
加热温度和时间对广陈皮褐变反应的影响

【摘要】目的：通过改变广陈皮加热温度及加热时间，考察温度与时间两个因素对陈皮褐变程度的影响。**方法：**采用模拟陈化方法处理样品，使用 DNS 比色法、茚三酮比色法、高效液相色谱法测定陈皮各样品中氨基酸、还原糖、5-HMF 的含量。**结果：**加热温度越高、加热时间越长，都能使陈皮的氨基酸含量减少，还原糖含量较稳定，5-HMF 含量增多。**结论：**增高加热温度与延长加热时间均能加速陈皮陈化反应进程。

【关键词】广陈皮；美拉德反应；五羟甲基糠醛

Effects of Heating Temperature and Time on the Browning Reaction of Citrus Reticulata ‘Chachi’

[Abstract] Objective: To investigate the effects of temperature and time on the degree of browning of Citrus reticulata ‘Chachi’ by changing the heating temperature and time of Citrus reticulata ‘Chachi’. **Method:** Simulated aging method was used to treat the samples, and DNS colorimetric method, Ninhydrin colorimetric method, and high-performance liquid chromatography were used to determine the content of amino acids, reducing sugars, and 5-HMF in each sample of Citrus reticulata ‘Chachi’. **Result:** The higher the heating temperature and the longer the heating time, the lower the amino acid content, the more stable the reducing sugar content, and the higher the 5-HMF content of the Citrus reticulata ‘Chachi’. **Conclusion:** Increasing the heating temperature and prolonging the heating time can accelerate the aging reaction process of Citrus reticulata ‘Chachi’.

[keyword] Citrus reticulata ‘Chachi’ ; Maillard reaction; 5-HMF

目录

1 前言	1
2 仪器与材料	4
2.1 仪器	4
2.2 材料	4
3 实验方法	5
3.1 供试品的制备	5
3.2 DNS 试剂的制备	6
3.3 含量测定	6
3.4 吸光度测定	8
3.5 pH 测定	8
4 不同加热温度样品实验结果与分析	9
4.1 模拟陈化样品外观性状	9
4.2 含量测定结果	9
4.3 吸光度测定	14
4.4 pH 值测定	15
4.5 相关性分析	16
5 不同加热时间样品实验结果与分析	17
5.1 模拟陈化样品外观性状	17
5.2 含量分析结果	17
5.3 吸光度测定结果	20

5.4 pH 值测定结果.....	21
-------------------	----

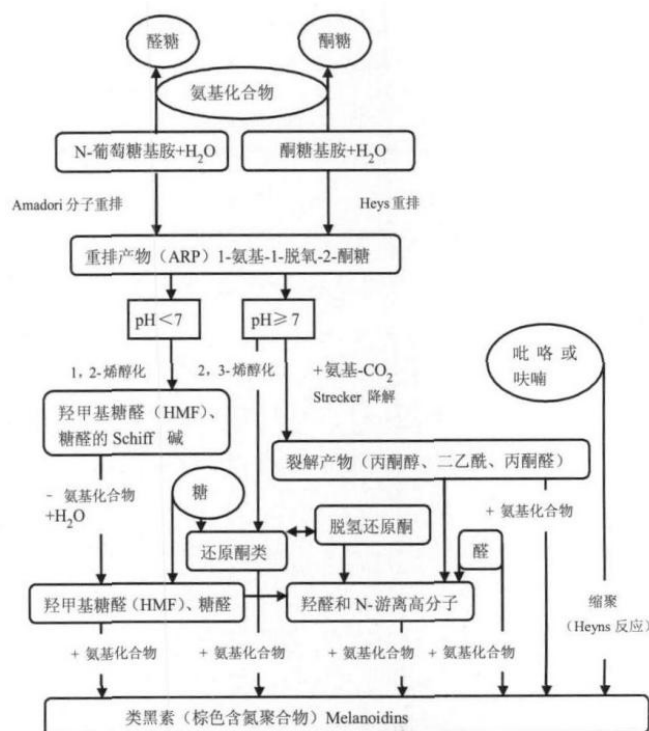
5.5 相关性分析	22
6 结论与讨论	23
6.1 结论	23
6.2 讨论	23
参考文献	24
致谢	25

1 前言

陈皮为芸香科植物橘（*Citrus reticulata* Blanco）及其栽培变种的干燥成熟果皮 **Error! Reference source not found.**。以“陈皮”、“广陈皮”等为主。主要通过采收成熟的水果，然后将其去皮，然后晾干，也可以在低温下烘干而成。产地以福建，浙江，广东为主，广西，江西，湖南为辅，还有贵州，云南，四川和其他一些省份。根据药理实验 **Error! Reference source not found.**，本课题组前期研究发现，陈皮提取物中有140个左右，以挥发油、黄酮等为其主要活性物质。陈皮具有广泛的药理作用，具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎症、抗肝损伤、抗神经损伤等多种功效。

陈皮之名首见于《食疗本草》。《雷公炮炙论》谓其：“年久者最妙” **Error! Reference source not found.**。陈皮储藏的时间不同，其药理作用的活性与成分也有所不同，目前对于陈皮的储藏年份，一般采用官评价法、近红外光谱或测定其成分组成与含量等方法来鉴别。如王福 **Error! Reference source not found.**阐述了广陈皮外观性状的变化与其贮藏年份的关系，贮藏时间越长，表皮与内囊颜色越深，海绵层完全脱离，清晰油点变多，整体厚度变薄。现代研究中对于陈皮在存放过程中挥发性成分与黄酮类成分研究较多，认为陈皮在贮藏过程含量均会有所变化，但对于其具体的变化趋势，不同学者研究结果不尽相同，如林林 **Error! Reference source not found.**研究认为陈皮保存时间增加，也会使得其总黄酮含量增加；段庆 **Error! Reference source not found.**研究认为陈皮保存时间延长，其体内挥发油含量会有下降的趋势，但胡继藤 **Error! Reference source not found.**认为挥发油含量与贮藏时间并无太大关系。还有研究表明广陈皮药材油室遭到破坏会导致其挥发性成分随贮藏时间的延长有极大散失 **Error! Reference source not found.**。综合各方面文献，普遍认为随着贮藏时间的增加，陈皮活性成分黄酮类成分含量增加，陈皮挥发油含量降低，但其挥发性成分发生了变化。

陈皮放置时间变久颜色会变深，一般认为陈皮发生了美拉德反应，生成了类黑素。美拉德反应一般有三个反应阶段，分为初期反应阶段、中期反应阶段和末期反应阶段，其反应途径如下图^[9]。



初级阶段还原糖的羰基与氨基化合物的游离氨基发生缩合反应，脱除一分子水生成碳氮双键，环化生成 N-葡萄糖胺。当还原糖是醛糖时，重排形成 Amadori 产物。若还原糖是酮糖，则会发生 Heynes 重排反应，美拉德初级反应产物不会引起陈皮色泽和香味的变化，但其产物是不挥发性香味物质的前体成分。在中级阶段，根据 pH 值的不同，重排产物发生不同的降解反应。当在酸性条件下 ($\text{pH} \leq 7$)，重排产物主要生成 1,2-烯醇化产物，进一步反应形成醛，若还原糖为戊糖则生成糠醛，若还原糖为己糖则形成羟甲基糠醛。碱性条件下 ($\text{pH} > 7.0$)，发生 2,3-烯醇化反应，产生还原酮类及脱氢还原酮类。最终阶段主要为醛类和胺类在低温下聚合成为高分子的类黑精或称类黑素。也就是初级反应阶段和中间反应阶段生成的 N-葡萄糖胺、1-脱氧糖酮、4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮、 α -氨基酮等活性中间体继续与体系中的氨基酸或还原糖发生复杂的环合、脱氢、重排、异构化等反应最终生成大分子含氮褐色物质类黑精。

自 20 世纪中叶以来，随着我国人口的急剧增长和中草药产业的迅速发展，我国中草药资源的消费量和年消费量成了一个巨大的数字。但目前已成功培植的中药仅 200 多种，80% 以上的中草药仍依赖于挖掘和挖掘。虽然我国中药资源种类丰富，但野生中药资源依然短缺，分布范围和资源贮藏量日益缩减^[10]

。广陈皮作为陈皮的道地药材，其高效的药用价值使其备受追捧，陈皮贮存的时间越长，其主要有效成分橙皮苷含量越高，其药用效果越好^[11]，因此市面上会出现多种杂陈皮流通于市场，茶水染色以捏造陈皮贮藏年份等现象。由于这些现象能直接影响陈皮饮片及相关中成药的药用疗效，因此急需寻找广陈皮准确测定贮藏年份的鉴定方法。近年来出现一种检测陈皮的陈化方式的方法，陈皮经高温加速陈化会发生美拉德反应，导致其经典中间产物 5-HMF 含量会明显得到提升，该方法将 5-HMF 作为标志物应用于检测陈皮的陈化方法中。本次实验也是计划运用该方法检测不同温度与时间条件下陈皮的陈化程度。

2 仪器与材料

2.1 仪器

主要仪器见表 1。

表 1 主要仪器

仪器	型号	公司厂家
紫外可见分光光度计	T2602S	上海佑科仪器仪表有限公司
旋转蒸发器	EYELA N-1300	上海爱朗仪器有限公司
低速离心机	Anke TDL80A-2B	上海安亭科学仪器厂
送风定温恒温箱	YAMATO DKN-612C	广州科朋科学仪器有限公司
超声波清洗器	KQ-300E	昆山市超声仪器有限公司
pH 计	雷磁 pHS-2F	上海雷磁科学仪器厂
电子天平（精度 0.0001）	ME104/02	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
电子天平（精度 0.001）	ME802/02	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
冻干机	EYELA FDU-2110/DRC-1100	东京理化机械株式会社
水浴锅	HH-6 恒温水浴锅	江苏金坛宏华仪器厂
液相色谱仪	LC-20A	日本岛津公司
电子调温电热套	98-1-B 型	天津市泰斯特仪器有限公司

2.2 材料

2.2.1 药物

根据《中国药典》，广陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco

及其栽培变种的干燥成熟果皮。广陈皮常 3 瓣相连，形状整齐，厚度均匀，约 1mm。外表面橙黄色至棕褐色，点状油室较大，对光照视，透明清晰，质较柔软。

经鉴定，本次采用药材为产自广东省江门市新会区的广陈皮，生产年份为 2020 年。

2.2.2 试剂

主要试剂见表 2。

表 2 主要试剂

试剂名称	批号	公司厂家
氢氧化钠	20200425	福晨（天津）化学试剂有限公司
茚三酮	F27HS176588	上海源叶生物科技有限公司
酒石酸钾钠	20201020	福晨（天津）化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	20140217	天津福晨化学试剂厂
磷酸	20270608	天津市永大化学试剂有限公司
甲醇	20211215	天津市百世化工有限公司
色谱甲醇	AH230-4	霍尼韦尔贸易（上海）有限公司
5-羟甲基糠醛	MUST-20051202	成都曼思特生物科技有限公司
甘氨酸	AF20102451	埃法生物科技有限公司
无水葡萄糖	Y19F11J108781	上海源叶生物科技有限公司

3 实验方法

3.1 供试品的制备

称取 20g 陈皮，撕碎，加纯水 400mL，冷凝回流提取 30min，过滤；添加纯水 400mL，冷凝回流提取 30min，过滤；添加纯水 200mL，冷凝回流提取 30min，过滤。合并三次滤液，搅拌均匀，浓缩至 100mL。

以上操作重复 8 次，得到 800mL 陈皮提取液，搅拌均匀，将其平均分成 16 份，每份 50mL。

将上述 16 份陈皮提取液密封，其中 6 份分别置于 50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃的烘箱中，加热 7 天。余下 10 份置于 80℃烘箱中分别加热 3 天、6 天、9 天、12 天、15 天、18 天、21 天、24 天、27 天、30 天。

取回陈皮提取液，搅拌均匀，放入冻干机中，得到不同加热温度与不同加热时间陈化后的陈皮冻干粉末。

3.2 DNS 试剂的制备

甲液：在具刻度的试管中加入 5mL 的 10%氢氧化钠溶液（10g 氢氧化钠固体微粒精密称重后，用足量蒸馏水溶解，然后在温室下进行转移至 100mL 容量瓶，用纯水补置刻度线，振荡摇匀，即获得 10%氢氧化钠溶液），将 2.3g 的苯酚精确称量加入具刻度的试管中，再用蒸馏水稀释到 23mL，然后加入精密称取 2.3005g 亚硫酸氢钠，混合，即获得甲液。

乙液：将 85g 的酒石酸钾钠精确称取到 100mL 10%的氢氧化钠溶液中，使其充分溶解后，再添加到精密量取的 293mL 1%的 3-5-二硝基水杨酸溶液（将精密称取 1g 的 1-5-二硝基水杨酸粉末用蒸馏水溶解，然后将其在 100mL 容量瓶中定容，混合摇匀即得），混合摇匀，即得到乙液。

将以上所得的甲液与乙液混合摇匀后，倒入棕色瓶中，置于室温下，在阴凉处存放 7 天后再使用。

3.3 含量测定

3.3.1 氨基酸含量测定

本次实验采用茚三酮比色法测定各样品中氨基酸的含量。

pH=6.8 的磷酸盐缓冲液的制备：分别精密称取 0.2mol/L 磷酸二氢钾溶液 25mL 和 0.2mol/L 氢氧化钠溶液 11.8mL 至 100mL 容量瓶，用纯水定容。

甘氨酸标准曲线的制备：配置不同浓度的甘氨酸标准溶液，置于 10mL 容量瓶中定容，得标准品供试液。各取 1mL 不同浓度的供试液于试管中，各管分别加入 2.0mL pH=6.8 的磷酸盐缓冲试剂溶液和 1.5mL 茚三酮试剂溶液，摇匀后将试管置于 95°C 水浴加热 30min。取出后迅速冷却至室温，而后转移至 10mL 容量瓶中，加纯水定容至 10mL。于紫外 567nm 处测定吸光度，以甘氨酸溶液浓度 x 为横坐标，吸光度 y 为纵坐标，绘制标准曲线。根据以上步骤，得到甘氨酸标准曲线： $y=131.05x-0.462$ ($R^2=0.9954$)

精密称取不同样品粉末各 10mg，加少量蒸馏水溶解后定容至 10mL，超声助溶后离心，取上清液为母液。取上述母液各 1mL 于不同试管中，1mL 纯水作为空白对照，在各试管中加入纯水 1mL、茚三酮溶液（精密称取 0.5002g 茚三酮粉末至 25mL 容量瓶，用无水乙醇定容，现配现用）1.5mL、缓冲液 2mL，摇匀后用保鲜膜封口，放置 95°C 水浴锅中加热 30min。加热后迅速冷却使其降至室温，将反应完全的溶液转移至 10mL 容量瓶中用纯水定容。用空白试剂调零，在 567nm 处测定吸光度。重复上述操作 1 次。

3.3.2 还原糖含量测定

本次实验采用 DNS 比色法测定各样品中还原糖的含量。

葡萄糖标准曲线的制备：配置不同浓度的标准葡萄糖溶液，置于 10mL 容量瓶中定容，得标准品供试液。各取 1.0mL 上述供试液于具塞试管中，各试管分别加入纯水 1.0ml、DNS 试剂 3.0mL。摇匀后将试管置于 100°C 水浴加热 10min。取出后迅速冷却至室温，而后转移至 10mL 容量瓶中，加纯水定容至 10mL。于紫外 498nm 波长处测定吸光度，以葡萄糖浓度 x 为横坐标，吸光度 y 为纵坐标，绘制标准曲线。根据以上步骤，得到葡萄糖标准曲线： $y=28.626x-0.2351$ ($R^2=0.9991$)

精密称取不同样品粉末各 10mg，加少量蒸馏水溶解后定容至 10mL，超声助溶后离心，取上清液为母液。取上述母液 0.5mL 于不同试管中，0.5mL 纯水作为空白对照，在各试管中加入纯水 1mL、DNS 试剂 3mL，摇匀后置于 100°C 水浴锅中加热 10min，取出后迅速冷却至室温，后移至 10mL 容量瓶中（多次用纯水冲洗试管）定容。用空白试剂调零，在 498nm 处测定吸光度。重复上述操作 1 次

3.3.3 5-HMF 含量测定

本次实验采用 HPLC 法测定各样品中 5-HMF 的含量。

供试品溶液的配制：取各样品冻干粉 10mg，用少量甲醇超声溶解后定容至 10mL 容量瓶中，放入离心机离心 20min，取上层清液，再用有机相滤头（0.45 μm）过滤到棕色进样瓶中。

5-HMF 对照品溶液的配制：精密称取适量的 5-HMF 对照品，配置成浓度为 0.10mg/mL 的 5-HMF 对照品溶液作为定性分析。

色谱条件：使用 ECOSIL-120-C18 色谱柱（以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，柱长为 250mm，内径 4.6mm，粒径为 5 μm）；流动相：水（B）-甲醇（A）；流速：1.0mL/min；检测波长：284nm；柱温：30℃；进样量：10 μl；理论塔板数按 5-HMF 峰计算应不低于 2500。梯度洗脱程序表见表 3。

表 3 洗脱程序表

洗脱时间（分钟）	甲醇占比（A）
0-5	5%-15%
6-10	15%-25%
11-20	25%-28%
21-25	28%-30%
26-35	30%-50%

峰面积测定：根据测量 5-HMF 对照品可得其色谱峰保留时间为 11.964 分钟，而供试品在相近的保留时间有峰面积较大的吸收峰，可判断该为 5-HMF 目标峰，因此需测量各个样品在该时间附近出现的色谱峰的峰面积。

3.4 吸光度测定

精密称取不同样品粉末各 5mg，加少量蒸馏水溶解后定容至 10mL，超声助溶后离心，取上清液在紫外 294nm、420nm、470nm 处测定吸光度。

3.5 pH 测定

供试液的制备: 精密称取不同样品粉末各 5mg，加少量蒸馏水溶解后定容至 10mL，超声助溶后离心，取上清液，为供试液。

pH 计的校正: 利用 pH 缓冲剂配置 pH=4.00 与 pH=6.86 的校正液，本次校正采用两点定位校正法，具体操作如下:

将 pH 计的电极套筒取出，用蒸馏水清洗电极头，再用一张吸水纸小心地将水吸走，再把探头放在 pH 值为 6.86 的标准缓冲剂中，让该溶液浸没电极头的玻璃球，然后轻轻地摇晃均匀，直到读值达到稳定为止；调整位置，当温度为 25 摄氏度时，酸碱度为 6.86。将该电极移除，洗涤并吸干水分，并将其置于一种 pH 值为 4.00 的缓冲剂中，并摇晃至读取值稳定，调整定位旋钮，使显示值为该溶液 25℃时标准 pH 值为 4.00。重复以上操作进行校正，直到两标准溶液的测量值与标准 pH 值基本相符为止。

pH 值测定: 将校正后的 pH 计用蒸馏水洗净，吸干，探头放入样品液中，轻轻摇匀，待读数稳定后记录读数，用蒸馏水将探头洗净，吸干后可测量下一个样品液的 pH 值。重复以上操作直至所有样品液测量完毕。

4 不同加热温度样品实验结果与分析

4.1 模拟陈化样品外观性状

类黑素为陈皮陈化的产物，类黑素越多，陈皮表面颜色越深。观察不同加热温度陈皮冻干粉可得，粉末为棕至棕褐色，粉末呈蓬松状，在相同加热时间的前提下，加热温度越高，陈皮冻干粉的颜色越深。由此可推测加热温度的升高能加速陈皮陈化反应的进程。

4.2 含量测定结果

4.2.1 氨基酸百分含量测定结果

不同加热温度的陈皮提取液在进行茚三酮显色法后，用空白试剂调零，在紫外 567nm 处测定吸光度，每个样品平行测定两次，取平均值。

将上述平均吸光度分别代入甘氨酸标准曲线计算其浓度，并根据百分含量公式计算出各样品的氨基酸百分含量。具体数据如表 4 所示。

甘氨酸标准曲线：回归方程： $y=131.05x-0.462$ ，相关系数： $R^2=0.9954$ ，单位：mg/mL

$$\text{百分含量 (\%)} = \left(\frac{\text{稀释倍数} \times \text{浓度 (mg/mL)} \times 1 \times 10 \times \frac{\text{粉末重量 (g)}}{\text{取样量 (g)}}}{10 \times 1000} \right) \times 100\%$$

表 4 不同加热温度陈皮冻干粉氨基酸浓度及百分含量计算

加热温度(°C)	粉末重量(g)	取样量(g)	平均吸光度	浓度(μg/mL)	稀释倍数	百分含量(%)
50	3.34	0.0102	0.576	7.917	10	2.592
60	3.71	0.0105	0.687	8.764	10	3.097
70	3.50	0.0105	0.640	8.409	10	2.803
80	3.18	0.0106	0.372	6.360	10	1.908
90	3.24	0.0105	0.359	6.261	10	1.932
100	2.89	0.0103	0.314	5.921	10	1.661

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。

如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/508040070142006054>