 选择“发汗”各时期样品适量, 剪成小段, 置于分析研磨机中, 加液氮适量研磨, 研磨后粉末保存于 -20℃, 作为酶活性实验样品。其余样品阴干至含水量低于 15%后打粉, 过 3 号筛, 备用。由于 A-0 至 E-0 为同一株样品树, 且未经加工处理, 故将其粉末等量混合均匀作为对照组(CK)。

精密称取对照组(CK)和“发汗”结束样品(A-f、B-f、C-f、D-f)药材粉末 0.5 g, 置具塞锥形瓶内, 加入 70%甲醇 25 mL, 摇匀, 称重, 超声 1 h(100 Hz, 30℃), 放冷, 加甲醇补足质量, 过滤, 取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜, 作为分析检测样品。

### 2.2 厚朴“发汗”前后差异化合物分析

**2.2.1 检测条件** 色谱条件: Agilent SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相 0.1%甲酸水(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~15 min, 20%~80% B; 15~25 min, 80%~95% B; 25~35 min, 95% B; 35~35.1 min, 95%~20% B; 35.1~40 min, 20% B), 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30℃, 进样器温度 10℃, 进样体积 1 μL。

质谱条件: 采用 HESI 电喷雾离子源, 正负离子模式检测。喷雾正电压 3.5 kV, 负电压 3.0 kV, 离子源温度 350℃, 鞘气流速 35 arb, 辅助气流速 10 arb, 离子传输管温度 320℃。扫描模式为全扫描数据依赖二级扫描(Full MS-dd MS<sup>2</sup>), Full MS 分辨率 35 000, dd MS<sup>2</sup> 分辨率 17 500, 扫描范围 m/z 100~

1 500, stepped NCE 为 20、40、60 eV。

**2.2.2 数据分析** 经 Compound discoverer 软件初步分析处理质谱仪在正、负离子模式检测所得的原始数据,筛选与数据库匹配度高于 80 分且 Delta Mass 不超过  $\pm 10 \times 10^{-6}$  的化合物。应用主成分分析 (PCA) 与偏最小二乘法分析 (PLS-DA) 分析不同处理组别“发汗”前后成分含量是否有明显差异,并以图形的形式展示分析结果;对所得数据进一步进行均一化处理,分析厚朴“发汗”前后及组间差异的主要化合物,绘制差异代谢产物火山图,并通过 Excel 比对筛选找出各组差异代谢产物。

### 2.3 厚朴颜色值测定

参照已有检测方法<sup>[19-20]</sup>,采用色差仪依次测定“发汗”各时期样品,记录颜色值( $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  分别代表明暗度、红绿色和黄蓝色;“+”值分别对应偏明亮、红色及黄色,“-”值对应偏暗、绿色及蓝色)。最后以色差值  $\Delta E = [(L_2 - L_1)^2 + (a_2 - a_1)^2 + (b_2 - b_1)^2] / 2$  量化样品颜色色度,检验厚朴“发汗”前后颜色是否存在差异, $\Delta E$  越大,差异越大。

### 2.4 酶活性测定

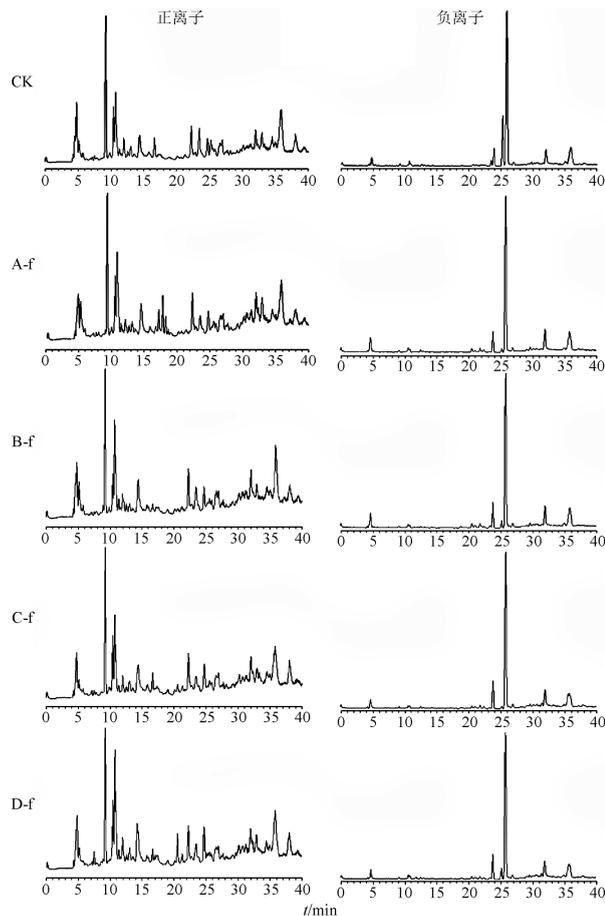
精密称取低温研磨粉末 0.10 g,置于 2 mL 灭菌离心管中,使用全自动研磨仪 (60 Hz, 50 s) 进一步粉碎。加入 PBS 缓冲液 1 mL,涡旋混匀, PPO、POD、酪氨酸酶在  $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  转速下离心 20 min,取上清液 400  $\mu\text{L}$ ,  $-20\ ^\circ\text{C}$  保存。

根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作,往预先包被测定的酶抗体的包被微孔中依次加入标本、对照品、HRP 标记的检测抗体,经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色, TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色,颜色的深浅和样品中所测定的酶呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (A),计算样品活性,每种酶测定 3 次,取平均值。

## 3 结果

### 3.1 厚朴“发汗”前后差异物质研究

各组“发汗”结束样品在正、负离子模式下的总离子流见图 1。在正、负离子模式下,不同组厚朴样品的峰与保留时间均较为相似,各组厚朴“发汗”样品的化学成分相较于对照组样品均发生了一定程度的变化。主要包含氨基酸、生物碱、糖类、酚类、苯丙素类和脂肪酸类化合物。此外,还有苯乙醇苷类、倍半萜类、呋喃类及香豆素类化合物。



CK. 对照组; A-f~D-f. A~D 组“发汗”结束样品。

图 1 厚朴不同“发汗”方法的 UPLC-QE Orbitrap MS 总离子流图

Fig. 1 UPLC-QE Orbitrap MS total ion chromatograms of Magnoliae Officinalis Cortex "sweating" with different methods

基于不同组别的 106 个化合物峰面积展开 PCA, PCA 结果见图 2 ( $R^2X = 0.881$ ,  $Q^2Y = 0.363$ )。由图可知厚朴“发汗”前后样品呈分离状态,且 A、B 组样品化学成分聚合度较好, C、D 组样品化学成分聚合度较好。在 PCA 的基础上将未“发汗”样品 (CK) 分为一组,“发汗”样品 (A~D 组) 分为一组进行 PLS-DA, 并对“发汗”与未“发汗”厚朴数据进行建模分析, PLS-DA 结果见图 3 ( $R^2X = 0.622$ ,  $R^2Y = 0.997$ ,  $Q^2 = 0.955$ ), 不同组“发汗”样品与未“发汗”样品区别明显。说明各组厚朴样品“发汗”后化合物差异明显, 可与未“发汗”样品完全分离, 且 A、B 组化合物成分相近, C、D 组化合物成分相近。

厚朴不同“发汗”组差异代谢产物分析结果见图 4 (上调与下调), 筛选所得 73 种厚朴“发汗”前后

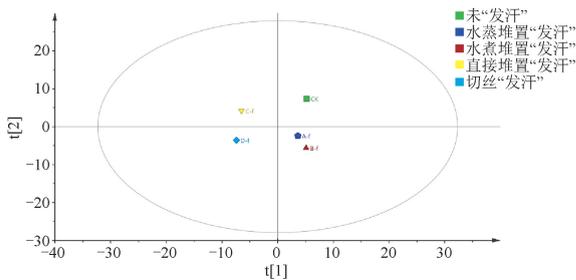


图2 不同“发汗”方法 PCA 主成分二维散点图  
Fig. 2 PCA plots of Magnoliae Officinalis Cortex samples "sweating" with different methods

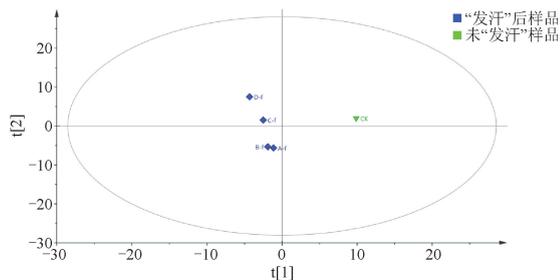
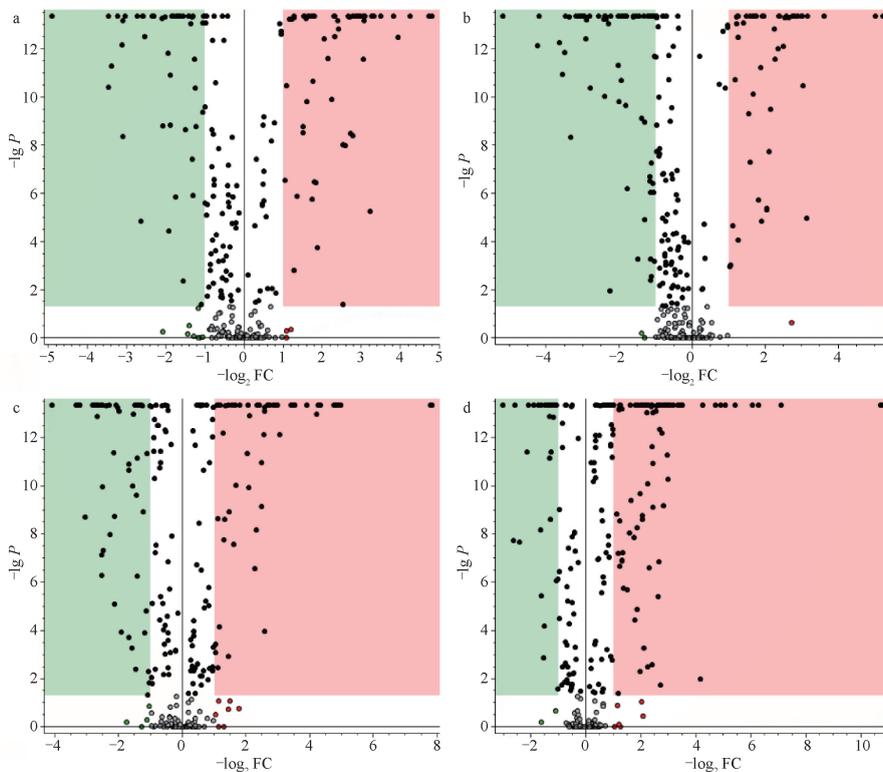


图3 不同“发汗”方法 PLS-DA 主成分二维散点图  
Fig. 3 PLS-DA plots of Magnoliae Officinalis Cortex samples "sweating" with different methods

差异化合物见表2。由表可知,“发汗”后差异物质最多的为D组(53个);其次为C组(36个),A、B组分别含23、22个差异化合物。“发汗”过程中变

化较为明显的是氨基酸、核苷酸、糖类等初级代谢产物,而次级代谢产物以苯丙素类和酚类化合物为主。



a、b、c、d 分别为 A-f、B-f、C-f、D-f 与 CK 样品相比的未筛选差异化合物;红色区域的点表示“发汗”后较“发汗”前显著上调,绿色区域的点表示“发汗”后较“发汗”前显著下调, $P < 0.05$ ,  $|\log_2 FC| \geq 1$ 。

图4 厚朴不同方法“发汗”前后差异化合物的火山图

Fig. 4 Volcano maps of different compounds in Magnoliae Officinalis Cortex before and after "sweating"

与未“发汗”样品相比,A组与B组的变化规律更为相似,两者具有20种共同上调化合物,17种共同下调化合物;而未经前处理的C组与D组有25

种共同上调化合物,8种共同下调化合物。不同“发汗”方法共同上调化合物有11种,包括L-谷氨酸、乙酰精氨酸、次黄嘌呤、黄嘌呤、半乳糖醛酸、BMK

表2 厚朴“发汗”前后主要差异化合物

Table 2 Main different compounds in Magnoliae Officinalis Cortex before and after "sweating"

No.	化合物	物质类别	分子式	“发汗”结束(f)/CK			
				A	B	C	D
1	N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸	氨基酸	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	↓	-	-
2	L-精氨酸	氨基酸	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	↓	↓	↓	↓
3	L-脯氨酸	氨基酸	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	-	-	↓	↓
4	L-谷氨酰胺	氨基酸	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	↑	↑
5	L-焦谷氨酸	氨基酸	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	↓	↓	↑	↑
6	L-天冬氨酸	氨基酸	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	↓	↓	↓	↓
7	L-谷氨酸	氨基酸	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	↑	↑	↑	↑
8	D-脯氨酸	氨基酸	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	-	↓	-	-
9	乙酰精氨酸	氨基酸	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	↑	↑	↑	↑
10	4-胍基丁酸	氨基酸	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	↑	↑	-	-
11	缬氨酸	氨基酸	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	↓	↓	-	↓
12	酪氨酸	氨基酸	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	↓	↓	-	↑
13	正亮氨酸	氨基酸	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	↓	↓	-	-
14	亮氨酸	氨基酸	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	↓	↓	↓	↓
15	苯丙氨酸	氨基酸	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	↓	↓	↓	↓
16	胞苷	核苷酸	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	↓	↓	↓	↓
17	次黄嘌呤	核苷酸	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O	↑	↑	↑	↑
18	黄嘌呤	核苷酸	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	↑	↑	↑	↑
19	腺苷	核苷酸	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	-	↓	↓	-
20	腺嘌呤	核苷酸	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	↓	↓	-	-
21	尿嘧啶	核苷酸	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↓	-	-	-
22	鸟苷	核苷酸	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	↑	↑	-	-
23	胸腺嘧啶	核苷酸	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	↓
24	2'-O-甲基腺苷	核苷酸	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	-	-	↓	↓
25	L-肉毒碱	生物碱	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	-	↓	-	-
26	葫芦巴碱	生物碱	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	↓	↓	↑	↑
27	水苏碱	生物碱	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	-	↓	-	-
28	乙酰基左旋肉碱	生物碱	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	-	↓	↑	-
29	大麦碱	生物碱	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO	-	↓	↑	-
30	猪毛菜碱	生物碱	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	-	-	↑	↑
31	N-反式-阿魏酰酪胺	生物碱	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	-	-	↑	↑
32	巴婆碱	生物碱	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	-	-	-	↑
33	肌苷	生物碱	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	↑	↑	↑	↑
34	apocodeine	生物碱	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	-	-	↑	↑
35	decarbomoyl-neosaxitoxin	生物碱	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	-	-	↑	↑
36	N-乙酰基-2-苯基乙胺	生物碱	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO	-	-	↑	↑
37	麦芽五糖	糖类	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>26</sub>	↑	↑	-	↓
38	水苏糖	糖类	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>21</sub>	↑	↑	-	-
39	棉子糖	糖类	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	↑	↑	↓	-
40	半乳糖醛酸	糖类	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	↑	↑	↑	↑
41	葡萄糖酸	糖类	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	↑	↑	-	↑
42	半乳糖醇	糖类	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	↓	↓	↑	↑
43	蔗糖	糖类	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	↑	↑	-	-
44	D-奎宁酸	酚类	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	↓	↓	-	↓
45	4-甲氧基水杨酸	酚类	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	-	-	↑	-
46	3,4,5-三甲氧基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷	酚类	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	-	-	-	↓
47	儿茶素	酚类	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	↓	-	↓	-
48	反-3,5-二甲氧-4-羟基肉桂醛	酚类	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	↑	↑	↑	↑
49	丁香醛	酚类	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	-	-	-	↓
50	松萝酸	酚类	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	-	↓	-	↓

续表2

No.	化合物	物质类别	分子式	“发汗”结束(f)/CK			
				A	B	C	D
51	绿原酸	苯丙素类	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	↑	-	↑	↑
52	紫丁香苷	苯丙素类	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	↑	↑	↑	↑
53	大车前苷	苯丙素类	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>16</sub>	↓	-	↓	↑
54	连翘酯苷 I	苯丙素类	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	-	-	-	↑
55	3-对香豆酰基奎宁酸	苯丙素类	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	-	-	↑	↑
56	苹果酸	脂肪酸	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	↓	↓	↓	-
57	BMK 缩水甘油酸甲酯	脂肪酸	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	↑	↑	↑	↑
58	9-oxo-10(E),12(E)-octadecadienoic acid	脂肪酸	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	↓	↓	↓	↓
59	(9S,13R)-12-oxophytodienoic acid	脂肪酸	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	↓	↓	-	-
60	10(E),12(Z)-共轭亚油酸	脂肪酸	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	-	↓	-	-
61	1-油烯基甘油	脂肪酸	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	↑	↑	↑	↑
62	异毛蕊花糖苷	苯乙醇苷	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	↓	↓	-	↑
63	红景天苷	苯乙醇苷	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	-	-	↑	↑
64	金石蚕苷	苯乙醇苷	C <sub>35</sub> H <sub>46</sub> O <sub>19</sub>	-	-	↓	-
65	木通苯乙醇苷 B	苯乙醇苷	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	-	↓	↓	↑
66	莪术二酮	倍半萜类	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	↑	↑	↑	↑
67	诺卡酮	倍半萜类	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	↑	↑	↑	↑
68	5-羟甲基糠醛	呋喃	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-	-	↓	-
69	落叶松树脂酚 4-O-葡萄糖苷	木脂素	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>	-	-	-	↓
70	茵芋苷	香豆素	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	-	-	↓	↑
71	二氢槲皮素	黄酮	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	-	-	-	↑
72	柚皮苷查尔酮	黄酮	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-	-	↑	↑
73	3-(beta-D-glucopyranosyloxy)-2-methyl-4H-pyran-4-one	未知	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	↑	↑	-	↑

注: ↑. “发汗”较未“发汗”品含量显著性上调; ↓. “发汗”较未“发汗”品含量显著性下调;  $P < 0.05$ 。

缩水甘油酸甲酯、紫丁香苷、反-3,5-二甲氧-4-羟基肉桂醛、莪术二酮等;共同下调化合物有6种,包括L-精氨酸、L-天冬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、胞苷和9-oxo-10(E),12(E)-octadecadienoic acid。

此外,与CK样品相比较,糖类物质在A组、B组全部显著上调,在C组与D组无显著变化;生物碱类物质在A组与B组显示为下调,但在C组与D组变化显示为上调。

### 3.2 厚朴粉末颜色测定

厚朴粉末颜色值测定结果见表3。经统计学分析发现,当色差值大于1时,两样品的总色差值差异显著,故选取 $\Delta E > 1$ 作为两者颜色差异显著的判别标准。分析结果可知,“发汗”过程中 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 持续降低,且“发汗”前后样品的色差值( $\Delta E$ )均大于8,由于所有组的0d均为40℃烘干,即E-0与E-f使用同样方法处理,其 $\Delta E$ 小于1。以 $\Delta E$ 评价不同“发汗”方法“发汗”前后样品之间的颜色差异, $\Delta E$ 大小顺序为C组>A组>D组>B组,此与肉眼观C组颜色最深,B组颜色最浅一致。

以色差值 $\Delta E$ 对“发汗”结束与未“发汗”样品

以组间联接方法进行聚类分析,用Euclidean distance(欧氏距离)区间作为度量标准,能将所测样品聚为2类,见图5,说明厚朴样品“发汗”后颜色变化明显,可与未“发汗”样品区分。

### 3.3 酶活性

厚朴不同“发汗”方法“发汗”过程中的酶活变化测定结果经软件处理后见图6~8。由图可知,不同方法“发汗”过程中厚朴样品的POD活性随着“发汗”程度加深整体呈下降趋势。PPO活性总体表现为先上升后下降的趋势,其中水煮堆置“发汗”样品(B组)经处理后PPO活性较CK显著下降,在“发汗”第2天其活性又显著上升,推测为样品直接与沸水接触致使PPO部分失活,而后随着“发汗”时间增长其活性被再次激发所致。各组“发汗”结束样品的PPO与POD活性均低于CK样品,且各组“发汗”结束样品PPO与POD活性与色差值变化趋势相反。

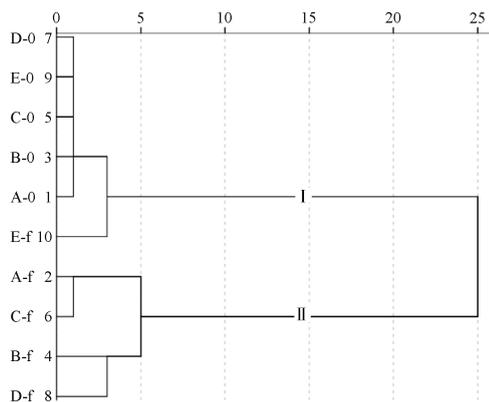
不同处理组之间酪氨酸酶的活性变化规律基本一致,且与PPO活性变化相近,先上升后下降,其中A组水蒸、B组水煮后则达峰值,C组与D组在上升

表3 厚朴样品色度参数值( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Color parameters of Magnoliae Officinalis Cortex ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

样品	$L^*$	$a^*$	$b^*$	色差 $\Delta E$
A-0	56.13±0.41	7.19±0.03	18.43±0.18	-
A-ap	55.30±0.58	7.14±0.05	18.33±0.24	1.01
A-1	52.87±0.10	7.02±0.06	16.18±0.12	3.97
A-2	50.16±0.06	6.91±0.02	15.19±0.05	6.81
A-f	48.03±0.65	6.36±0.19	11.66±0.54	10.62
B-0	54.70±0.61	7.46±0.05	17.91±0.32	-
B-ap	53.43±0.46	7.32±0.12	17.50±0.33	1.39
B-1	52.48±0.28	7.32±0.10	16.52±0.19	2.65
B-2	50.34±0.11	6.85±0.06	14.39±0.16	5.67
B-f	48.18±0.15	6.42±0.22	11.92±0.34	8.94
C-0	55.31±0.47	7.41±0.15	18.54±0.55	-
C-1	54.49±0.18	7.27±0.15	18.43±0.46	1.19
C-2	53.09±0.05	7.10±0.15	16.86±0.17	2.89
C-3	50.85±0.10	6.84±0.05	14.35±0.45	6.19
C-f	47.37±0.25	6.51±0.11	11.46±0.18	10.70
D-0	54.67±0.46	7.41±0.28	17.66±0.19	-
D-1	54.36±0.59	6.77±0.37	16.05±0.09	1.81
D-2	50.62±0.29	6.84±0.06	15.07±0.09	4.89
D-3	49.27±0.32	6.57±0.09	13.64±0.23	6.80
D-f	47.64±0.77	6.40±0.01	11.53±0.21	9.40
E-0	54.51±0.28	8.36±0.06	18.16±0.21	-
E-f	55.36±0.59	7.65±0.04	17.05±0.09	1.73

注:  $\Delta E > 1$  时,  $P < 0.05$ , 表明两样品的总色值差异显著; 样品编号图 5~8 同。



I类. 未“发汗”样品; II类. “发汗”样品。

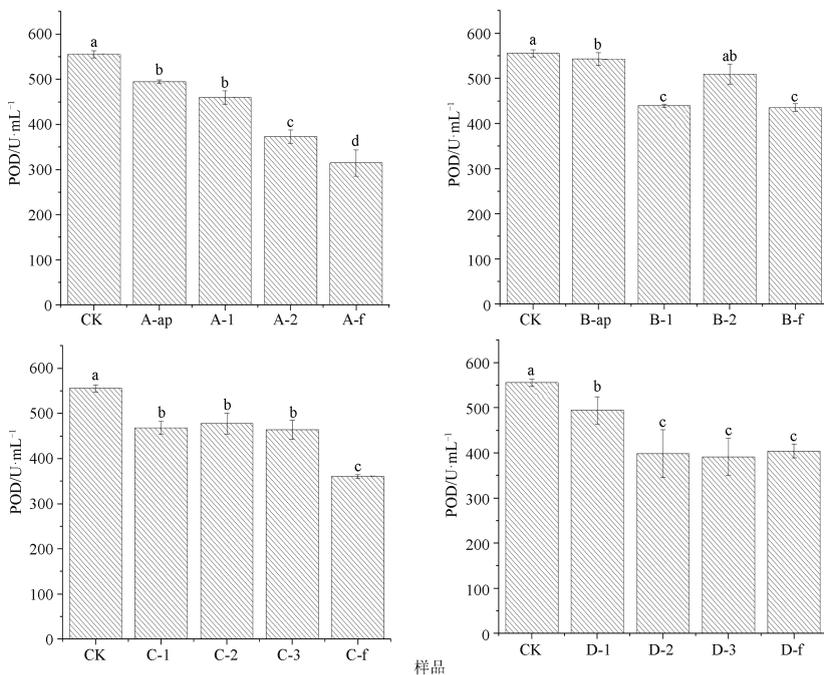
图5 厚朴色差聚类分析

Fig. 5 Clustering of Magnoliae Officinalis Cortex samples based on total color difference

至第2天才达峰值,“发汗”时间越久其活性越低,但其含量总体相对较低。

### 3.4 厚朴颜色与差异代谢产物的关联分析

对差异代谢产物、厚朴颜色参数和酶活性进行灰度关联分析<sup>[21-22]</sup>,分析结果见表4。关联度越大表明样品与参考序列越接近<sup>[23]</sup>,由表可知色度参数



折线图. 左纵坐标,不同“发汗”天数酶活性变化趋势;柱状图. 右纵坐标,不同“发汗”天数酶的活性;同列数字后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图7,8同)。

图6 厚朴不同方法“发汗”过程中 POD 活性( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig. 6 POD activity of Magnoliae Officinalis Cortex in the process of "sweating" with different methods ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

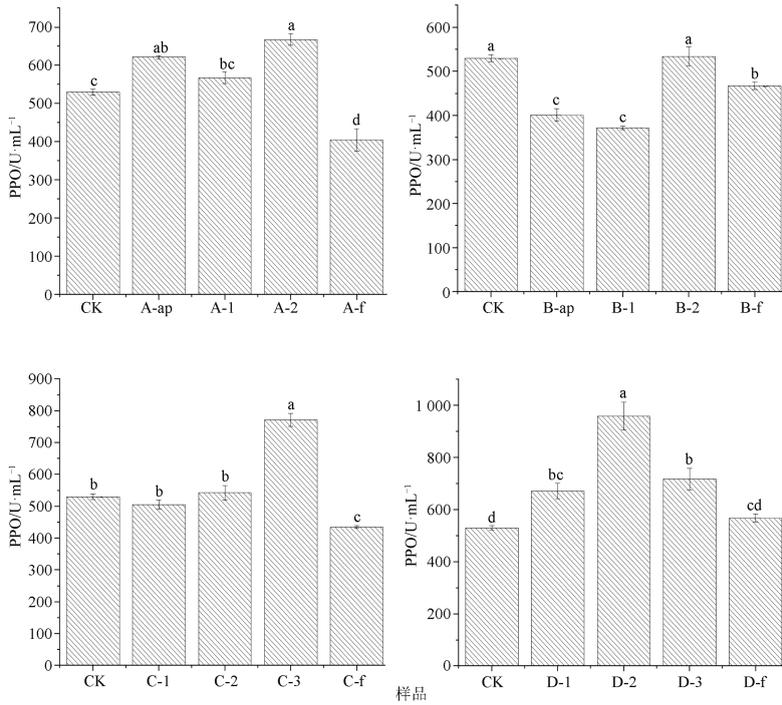


图7 厚朴不同方法“发汗”过程中PPO活性( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig. 7 PPO activity of Magnoliae Officinalis Cortex in the process of "sweating" with different methods ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

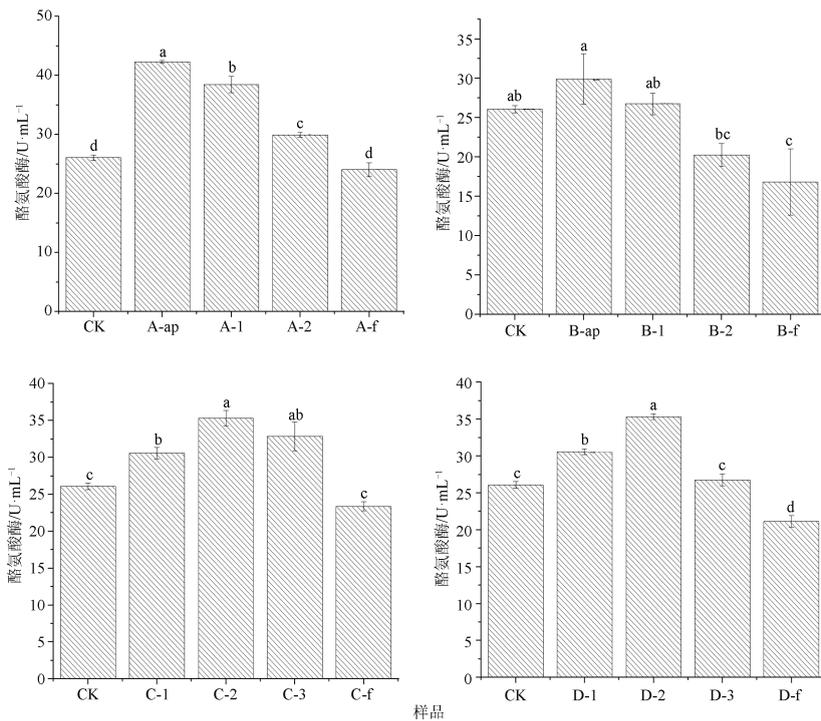


图8 厚朴不同方法“发汗”过程中酪氨酸酶活性( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig. 8 Tyrosinase activity of Magnoliae Officinalis Cortex in the process of "sweating" with different methods ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

$L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  均与酚类物质关联度最高,其次为氨基酸类化合物。POD 与氨基酸类化合物关联性最高,其

次为酚类物质;PPO 与酚类物质关联度最高;而酪氨酸酶与各类化合物关联度均较低。

表4 “发汗”过程中酶活性和色差参数与化合物的灰色关联度分析

Table 4 Gray correlation degrees of enzyme activities and color parameters with compounds of Magnoliae Officinalis Cortex in the "sweating" process

指标	氨基酸	糖类	生物碱	酚类	苯乙醇苷	黄酮类	苯丙素类	倍半萜类
$L^*$	0.876	0.698	0.631	0.926	0.735	0.440	0.816	0.676
$a^*$	0.878	0.704	0.637	0.925	0.742	0.447	0.821	0.681
$b^*$	0.713	0.688	0.619	0.711	0.702	0.566	0.698	0.584
POD	0.852	0.736	0.657	0.815	0.746	0.481	0.802	0.682
PPO	0.771	0.691	0.642	0.774	0.730	0.542	0.737	0.594
酪氨酸酶	0.666	0.627	0.629	0.657	0.605	0.569	0.629	0.554

#### 4 讨论

外观颜色作为判断中药饮片炮制程度的重要参考指标,其变化往往伴随着化学成分的改变。例如,在将大黄在炮制成大黄炭的加工过程中,大黄中的番泻苷和结合蒽醌等化学成分的含量与药材颜色变化有显著相关性<sup>[24]</sup>,刘德鹏等<sup>[25]</sup>发现栀子在炮制过程中颜色变化与美拉德反应产物含量高低相关。另外,存在于药材中的酶在药材加工过程中亦可影响药材颜色,如丹参在“发汗”过程中,隐丹参酮等成分在相关酶的作用下转化为丹参酮,致使丹参药材颜色加深<sup>[26]</sup>。厚朴“发汗”前后颜色差异明显,且研究发现其加工过程中有微生物活动<sup>[27]</sup>,故酶可能是厚朴加工前后颜色变化的重要影响因素。

本研究利用色差仪对厚朴“发汗”过程样品的表观颜色进行量化,发现加工过程中 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 均显著下降,其中 $b^*$ 下降程度较大,表明厚朴“发汗”前后颜色差异显著。同时,颜色值变化趋势与肉眼观察厚朴粉末颜色逐渐加深一致,证明传统方法通过观察颜色判断加工程度是可行的。差异代谢产物结果显示不同组别厚朴“发汗”前后差异化合物中,变化较为明显的为氨基酸、核苷酸、糖类等初级代谢产物,以及苯丙素类、酚类等次级代谢产物。从酶活性实验结果可以看出,PPO与POD 2种酶活性变化趋势与厚朴颜色变化趋势相近。将酶活实验结果、色度参数值与主要代谢产物进行灰度关联分析,结果发现色度参数 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 与酚类、氨基酸类化合物关联紧密;POD与氨基酸类化合物关联性最强,PPO与酚类物质关联性最强,这与2种酶的生物活性相近<sup>[14,28]</sup>,故推测PPO、POD 2种酶可能为“发汗”过程中影响厚朴颜色的主要作用酶,两者以氨基酸类和酚类化合物为底物进行酶促褐变,产生大量深色物质,从而导致厚朴“发汗”后颜色变深,这种变色机制已在丹参、半夏、亳菊等药材中发现并

证实<sup>[29-31]</sup>。但本研究并未将2种酶单独提取后施加在药材上,观察其颜色变化情况,故厚朴“发汗”后颜色变化是否主要由2种酶主导的酶促反应所致,还有待于进一步深入研究。

综上所述,本研究以厚朴“发汗”前后差异代谢产物为基础,从酶促反应的角度探索厚朴“发汗”前后颜色变化机制,并依据实验结果明确可能影响厚朴颜色的因素,为后续深入研究厚朴“发汗”机制提供了科学依据。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药出版社, 2020: 263.
- [2] 刘红亮. 从药材性状及化学成分的角度诠释产地初加工“发汗”对厚朴质量的影响[D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [3] 余盛贤, 张春霞, 陈承瑜, 等. “发汗”对厚朴质量的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1831.
- [4] 杨红兵, 詹亚华, 陈科力, 等. 发汗与去皮对厚朴中酚类成分含量的影响[J]. 中药材, 2007, 30(1): 22.
- [5] 杨红兵. 湖北恩施产厚朴的品质研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2007.
- [6] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2013: 229.
- [7] 陶弘景. 本草经集注辑校本[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 276.
- [8] 苏颂. 图经本草[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1988: 326.
- [9] 寇宗奭. 本草衍义[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 86.
- [10] 朱玉芸. 酶促褐变对菊花品质的影响研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.
- [11] 郝英超. 金银花褐变过程酚类物质代谢机理研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2013.
- [12] 吴玉良, 景亚凤, 申琴, 等. 半夏褐变抑制条件及其对药理作用的影响[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1523.
- [13] 段金彪, 宿树兰, 严辉, 等. 药材初加工“发汗”过程及其酶促反应与化学转化机制探讨[J]. 中草药, 2013, 44(10): 1219.
- [14] 王军, 吴泉英, 姚庆香, 等. 利用傅里叶变换和色度学原理分析白光干涉图的形成[J]. 大学物理实验, 2013, 26(1): 17.
- [15] 于梦婷, 童黄锦, 毛春芹, 等. 基于色泽量化与主要成分含量

- 的不同基原莜术饮片质量识别研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1393.
- [16] 张建逵, 李云静, 孙智, 等. 基于断面色泽测定的条芩饮片分级研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4115.
- [17] 陈佩东, 薛露, 严辉, 等. 厚朴“发汗”工艺的研究[J]. 中成药, 2015, 37(11): 2469.
- [18] 曾庆楣. 杜仲、厚朴、黄柏栽培与加工技术[M]. 天津: 天津教育出版社, 1993: 69.
- [19] 王洁, 苏少锋, 姚仁川, 等. 红花保存年限、有效成分含量和颜色值的相关性分析[J]. 中国药房, 2020, 31(5): 554.
- [20] 徐红霞, 吴沂芸, 裴瑾, 等. 红花黄酮类成分与其色度值相关性研究[J]. 中药材, 2018, 41(1): 49.
- [21] 吉爽, 段连政, 徐文慧, 等. 灰色关联度法优化葵花盘“精准炮制”饮片的加工炮制一体化工艺[J]. 中国药房, 2019, 30(24): 3413.
- [22] 孔静怡, 林励, 陈康, 等. 基于 GC-MS 技术的不同结香方法沉香聚类及灰色关联度分析[J]. 中药材, 2020, 43(1): 115.
- [23] 刘洋, 郭慧清, 杨乐, 等. 3 种商品规格羌活体内抗炎作用差异与谱效关系研究[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6052.
- [24] 杨丽, 龚焱婷, 许铭珊, 等. 基于“表里关联”的大黄炭炮制过程颜色和成分变化关系研究[J]. 中草药, 2020, 51(22): 5705.
- [25] 刘德鹏, 王云, 王国育, 等. 焦栀子炮制过程中饮片色泽变化与美拉德反应的相关性分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10): 2382.
- [26] 沈雁, 王立娜, 张春枝, 等. 丹参酮转化酶的制备及其在丹参酮转化中的运用[J]. 大连轻工业学院学报, 2007, 26(1): 21.
- [27] 魏担, 吴清华, 刘钰萍, 等. 基于高通量测序研究厚朴“发汗”过程中微生物群落多样性及其特征[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5405.
- [28] 谢春艳, 宾金华, 陈兆平. 多酚氧化酶及其生理功能[J]. 生物学通报, 1999, 34(6): 11.
- [29] 陈旭, 周涛, 黄志芳, 等. 新鲜丹参中酚酸成分的含量测定及其多酚氧化酶对含量的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1148.
- [30] 严茂伟, 万军, 楚亮, 等. 半夏干燥过程中褐变机制的研究[J]. 中草药, 2011, 42(5): 877.
- [31] 王珊, 李友连, 朱晶晶, 等. 硫熏剂量对亳菊褐变酶和化学成分的影响及其相关性的研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 4852.

[责任编辑 孔晶晶]