

# 基于质谱及分子对接探究大黄褐变机理

李东辉<sup>1,2</sup>, 吴红伟<sup>1,2</sup>, 李国峰<sup>1,2</sup>,  
杨新荣<sup>1,2</sup>, 司昕蕾<sup>1,2</sup>, 边甜甜<sup>1,2</sup>, 张育贵<sup>1,2</sup>, 李越峰<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>甘肃中医药大学; <sup>2</sup>甘肃省中药制药工艺工程研究中心, 兰州 730000

**摘要:**探究大黄发生的褐变反应及对大黄化学成分进行定性分析。采用 UPLC-MS/MS 技术对大黄化学成分进行分析和鉴定, 采用色差仪技术对大黄切面颜色进行测定, 采用 HPLC 技术检测各样品成分及底物没食子酸及产物的消长情况, 采用 LC-MS 技术检测褐变产物, 利用分子对接技术预测酪氨酸酶与没食子酸、儿茶素、表儿茶素、大黄素等的结合能力。大黄在鲜切晾干过程中各样品色谱峰峰面积呈不同程度地减少。UPLC-MS/MS 技术共鉴定出 30 种化合物, 主要包括酚酸类、蒽醌类、黄烷醇类以及其他类。大黄切面颜色及反应体系颜色变化明显, 底物没食子酸的峰面积减少明显, 并有新物质生成, 表明大黄发生了酶促褐变反应。分子对接结果表明酪氨酸酶与没食子酸、儿茶素、表儿茶素、大黄素等均具有较好的亲和力, 这为后续从蒽醌类物质出发探究酶促褐变与蒽醌类成分的联系提供一定基础。

**关键词:** 大黄; 颜色; 分子对接; 褐变反应

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)10-1666-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.10.004

## Investigation on browning mechanism of Rhei Radix et Rhizoma based on mass spectrometry and molecular docking

LI Dong-hui<sup>1,2</sup>, WU Hong-wei<sup>1,2</sup>, LI Guo-feng<sup>1,2</sup>,  
YANG Xin-rong<sup>1,2</sup>, SI Xin-lei<sup>1,2</sup>, BIAN Tian-tian<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu-gui<sup>1,2</sup>, LI Yue-feng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Gansu University of Chinese Medicine; <sup>2</sup>Gansu Province Chinese Medicine Pharmaceutical Process Engineering Research Center, Lanzhou 730000, China

**Abstract:** To explore the browning reaction of rhubarb and qualitatively analyze the chemical components of rhubarb. The chemical components of rhubarb were analyzed and identified by UPLC-MS/MS technology, the color of rhubarb cut surface was determined by colorimeter technology, and the ebb and flow of components, substrate gallic acid and products of each sample were detected by HPLC technology, and LC-MS technology was used. The browning products were detected, and the binding ability of tyrosinase to gallic acid, catechin, epicatechin, emodin, etc. was predicted by molecular docking technology. The chromatographic peak area of each sample of rhubarb decreased to varying degrees during the fresh-cut and air-drying process. A total of 30 compounds were identified by UPLC-MS/MS, mainly including phenolic acids, anthraquinones, flavanols and others. The color of the cut surface of rhubarb and the color of the reaction system changed obviously, the peak area of the substrate gallic acid decreased obviously, and new substances were formed, indicating that the rhubarb had an enzymatic browning reaction. The molecular docking results showed that the complex aminase had good affinity with gallic acid, catechin, epicatechin and rhodopsin, which provided some basis for further investigation of the relationship between enzymatic browning and anthraquinone components from anthraquinones subsequently.

**Key words:** rhubarb; color; molecular docking; browning reaction

收稿日期: 2022-04-08

接受日期: 2022-09-19

基金项目: 甘肃省中药制药工艺工程研究中心开放课题(ZYGY202003); 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室项目(2020GSMPA-KL15); 国家自然科学基金(82160750); 甘肃省教育厅产业支撑计划(2021CYZC-21)

\* 通信作者 Tel: 86-013519318028; E-mail: ldhjhy@163.com

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎<sup>[1]</sup>, 主要含有蒽醌类、鞣质类、酚酸类等成分, 具有泻下、抗炎、抑菌等药理作用<sup>[2]</sup>。已有研究表明色度学分析方法和机器视觉技术可客观评价药材颜色<sup>[3]</sup>。近年来, 大黄在化学成分、药理作用及产地加工等方面研究较多, 但对大黄颜色研究虽有涉及但并不全面。中药材如同果蔬类, 其颜色变化与酶促褐变及非酶促褐变密切相关<sup>[4]</sup>。酶促褐变是指在多酚氧化酶、过氧化物酶、氧化酶结合底物在有氧条件下反应形成醌, 醌类物质进一步聚合生成黑色素<sup>[5]</sup>。

多酚氧化酶 (polyphenol oxidases, PPO) 是存在于动物、植物及微生物中的一类含铜离子蛋白酶。多酚氧化酶主要包括酪氨酸酶 (tyrosinases)、儿茶酚氧化酶 (catechol oxidases) 及漆酶 (laccases) 具有催化酚类物质生成醌, 醌类物质与氨基酸、蛋白质发生亲核反应形成褐色聚合物<sup>[6]</sup>。过氧化氢酶 (catalase) 是一类金属酶, 其又是过氧化物酶体 (peroxidases, POD) 的标志酶, 约占过氧化物酶体酶总量的 40%<sup>[7]</sup>。过氧化物酶是植物在逆境条件下防御系统的关键酶之一, 可调控超氧化物歧化酶及过氧化氢酶水平, 具有氧化酚类化合物、清除过氧化氢和酚类、胺类毒性的作用, 研究也表明多酚类为过氧化物酶及多酚氧化酶的主要底物<sup>[8]</sup>。高效液相及质谱具有专属、灵敏度和准确性高的特点被广泛用于医药行业<sup>[9,10]</sup>。分子对接 (molecular docking) 是指利用计算机技术, 依据计算物理化学参数来预测配体 (蛋白质、DNA/RNA、小分子) 与受体蛋白生物大分子的结合模式及亲合力<sup>[11]</sup>。本文采用 HPLC 技术及色差仪技术研究大黄鲜切过程成分变化及切面颜色, 采用 UPLC-MS/MS 技术对大黄化学成分进行定性分析, 采用 HPLC 技术及 LC-MS 技术对体外模拟反应体系进行检测, 采用分子对接技术预测酪氨酸酶与没食子酸、儿茶素、大黄素等的结合能力, 这为后续从多酚类物质褐变反应转向蒽醌类物质褐变反应研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药材

新鲜大黄采自陇南市礼县石桥镇 (采购时间: 2021.11), 经甘肃中医药大学中药鉴定教研室王明伟副教授鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palma-*

*tum* L. 的新鲜根及新鲜根茎。

#### 1.1.2 试剂

甲醇、乙腈、磷酸 (色谱级, 天津市大茂化学试剂厂); 无水碳酸钠 (分析纯, 烟台市双双化工有限公司); 没食子酸 (CAS149-91-7), 由成都普思生物科技有限公司提供, 对照品质量分数均大于 98%; 多酚氧化酶 (CAS#9002-10-2)、过氧化氢酶 (CAS#9002-05-2) 均由合肥博美生物科技有限责任公司提供。

#### 1.1.3 仪器设备

SHIMADZU Nexera X2 超高效液相色谱仪 (岛津公司); AB4500 Q TRAP 质谱 (AB SCIEX 公司); 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); SC-10 色差仪 (深圳三恩驰科技有限公司); BT125D 型十万分之一分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); 1290-6460 液相串联三重四极杆质谱仪 (美国 Agilent 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 大黄样品制备

将大黄药材除去泥土、须根, 刮去外皮, 按《中国药典》(2020 版, 一部) 规定及本课题组前期研究基础<sup>[12]</sup> 切成厚度为 2.5 mm 的饮片, 将上述饮片分为 2.0 g 若干份, 晾干, 在 0、1/6、1/2、1、2、4、8、12、24、36 h 时间点 (0~36 h 内, 即晾干过程) 依次取上述样品标为 1~10 号。

### 1.2.2 基于色差仪的样品颜色测定

测定光源为 D65; 色彩空间为 CIE, Lab; 侦测器为硅光电二极管; 测量孔径  $\Phi = 4$  mm; 定位方式为光照定位和十字架定位; 光源为 LED 蓝光激发。为减少不同仪器间产生的误差, 故选定一张白纸为标准样品, 将“1.2.1”项 1~10 号样进行色度值测量, 重复测量 3 次, 取平均值, 按公式  $E^*ab = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  计算总色差值<sup>[13]</sup>。

### 1.2.3 基于 HPLC 技术的大黄样品测定

#### 1.2.3.1 供试品制备

将“1.2.1”项下 1~10 号样品依次切碎研细, 加 25 mL 甲醇于锥形瓶中, 称定质量, 超声 40 min, 冷却, 甲醇补足减失质量, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 并储存在样品瓶中进行测定分析。

#### 1.2.3.2 色谱条件

色谱柱 Eclipse Plus  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~15 min, 2%  $\rightarrow$  15% A; 15~20 min, 15%  $\rightarrow$

20% A; 20 ~ 30 min, 20% → 20% A; 30 ~ 60 min, 20% → 30% A; 60 ~ 80 min, 30% → 55% A; 80 ~ 90 min, 55% → 75% A; 90 ~ 95 min, 75% → 80% A; 95 ~ 100 min, 80% → 100% A; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 检测波长为 254 nm; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速 0.8 mL/min。将“1.2.3.1”项 1 ~ 10 号样按“1.2.3.2”条件进样测定。

#### 1.2.4 基于 UPLC-MS/MS 技术的大黄样品定性分析

##### 1.2.4.1 供试品制备

将“1.2.1”项下 10 号样品粉碎过 50 目筛, 取 1.0 g 加 25 mL 甲醇于锥形瓶中, 称定质量, 超声 40 min, 冷却, 甲醇补足减失质量, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 并储存在样品瓶中, 由上海拜谱生物科技有限公司进行测定分析。

##### 1.2.4.2 色谱条件

Agilent SB-C<sub>18</sub> (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ )。流动相由溶剂 A, 含 0.1% 甲酸的纯水, 以及溶剂 B, 含 0.1% 甲酸的乙腈组成。在 9 min 内, 对 5% A 和 95% B 进行线性梯度分析, 并将 5% A 和 95% B 保持 1 min。随后, 在 1.1 min 内调整为 95% A, 5.0% B 的成分, 并保持 2.9 min。流速设定为每分钟 0.35 mL; 柱温设定为 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量为 4  $\mu\text{L}$ 。流出物与 ESI-三重四极杆线性离子阱 (QTRAP)-MS 交替连接。

##### 1.2.4.3 质谱条件

离子源, 涡轮喷射; 源温度 550  $^{\circ}\text{C}$ ; 离子喷射电压 (IS) 5 500 V (正离子模式) / -4 500 V (负离子模式); 离子源气体 I (GSI)、气体 II (GSII)、帘气 (CUR) 分别设置为 50、60 和 25.0 psi; 碰撞激活解离 (CAD) 为高, 碰撞气体 (氮气) 设置为中等, 每个离子对是根据优化的去簇电压 (DP) 和碰撞能 (CE) 进行扫描。

##### 1.2.4.4 数据处理及分析

利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据。通过筛选出每个物质的特征离子, 在检测器中获得特征离子的信号强度, 用 MuliaQuant 软件打开样本下机质谱文件, 进行色谱峰的积分和校正工作。检索 Massbank (<http://www.massbank.jp>) 数据库及上海拜谱生物科技有限公司自建数据库进行成分结构鉴定。

#### 1.2.5 溶液制备

##### 1.2.5.1 粗酶液制备

将“1.2.1”项下 1 号样品迅速切碎研细于 (已冰浴) 研钵中, 加入 10 mL 预冷的 pH 7.0 磷酸盐缓

冲液, 在 4  $^{\circ}\text{C}$ , 10 000 r/min 条件下高速离心 15 min, 得上清液即为粗酶液<sup>[14]</sup>。

##### 1.2.5.2 多酚氧化酶液及过氧化氢酶液的制备

称取 5.00 mg 多酚氧化酶固体及 5.00 mg 过氧化氢酶固体以蒸馏水分别定容于 5 mL 容量瓶中即得。

##### 1.2.5.3 反应底物的配制

称取没食子酸 25.00 mg, 加蒸馏水定容至 5 mL, 即得对照品溶液。取配置好的对照品溶液 1 mL 以蒸馏水稀释至 2 mL 作为没食子酸反应液。

##### 1.2.6 体外模拟褐变反应体系的构建

将试管标记为 A<sub>0</sub> (反应组)、A<sub>1</sub> (对照组)。A<sub>0</sub>: 0.5 mL 没食子酸反应液 + 0.5 mL 多酚氧化酶液 (或粗酶液) + 2 mL pH 7.0 磷酸缓冲液, A<sub>1</sub>: 0.5 mL 没食子酸反应液 + 0.5 mL 蒸馏水 + 2 mL pH 7.0 磷酸缓冲液, 设定反应体系温度为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 以构建多酚氧化酶与没食子酸的体外反应体系。分别在反应 0 h、36 h 时取样 1 mL, 加入等体积的甲醇, 终止反应, 即为不同反应时间点测定组<sup>[15]</sup>。

将试管标记 B<sub>0</sub> (反应组)、B<sub>1</sub> (对照组)。B<sub>0</sub>: 0.5 mL 没食子酸反应液 + 0.5 mL 过氧化氢酶液 (或粗酶液) + 2 mL pH 8.0 磷酸缓冲液, B<sub>1</sub>: 0.5 mL 没食子酸反应液 + 0.5 mL 蒸馏水 + 2 mL pH 8.0 磷酸缓冲液, 设定反应体系温度为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 构建过氧化氢酶与没食子酸的体外反应体系。分别在反应 0 h、36 h 时取样 1 mL, 加入等体积的甲醇, 终止反应, 即为不同反应时间点的测定组<sup>[15]</sup>。

##### 1.2.7 基于 HPLC 技术分析酶促褐变反应

Eclipse Plus C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0 ~ 5 min, 2% → 10% A; 5 ~ 10 min, 10% → 15% A; 10 ~ 40 min, 15% → 90% A。进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 检测波长 320 nm; 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速为 1 mL/min。采用 HPLC 法对各反应体系 0 h 及 36 h 反应体系液的底物与产物进行测定分析。

##### 1.2.8 基于 LC-MS 技术分析酶促褐变反应

色谱条件: 色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> (2.1 mm  $\times$  50 mm  $\times$  1.8  $\mu\text{m}$ ), 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ , 流速 0.3 mL/min, 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 流动相为 0.1% 的甲酸水 (A)-甲醇 (B), 以 10% A 及 90% B 等度洗脱 2 min。

质谱条件: AJS ESI 源, 正离子模式。干燥气温度为 325  $^{\circ}\text{C}$ , 干燥气流速为 5 L/min, 雾化气压力为

45 psi,鞘气温度为 300 ℃,鞘气流速 11 L/min,毛细管电压为 3 500 V。对 36 h 时反应体系液褐变产物进行质谱分析。

### 1.2.9 基于分子对接技术的关键酶与底物亲和力预测

多酚氧化酶包括酪氨酸酶、儿茶酚氧化酶及漆酶。酪氨酸酶(EC 1.14.18.1, tyrosinase, TYR)是一种结构复杂的含多亚基的含铜氧化还原酶,也是调控黑色素生成的限速酶,广泛存在于微生物、动植物和人体中,这种酶参与黑色素合成可将单酚羟基化为二酚,将邻二酚氧化为邻二醌,邻二醌再反应后为黑色素,如马铃薯切片暴露在空气中出现变黑现象<sup>[16]</sup>。因此,本文以酪氨酸酶为关键酶分别与多酚类成分(没食子酸、儿茶素、表儿茶素)及蒽醌类成分(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)进行对接。配体与受体可自发结合的条件为分子与靶标蛋白的最低结合能均小于 0,参考相关文

献<sup>[17]</sup>在 PDB 数据库中查找关键蛋白酪氨酸酶的 PDB ID 为:2Y9X,在 Pubchem 数据库查找活性小分子的 2D 结构(sdf 格式),采用 Maestro 10.2 软件进行对接。

## 2 结果与分析

### 2.1 大黄切面颜色

1~10 号样在 36 h 内,颜色由棕黄色变为黑褐色(见图 1),表明大黄在鲜切晾干过程中发生酶促褐变导致大黄切面颜色变化明显。 $L^*$  值从 54.22 变为 28.91,  $a^*$  值从 18.48 变为 10.15,  $b^*$  值从 45.77 变为 20.72,总色度  $E^* ab$  值从 73.32 变为 36.98。(见表 1)。实验结果也表明大黄在鲜切初期,其颜色及水分变化明显,后期逐渐减慢,这可能是因为鲜大黄的体内含水量高新陈代谢活跃,其后在水分快速下降的同时,大黄机体启动抗旱机制,促使酶活力降低,颜色变化缓慢。36 h 后样品质量、水分及颜色均不发生明显变化,故以 36 h 为实验结点。

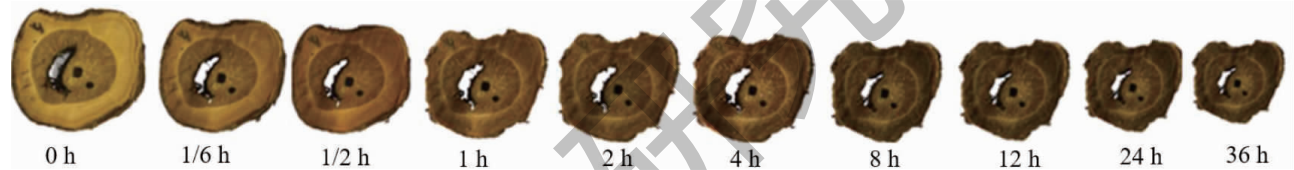


图 1 大黄切面颜色

Fig. 1 Color of rhubarb cut surface

注:从左到右依次编号为 1~10。Note: The numbers are 1-10 from left to right.

表 1 各样品颜色色度值

Table 1 Color chroma values for each sample

编号 No.	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^* ab$
1	54.22	18.48	45.77	73.32
2	46.40	18.83	44.28	66.84
3	39.84	16.63	36.30	56.41
4	36.31	16.30	32.40	51.32
5	34.84	14.08	27.39	46.51
6	33.16	14.01	27.26	44.86
7	31.92	13.21	26.42	43.19
8	31.66	13.01	24.79	42.26
9	30.86	11.3	21.27	39.14
10	28.91	10.15	20.72	36.98

### 2.2 各样品成分动态变化

由图 2 可知,不同晾干时间点的大黄样品色谱峰峰面积呈不同程度的减少。前 30 min 内各成分

峰面积出现一定程度的增加,其后逐渐减少,这可能是因为组织细胞遭受机械破坏后,细胞内容物流出量增加导致各成分峰面积呈现短暂上升趋势,同时

褐变关键酶与内容物相接触,在氧气的帮助下,酶促褐变反应加快,有效成分减少,其后由于水分流失,

大黄机体启动抗旱早机制,酶活力降低,有效成分变化缓慢。综上,大黄在此过程中样品色谱峰面积减少。

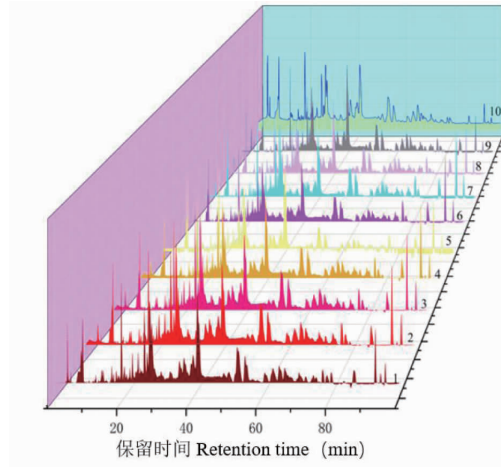


图2 1~10号样品色谱图

Fig. 2 Chromatograms of samples 1-10

## 2.3 质谱分析结果

### 2.3.1 大黄样品正负离子模式

大黄样品在正负离子模式下的总离子流图示于图3。

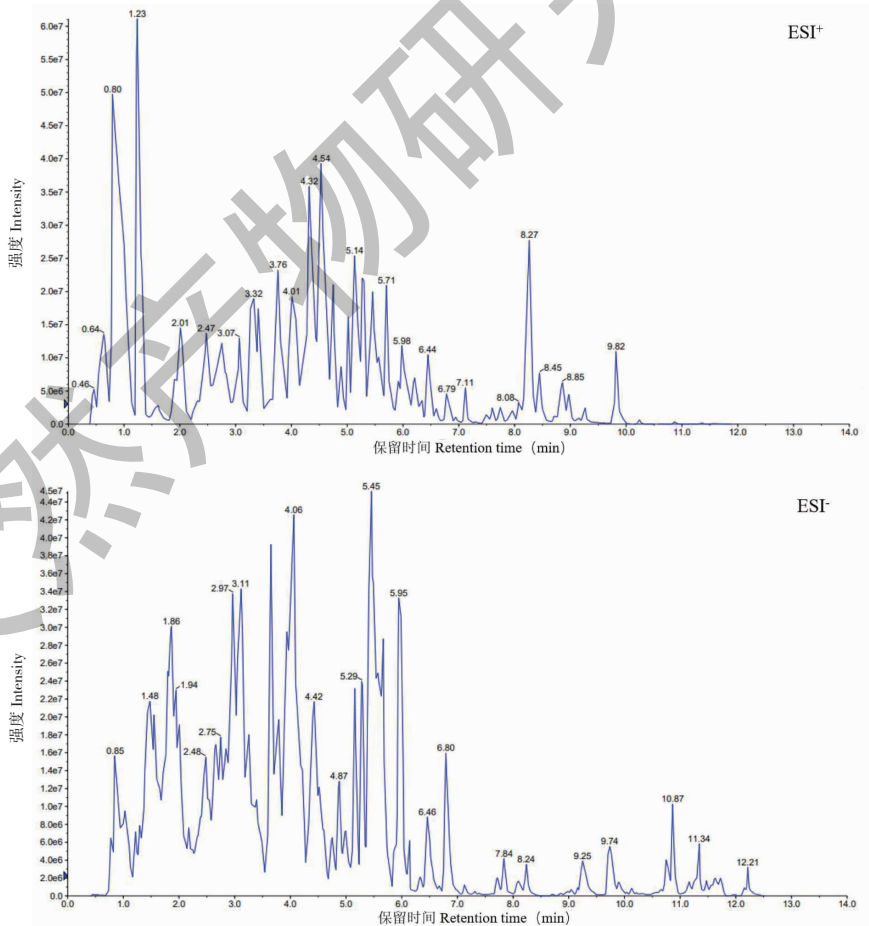


图3 大黄样品正负离子模式下 TIC 图

Fig. 3 TIC diagram of rhubarb sample in positive and negative ion mode

### 2.3.2 大黄样品化学成分鉴定

以正离子模式下相对保留时间为 1.83 min 的  $m/z$  169.01 的碎片离子为例,说明大黄样品中不同化合物的鉴定过程。 $m/z$  169.01 碎片离子的 MS<sup>2</sup> 光谱如图 4A 所示。根据  $m/z$  值计算得该化合物的可能元素组成为 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>,在此基础上与整个数据库

中的参考化合物进行比较,并将碎片离子  $m/z$  169.01、125.02 及其相应强度与数据库中录入的参照化合物进行比较。根据上述化合物信息的对比分析,该化合物被鉴定为没食子酸,其裂解方式如图 4B 所示。

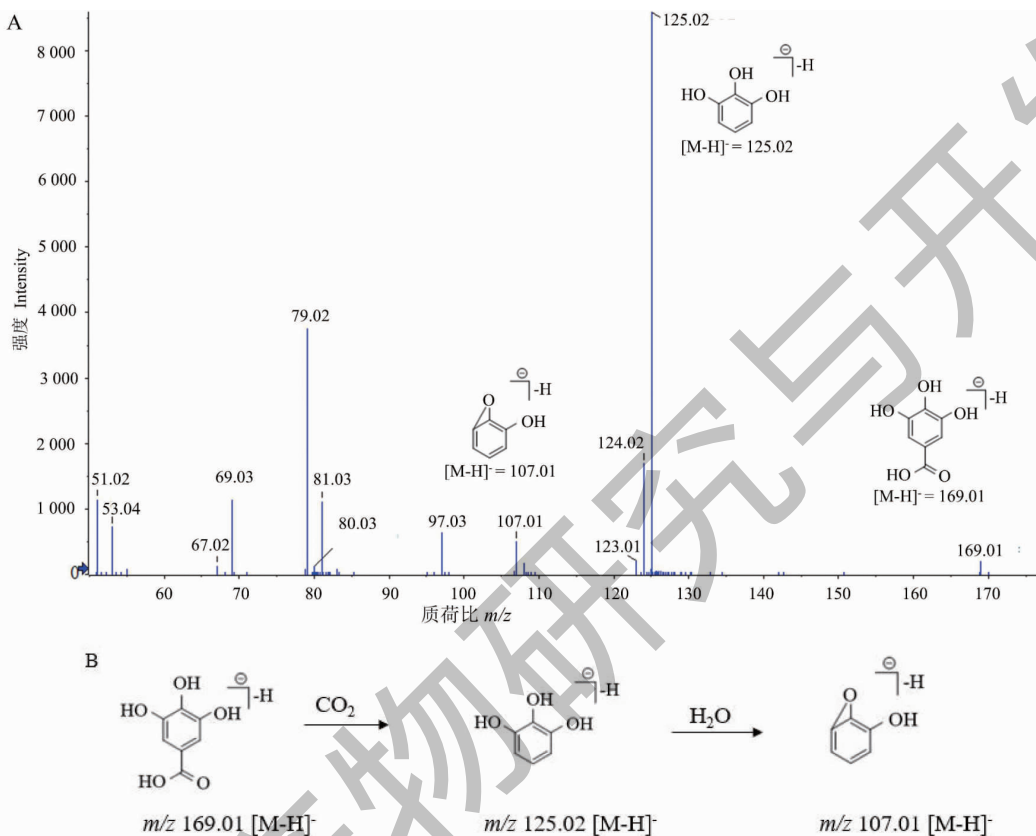


图 4 正离子模式下没食子酸二级质谱图及裂解方式图

Fig. 4 Secondary mass spectra of gallic acid in positive ion mode and cleavage mode

以正离子模式下相对保留时间为 7.88 min 的  $m/z$  269.05 的碎片离子为例,说明大黄样品中不同化合物的鉴定过程。 $m/z$  269.05 碎片离子的 MS<sup>2</sup> 光谱如图 5A 所示。根据  $m/z$  值计算得该化合物的可能元素组成为 C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>,在此基础上与整个数据库中的参考化合物进行比较,并将碎片离子  $m/z$  269.05、225.05 及其相应强度与数据库中录入的参照化合物进行比较。根据上述化合物信息的对比分析,该化合物被鉴定为大黄素,其裂解方式如图 5B 所示。参照上述大黄素鉴定方法,其他化合物的鉴定结果见表 2。

表 2 结果所示,大黄样品中共鉴定出 30 种化合

物,主要包括酚酸类、蒽醌类、黄烷醇类以及其他类。

### 2.4 反应体系颜色

由图 6 可知,粗酶液与没食子酸反应前后颜色变化明显,如图 6A,从黄棕色变为黑褐色,表明酶类与没食子酸发生褐变反应导致体系颜色明显变化。考虑到提取的粗酶种类复杂,因此,分别构建没食子酸与多酚氧化酶液及过氧化氢酶液的反应体系,以便对后续底物与产物消长情况进行分析。实验结果也表明在多酚氧化酶液反应体系中,体系液由近无色转变为黑褐色,反应至 36 h 后体系颜色呈黑褐色,如图 6B;同样过氧化氢酶液反应体系颜色变化如图 6C 所示。

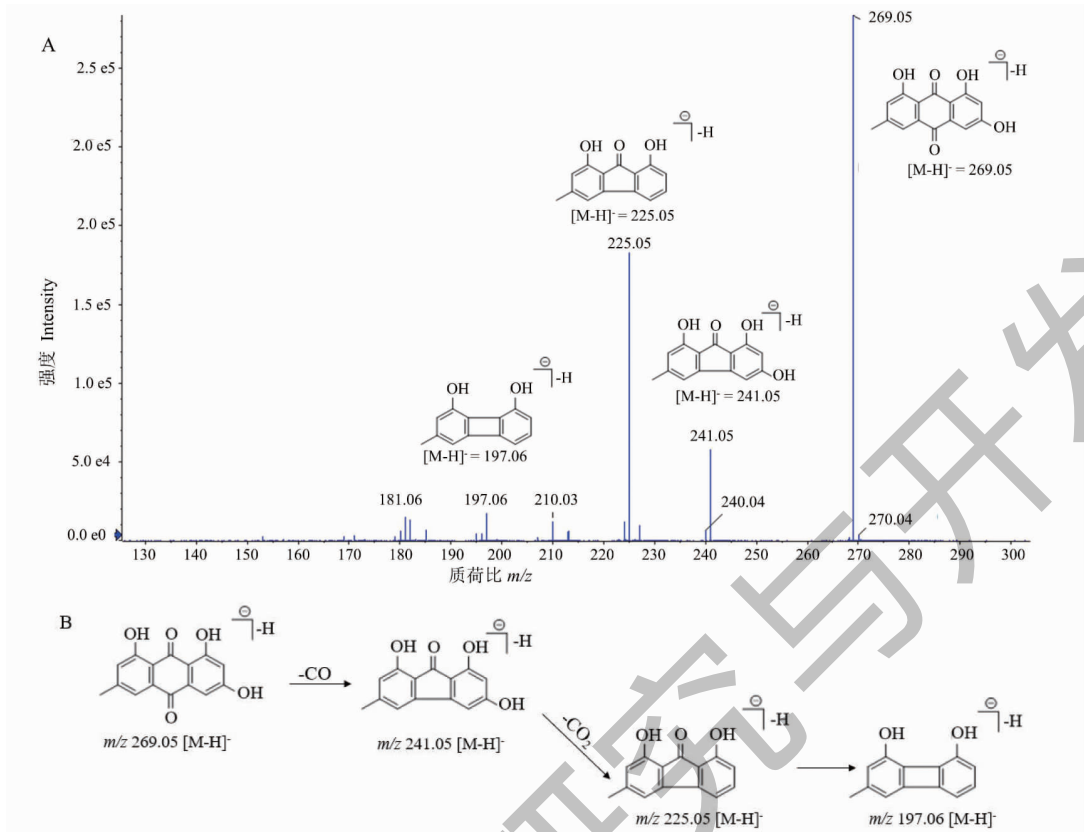


图5 正离子模式下大黄素二级质谱图及大黄素裂解方式图

Fig. 5 Secondary mass spectra of rhodopsin in positive ion mode and cleavage mode of rhodopsin

表2 化合物鉴定及数据归属

Table 2 Compound identification and data attribution

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	加合离子 Adduct ion	碎片离子峰 Fragmentation ( $m/z$ )	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	分类 Classification
1	0.44	$[M+H]^+$	140.00, 99.00	$C_6H_5NO_3$	4-硝基苯酚 4-Nitrophenol	酚酸类
2	1.22	$[M+H]^+$	124.04, 78.00	$C_6H_5NO_2$	烟酸 Nicotinic acid	维生素
3	1.83	$[M-H]^-$	169.01, 125.00	$C_7H_6O_5$	没食子酸 Gallic acid	酚酸类
4	2.33	$[M+H]^+$	127.04, 81.03	$C_6H_6O_3$	1,3,5-苯三酚 1,3,5-Benzenetriol	酚酸类
5	3.03	$[M-H]^-$	321.00, 125.00	$C_{14}H_{10}O_9$	双没食子酸 Digallic acid	酚酸类
6	3.13	$[M+H]^+$	291.09, 139.04	$C_{15}H_{14}O_6$	儿茶素 (+)-Catechin	黄烷醇类
7	3.13	$[M+H]^+$	291.09, 139.04	$C_{15}H_{14}O_6$	表儿茶素 Epicatechin	黄烷醇类
8	3.19	$[M-H]^-$	137.03, 108.02	$C_7H_6O_3$	水杨酸 Salicylic acid	酚酸类
9	3.23	$[M-H]^-$	577.14, 407.10	$C_{30}H_{26}O_{12}$	原花青素 B <sub>2</sub> Procyanidin B <sub>2</sub>	鞣质
10	3.27	$[M-H]^-$	183.03, 124.00	$C_8H_8O_5$	3-O-甲基没食子酸 3-O-Methylgallic acid	酚酸类
11	3.37	$[M-H]^-$	109.03, 81.00	$C_6H_6O_2$	儿茶酚 Pyrocatechol	酚酸类
12	3.69	$[M-H]^-$	861.19, 699.15	$C_{42}H_{38}O_{20}$	番泻苷 B Sennoside B	蒽醌
13	4.55	$[M-H]^-$	431.10, 269.00	$C_{21}H_{20}O_{10}$	芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷 Aloeemodin-8-O-glucoside	蒽醌
14	5.17	$[M-H]^-$	431.10, 269.05	$C_{21}H_{20}O_{10}$	大黄素-6-O-葡萄糖苷 Emodin-6-O-glucoside	蒽醌
15	5.17	$[M-H]^-$	431.10, 269.00	$C_{21}H_{20}O_{10}$	大黄素-8-O-葡萄糖苷 Emodin-8-O-glucoside	蒽醌

续表 2(Continued Tab. 2)

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	加合离子 Adduct ion	碎片离子峰 Fragmentation ( $m/z$ )	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	分类 Classification
16	5.20	[M-H] <sup>-</sup>	257.09, 241.06	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	异丹叶大黄 Isorhapontigenin	其他类
17	5.20	[M-H] <sup>-</sup>	257.08, 241.06	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	丹叶大黄素 Rhapontigenin	其他类
18	5.67	[M-H] <sup>-</sup>	445.12, 283.07	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	大黄素甲醚-1- <i>O</i> -葡萄糖苷 Physcion-1- <i>O</i> -glucoside	蒽醌
19	5.68	[M-H] <sup>-</sup>	445.11, 283.07	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	大黄素甲醚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷 Physcion-8- <i>O</i> -glucoside	蒽醌
20	6.76	[M-H] <sup>-</sup>	283.03, 239.00	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	大黄酸 Rhein	蒽醌
21	6.80	[M-H] <sup>-</sup>	269.05, 239.70	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	芦荟大黄素 Aloe emodin	蒽醌
22	7.86	[M+H] <sup>+</sup>	253.05, 225.05	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	蒽醌-2-甲酸 Anthraquinone-2-carboxylic acid	蒽醌
23	7.88	[M-H] <sup>-</sup>	269.05, 225.00	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	大黄素 Emodin	蒽醌
24	7.89	[M-H] <sup>-</sup>	269.05, 225.00	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	异大黄素 Isoemodin	蒽醌
25	8.00	[M+H] <sup>+</sup>	209.06, 152.06	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	9,10-蒽醌 9,10-Anthraquinone	蒽醌
26	9.27	[M+H] <sup>+</sup>	255.07, 181.10	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	大黄酚 Chrysophanol	蒽醌
27	9.44	[M-H] <sup>-</sup>	523.11, 254.06	C <sub>30</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	番泻苷元 C Sennidin C	其他类
28	9.64	[M-H] <sup>-</sup>	297.08, 254.00	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	大黄素-6,8-二甲醚 Emodin-6,8-dimethyl ether	蒽醌
29	9.77	[M-H] <sup>-</sup>	283.06, 240.04	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	大黄素-3-甲醚 Physcion	蒽醌
30	10.87	[M-H] <sup>-</sup>	239.07, 223.03	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	大黄酚-9-蒽酮 Chrysophanol-9-anthrone	蒽醌

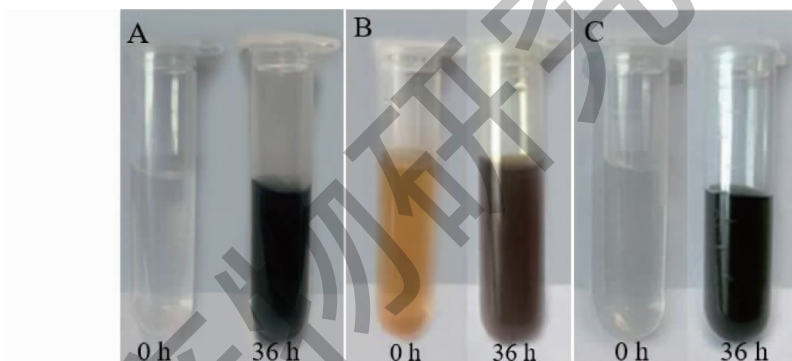


图 6 反应体系颜色

Fig. 6 Color of reaction system

## 2.5 多酚氧化酶液与没食子酸反应分析

### 2.5.1 多酚氧化酶液与没食子酸反应的 HPLC 分析

由图 7 可知,反应 0 min 的 HPLC 谱图上只检测到了没食子酸成分的存在,如图 7A,当反应体系在 36 h 没食子酸含量比 0 min 明显降低,并检测到新峰的出现,即为多酚氧化酶与没食子酸反应产生的新物质。如图 7B。随着时间的延长, A<sub>1</sub> 组因不存在多酚氧化酶且体系液中不发生酶促褐变反应,没食子酸含量在不同时间点几乎不变,而 A<sub>0</sub> 组中在不同的时间点没食子酸含量逐渐减少,36 h 后基本检测不到没食子酸成分。结合图 8 得出,随着体系反应时间的延长,没食子酸峰面积从初始的 2801 变

为 113.3,最终消耗殆尽,而产物的含量基本保持不变。因此,可以确定多酚氧化酶与没食子酸发生了酶促褐变促使整个反应体系颜色加深。

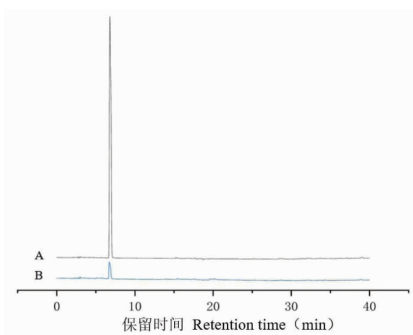


图 7 反应体系 HPLC 图谱

Fig. 7 HPLC chromatogram of the reaction system



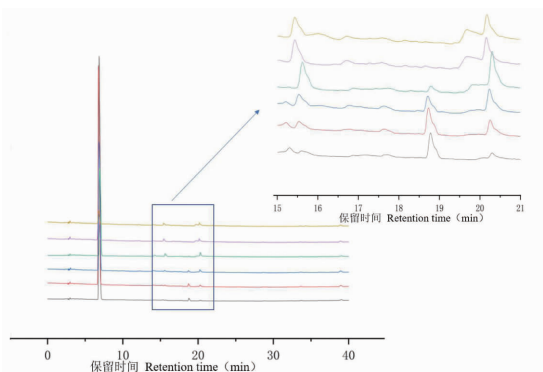


图8 反应体系 HPLC 局部放大谱图

Fig. 8 Local amplification chromatogram of the reaction system by HPLC

### 2.5.2 基于 LC-MS 技术分析多酚氧化酶液与没食子酸的氧化产物

对 36 h 的反应液进行初步分析发现,在 36 h 体系液有  $m/z$  130.20、200.20、304.00、418.80、585.10、701.30、814.50 的物质(见图 9),表明反应体系发生了褐变反应且有新物质生成。

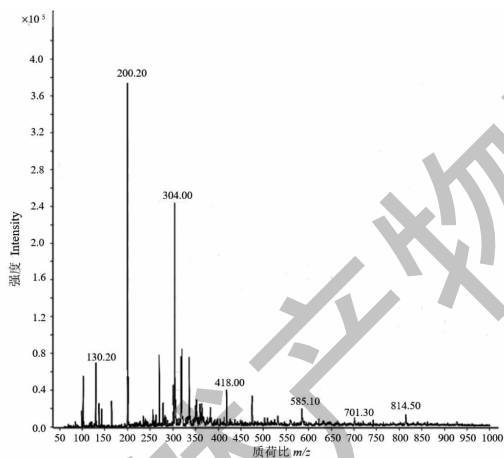


图9 质谱图

Fig. 9 The MS spectrum

## 2.6 过氧化氢酶液与没食子酸的反应分析

### 2.6.1 过氧化氢酶液与没食子酸的 HPLC 分析

0 h 的 HPLC 谱图上只检测到了没食子酸成分存在(见图 10A),反应 36 h 的谱图上没食子酸含量比 0 h 明显降低。如图 10B,并检测到 2 个新峰的出现,即为过氧化物酶与没食子酸反应的新物质。实验结果也表明随着时间的延长, $B_1$  组因无过氧化物酶不发生酶促褐变反应,不同时间点没食子酸含量几乎不变,而  $B_0$  组中没食子酸含量随着时间的延长

逐渐减少,实验结果也表明没食子酸的峰面积从 2701 降到 152,最终消耗殆尽,而产物的含量基本不变。因此,过氧化氢酶与没食子酸发生了酶促褐变导致反应体系颜色变化明显。

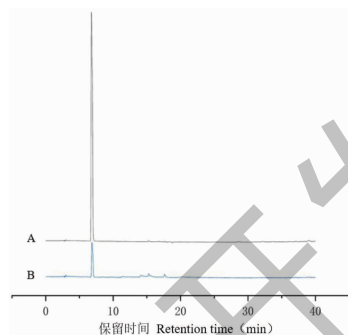


图10 反应体系 HPLC 图谱

Fig. 10 HPLC chromatogram of the reaction system

### 2.6.2 基于 LC-MS 技术分析多酚氧化酶液与没食子酸的氧化产物

对 36 h 的反应液分析发现,在 36 h 时体系液  $m/z$  130.20、200.20、304.00、418.80、531.50、585.10、701.30、814.50(见图 11)。这说明反应体系发生了褐变反应且有新物质出现,也可能是酶促褐变反应是不断氧化的过程导致其褐变产物的物质结构及分子量不断发生变化的结果。

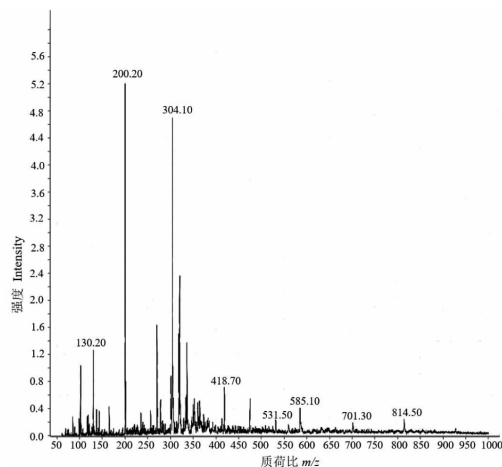


图11 质谱图

Fig. 11 The MS spectrum

## 2.7 对接结果

对接结果如图 12 及图 13 所示,其更加直接反应了化合物与蛋白残基形成的氢键作用和疏水(堆积)作用。结果表明最低结合能均小于 0,表示酪氨酸酶与没食子酸等可发生相互作用(见表 3)。

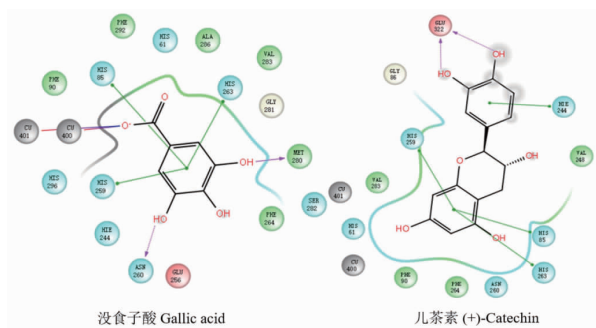


图 12 与酪氨酸分子对接 2D 图

Fig. 12 2D diagram of molecule docking with tyrosine

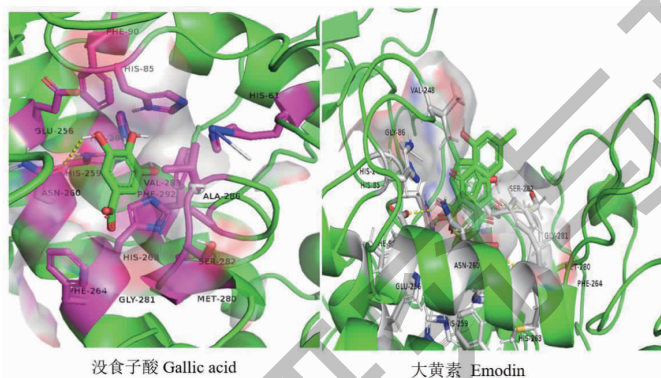


图 13 酪氨酸分子对接 3D 图

Fig. 13 3D diagram of molecule docking with tyrosine

表 3 与酪氨酸酶对接结果

Table 3 Docking result with tyrosinase

化合物 Compound	分子式 Molecular formula	相对分子质量 Relative molecular mass	CAS 号 CAS NO	结合能 Binding energy (kJ/mol)
没食子酸 Gallic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170.12	149-91-7	-25.978
儿茶素 (+)-Catechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.27	14941-08-3	-26.551
表儿茶素 Epicatechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.27	17334-50-8	-21.258
芦荟大黄素 Aloecemodin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.24	481-72-1	-22.062
大黄酸 Rhein	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	284.22	478-43-3	-35.367
大黄素 Emodin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.24	518-82-1	-20.661
大黄酚 Chrysophanol acid	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	254.24	481-74-3	-24.066
大黄素甲醚 Emodin-3-methyl ether	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284.26	521-61-9	-18.137

### 3 结论与讨论

中药材采收加工是药材品质形成的重要环节。大黄在采收加工过程中易遭受不同程度的机械破坏,使其有效成分含量、外观、颜色、水分、质量均发生显著变化<sup>[3]</sup>。实验结果表明,鲜大黄横切面呈黄色,其后颜色逐渐加深至黑褐色。色差仪测定结果表明  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  及  $E^* ab$  值变化明显。UPLC-MS/

MS 结果表明大黄主要含有酚酸类、蒽醌类、黄烷醇类以及其他类成分。分子对接结果也表明酪氨酸酶与多酚类及蒽醌类均具有强结合力,这也为后续从蒽醌类成分出发探究褐变机理提供了思路。结果表明大黄鲜切初期颜色变化明显,后期逐渐减慢,这可能是因为水分快速下降的同时,大黄机体启动抗干旱机制,其通过自身调节来适应干旱胁迫,进而促使

酶促反应减弱,颜色变化缓慢,有效成分减少变慢<sup>[18]</sup>。实验结果也表明多酚氧化酶液、过氧化氢酶与没食子酸的体系颜色变化明显,底物没食子酸含量逐渐减少直至消失,并有新产物出现。鉴于此,后续可采用中药化学手段,采用制备液相分离制备褐变产物,并将分离的褐变产物采用核磁共振光谱及波谱手段确定化合物的结构。

酶促褐变包括多酚氧化酶及过氧化物酶,多酚类成分为过氧化物酶和多酚氧化酶主要褐变底物<sup>[19]</sup>。大黄含有多糖类成分、氨基酸类成分、酚酸类成分、蒽醌类等成分<sup>[1]</sup>,这为大黄发生酶促褐变反应提供了条件。大黄与菊花如同,富含酚酸类成分,在受到机械破坏后,酚类物质、酶及氧气三者相互接触发生褐变反应,颜色变化明显<sup>[15]</sup>。现有研究表明果蔬类及中药材在加工和储藏过程也易发生褐变反应,如富含没食子酸、儿茶素、表没食子、儿茶素等成分是苹果、梨、猕猴桃、马铃薯等发生褐变的主要底物<sup>[20]</sup>。目前,多酚氧化酶与过氧化物酶被认为是含多酚类物质的药材及蔬果发生褐变的主要原因。因此,在大黄的采收加工过程中,可通过抑制关键酶活性降低对底物成分的消耗,阻止酶促褐变现象的发生。多酚氧化酶又包括酪氨酸酶、儿茶酚氧化酶及漆酶,后续可分别以酪氨酸酶、儿茶酚氧化酶及漆酶为关键酶分别与底物没食子酸、儿茶素、表儿茶素、大黄素等物质反应,以中药化学手段最终鉴定产物结构,以推测褐变反应的可能机理<sup>[21]</sup>。本文从宏观角度采用色差仪量化大黄颜色,其次从化学成分峰面积变化角度出发说明大黄发生酶促褐变过程。综上,多酚氧化酶和过氧化物酶是引起褐变的主要反应,在大黄采收加工过程中可以抑制多酚氧化酶及过氧化物酶的活性,从而有效提升大黄药材的品质,同时也为其他富含酚类药材酶促褐变的控制提供思路。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 24.
- 2 Wang Y, Yang X, Xia PF, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Rhei Radix* et *Rhizoma* and predictive analysis on quality markers[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2019, 50: 4821-4837.
- 3 Xu MF, Wu ZS, Liu XN, et al. Quality evaluation method for

Chinese medicine based on color grading[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2016, 41: 177-181.

- 4 Yu F, Wang N, Li YH, et al. Analysis on change rule and mechanism in physical and chemical properties of Chinese herbal medicines during drying[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2021, 52: 2144-2153.
- 5 Mclarin MA, Leung IK H. Substrate specificity of polyphenol oxidase[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2020, 55: 274-308.
- 6 Ciou JY, Lin HH, Chiang PY, et al. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in the browning of water caltrop pericarp during heat treatment[J]. *Food Chem*, 2011, 127: 523-527.
- 7 Qiao L, Han X, Wang H, et al. Novel alternative for controlling enzymatic browning: catalase and its application in fresh-cut potatoes[J]. *J Food Sci*, 2021, 86: 3529-3539.
- 8 Wang L, Tang T, Wang W, et al. Multi-omics landscape of DNA methylation regulates browning in "Fuji" apple[J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 800489.
- 9 Wang YH, Wang ZP, Xie TF, et al. Application of UOLC-Q-TOF-MS technique to the study of traditional Chinese medicine and herbal compound preparations[J]. *China Pharm*(中国药师), 2022, 25: 114-118.
- 10 Zan LF, Fan YG, Bao HY, et al. Characterization of chemical compositions from the wild and cultivated *Sanguangporus vaninii* based on UPLC-QTOF-MS[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2021, 33: 1818-1828.
- 11 Zhuang H, Ding JR, Zhang XK. Exploration of the potential mechanism of Mori Cortex on treating diabetic peripheral neuropathy based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2022, 34: 121-132.
- 12 Xin ED, Si XL, Bian TT, et al. Comparative study on fresh - cut processed and traditional processed rhubarb[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2020, 31: 1368-1370.
- 13 Cai CC, Mao M, Yuan JF, et al. Correlation between color of *Scutellariae Radix* pieces and content of five flavonoids after softening and cutting by different methods[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44: 4467-4475.
- 14 Li J, Lu Y, Liu YX, et al. Comparison of enzymatic characteristics of polyphenol oxidase in different varieties of potato[J]. *Food Sci Technol*(食品科技), 2020, 45: 218-223.
- 15 Zhu YY. Study on the effect of enzymatic browning on the quality of chrysanthemum[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine(安徽中医药大学), 2018.
- 16 Gong HL, Zhao P, Yuan HJ, et al. Study on the changes of browning degree and polyphenol oxidase activity of potato

- during storage[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2009,30:281-282.
- 17 Chen RD. Inhibition of tyrosinase activity and its mechanism by anthocyanidins from Zijuan tea[D]. Changchun: Changchun Normal University(长春师范大学), 2021.
- 18 Chang X. Study advances on the physiological adaptation mechanism to drought stress by plant[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2008,36:7549-7551.
- 19 Li CY, Li H, Yan SL, et al. Progress in research on the mechanism of enzymatic browning in fruits and vegetables[J]. J. Food Sci(食品科学), 2021,42:283-292.
- 20 Liu F, Zhao JH, Zhu MH, et al. Advances in research of the structure and browning mechanism of polyphenol oxidase[J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2015,36:113-119.
- 21 Schieber A. Reactions of quinones-mechanisms, structures, and prospects for food research[J]. J Agric Food Chem, 2018,66:13051-13055.

## 《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊	欧阳杰
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun	OUYANG Jie
易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚
YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang
高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武
GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu
蓝蔚青	廖晨钟	薛永波			
LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo			