

沙苑子酒酿造过程中黄酮类化合物的鉴定与 含量变化规律

Identification and variation of flavonoid content of semen *Astragali complanati* wine in the brewing process

范学辉^{1,2}

张清安²

田呈瑞²

FAN Xue-hui^{1,2} ZHANG Qing-an² TIAN Cheng-rui²

(1. 陕西师范大学体育学院, 陕西 西安 710062; 2. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062)

(1. College of Sports, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China;

2. School of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

摘要:采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 的比色法测定沙苑子酒总黄酮含量, 采取高效液相色谱法检测酒中的 5 种黄酮类物质含量的变化, 研究经不同处理的沙苑子在酿造过程中黄酮类化合物的含量变化。结果表明: 沙苑子酒在酿造过程中, 除鼠李柠檬素外, 其他 4 种黄酮成分含量基本呈先上升后下降的趋势, 与总黄酮变化趋势一致; 在酿造过程中处理组与未处理组相比, 除杨梅苷外, 其他 4 种黄酮单体含量均高。酿造前将沙苑子浸渍萌发炒制处理能使黄酮含量提高, 从而提高酒的质量。

关键词: 沙苑子; 酒; 黄酮; 高效液相色谱 (HPLC)

Abstract: Purpose: The total flavonoids content was determined by the colorimetric method of $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$, and the changes of the contents of five kinds of flavonoids were detected by the high performance liquid chromatography (HPLC) to study on the content of flavonoids in the brewing process of the different processing of the semen *astragali complanati*, which provided an important reference for the brewing and quality control. Results: The contents of other flavonoids in semen *A. complanati* showed a increase trend in the beginning, then followed by a decrease, which was consistent with the changing trend of total flavonoids. Compared with the untreated group, all the contents of flavonoids in the treated group were higher in the brewing process except myricitrin. Conclusion: The flavonoids

content could be improved by soaking and germination of semen *A. complanati* before brewing.

Keywords: semen *Astragali complanati*; wine; flavonoids; high performance liquid chromatography (HPLC)

沙苑子为豆科植物扁茎黄芪的干燥成熟种子, 是补益肝肾的传统中药, 主要含黄酮类、有机酸类、蛋白质、多糖类等成分^[1-2]。其中黄酮类化合物是一组存在于植物体中的天然次级代谢产物, 绝大多数植物都能合成, 到目前为止, 已发现 2 000 多种, 常以游离态或糖苷形式存在, 少数以游离形式存在^[3]。研究^[4-5]表明, 黄酮类化合物具有抗癌、抗肿瘤、抗心血管疾病、抗炎镇痛、免疫调节、降血糖、治疗骨质疏松、抑菌、抗病毒、抗氧化、抗衰老以及抗辐射等生物活性。因此, 黄酮类化合物已成为国内外医药界研究的热点之一, 是具有广泛开发与应用前景的天然药物成分^[6], 有着广阔的市场前景。

目前, 沙苑子的药用价值和保健功能已得到公认, 但关于沙苑子的产品开发较少, 且以低附加值的初级加工品为主。因此, 急需应用现代生物、化学技术生产出附加值更高的沙苑子保健品^[7-9]。本试验拟利用沙苑子的丰富药用价值, 将沙苑子直接酿制成酒, 使其得到更广泛的利用。但考虑到沙苑子直接食用味甘略苦, 且带有腥味, 遂又采用浸渍炒制处理后的沙苑子进行了酿造, 以改善口感。沙苑子中富含黄酮类化合物, 对以沙苑子为原料酿造制成的沙苑子酒品质有重要的作用。沙苑子酒的酿造过程中, 黄酮类物质一般会随着酒精体积分数、发酵 pH、含糖量等的变化而变化^[10], 发酵过程中温度和自身的氧化等原因也会不同程度地影响黄酮含量。

本试验拟利用高效液相法, 对以 2 种不同方法处理的沙

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (编号 31101324); 中央高校基本科研业务费专项 (编号: GK201602005); 陕西省重点研发计划项目 (编号: 2017NY-167, 2018ZDXM-NY-086); 西安市科技局高校院所人才服务企业工程项目 [编号: 2017071CG/RC034(SXSF003)]

作者简介: 范学辉, 女, 实验师, 陕西师范大学在读博士研究生。

通信作者: 张清安 (1976—), 男, 陕西师范大学副教授, 博士。

E-mail: qinganzhang@snnu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-02

苑子酿造的酒中的 5 种黄酮类物质(杨梅苷、沙苑子苷、毛蕊异黄酮、槲皮素、鼠李柠檬素)含量进行分析,以期 为沙苑子 酒的酿造工 艺、质量控 制及沙苑 子的开发 利用提供 参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

沙苑子:西北药材市场。

1.2 仪器与试剂

高效液相色谱仪:P230A/P 型,安捷仑科技有限公司;
数控超声波清洗器:KQ2200DA 型,昆山市超声仪器有 限公司;

电热恒温水温箱:101 型,上海跃进医疗器械厂;

乙腈:色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司;

冰乙酸、甲醇等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

蒸馏水:娃哈哈纯净水,陕西娃哈哈乳品有限公司;

槲皮素、毛蕊异黄酮标准品:纯度≥99%,成都普菲德生 物技术有限公司;

杨梅苷、沙苑子苷 A 标准品:纯度≥99%,成都曼思特生 物科技有限公司;

鼠李柠檬素标准品:纯度≥99%,上海古朵生物科技有 限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品预处理方式 将挑选的沙苑子分为处理组和未 处理 2 组,处理组即是将沙苑子置于 30 ℃ 条件下浸渍萌发 8 h 后,110 ℃ 烘干粉碎再进行酿造;未处理组即是将挑选后 的沙苑子直接粉碎发酵酿造。

1.3.2 沙苑子酒酿造工艺

沙苑子→挑选→去杂→分为 2 种处理→粉碎→以 1:10 (g/mL)的料液比配置(超声波强度 120 W,频率 40 Hz,处理 50 min)→加蔗糖→加酒石酸、柠檬酸调 pH→添加亚硫酸 钠→添加安琪酿酒酵母→发酵→取样

粉碎至 20~40 目,加入 150 g/L 蔗糖,调节 pH 到 3.6 左右,添加亚硫酸钠 200 μg/L,在 24~26 ℃ 下发酵,依次取 酿造 0,5,10,17,23,34,50,65,80,100,120 d 的样品 250 mL,在-30 ℃ 下冰柜冻存,待测。

120 d 的酿造过程包括发酵、老熟、陈酿。前期试验表明 在 11 d 左右总糖降低到一定程度后基本保持不变至主发酵 结束,之后仍旧保留酒渣,在酵母菌大部分死亡后,仍然存在 酵母酶及假丝酵母分解酒渣,完成酒的老熟陈酿过程,酒的 口感、风味等品质得以改善。

1.3.3 总黄酮含量的测定 采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 的比色 法^[2]。以芦丁作为标准品,510 nm 处测吸光度。

1.3.4 待测样的制备 准确量取 10.00 mL 沙苑子酒,加入 30 mL 乙酸乙酯摇匀,放入 50 ℃ 恒温水浴锅中萃取,如此操 作 4 次合并萃取液,将萃取液在 45 ℃ 真空旋转蒸发仪中回 收乙酸乙酯,将去除乙酸乙酯后的溶液用甲醇定容至 3 mL, 用 0.45 μm 滤膜过滤,即得 HPLC 待测液^[9,11-13]。

1.3.5 标准溶液的制备 精密称取杨梅苷 0.004 2 g、沙苑子 苷 A 0.020 0 g、毛蕊异黄酮 0.013 0 g、槲皮素 0.002 7 g、鼠李

柠檬素 0.005 0 g,加入一定体积的甲醇,分别制成浓度为 1.40,0.14,6.50,0.34,0.50 mg/mL 待测标准溶液。

1.3.6 黄酮类化合物的测定 采用 HPLC 法。色谱条件: 采用冰乙酸—乙腈溶液(1:99 体积比)配成流动相 A 液,以 1%乙酸溶液为流动相 B,柱温 30 ℃;流量 1.0 mL/min;进样 量 20 μL;检测波长 280 nm。梯度洗脱程序:0~5 min 时,A 由 5%线性升至 10%;10~22 min 时,A 由 10% 线性升至 17%;22~50 min 时,A 由 17%线性升至 50%;50~70 min 时,A 由 50%线性升至 70%;70~80 min 时,A 由 90%线性 降至 5%。

2 结果与分析

2.1 沙苑子酒中 5 种黄酮类化合物的鉴定

2.1.1 5 种黄酮类化合物单体的标准曲线 从图 1 可以看 出,采用本试验的液相色谱条件,可以有效地对标品溶液中的 杨梅苷、沙苑子苷、毛蕊异黄酮、槲皮素、鼠李柠檬素进行 检测与分离。以杨梅苷、沙苑子苷 A、毛蕊异黄酮、槲皮素、 鼠李柠檬素对照品的系列标准使用液 X 为横坐标,峰面积 值 Y 为纵坐标,绘制标准曲线图。5 种黄酮类物质的标准曲 线见表 1。从表 1 可以看出,相关系数均在 0.99 以上,可作为 定量分析的基础。

2.1.2 酒样中 5 种黄酮单体的鉴定 图 2 为相同条件下沙 苑子酒待测液的 HPLC 分析图谱,在杨梅素、沙苑子苷 A、毛 蕊异黄酮、槲皮素和鼠李柠檬素的洗脱位置上出现了相应的 洗脱峰。为进一步确认该位置上的洗脱峰是否为所求物质, 采用加入内标的方式反复确认。

表 1 5 种黄酮类化合物单体标准工作曲线

Table 1 Standard working curve of 5 kinds of flavonoids				
对照品	回归方程	r^2	线性范围/ (μg·L ⁻¹)	
杨梅苷	$Y=17\,467X+2.47$	0.991 6	0.116 7~0.700 0	
沙苑子苷 A	$Y=15\,704X+19.67$	0.992 9	0.104 2~0.208 3	
毛蕊异黄酮	$Y=15\,610X-94.72$	0.994 5	0.650 0~6.500 0	
槲皮素	$Y=120\,000X-71.76$	0.992 8	0.028 1~0.337 5	
鼠李柠檬素	$Y=16\,177X-106.80$	0.993 5	0.125 0~0.500 0	

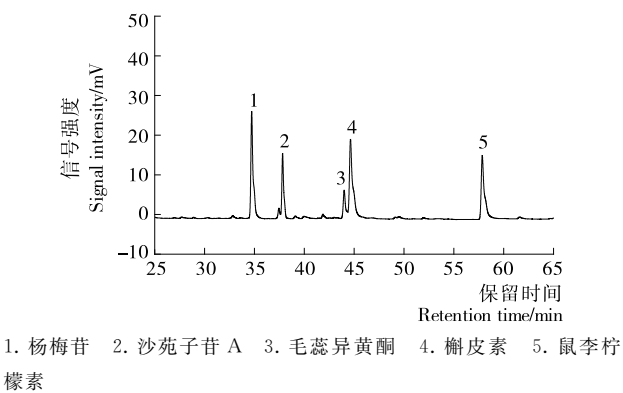


图 1 5 种黄酮类物质液相色谱图(标准品)

Figure 1 Liquid Chromatogram for 5 kinds of flavonoids(standard)

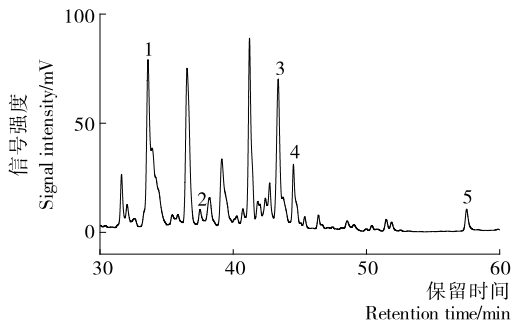


图 2 样品的典型液相色谱图

Figure 2 Typical liquid Chromatogram of wine sample

图 3 为待测液加入杨梅苷标品溶液后的内标图。图 3 中峰 1 出现了明显的增高,峰 1 与待测液和标品溶液的保留时间相对应的峰均未发生分离,因此确定峰 1 是杨梅苷。

图 4 为待测液加入沙苑子苷 A 标品溶液后的内标图。图 4 中峰 2 出现了明显的增高,峰 2 与待测液和标品溶液的保留时间相对应的峰均未发生分离,因此确定峰 2 是沙苑子苷 A。

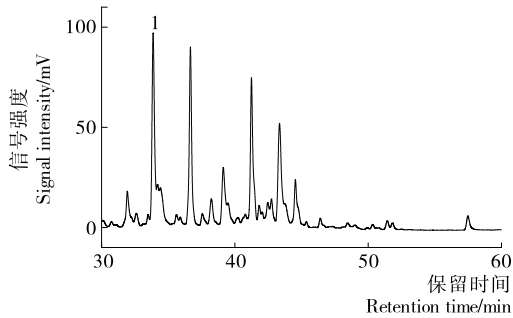


图 3 杨梅苷内标图

Figure 3 Internal standard liquid chromatogram of myricitrin

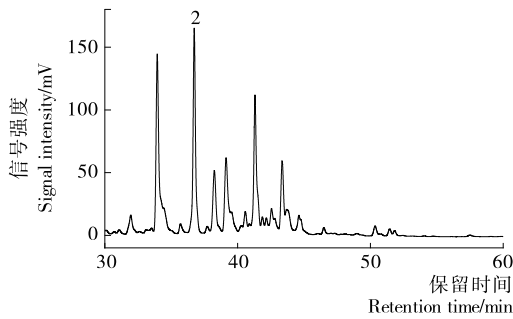


图 4 沙苑子苷 A 内标图

Figure 4 Internal standard liquid chromatogram of Complanatoside A

图 5 为待测液加入毛蕊异黄酮标品溶液后的内标图。图 5 中峰 3 的位置出现了明显的增高,峰 3 与待测液和标品溶液的保留时间相对应的峰均未发生分离,因此确定峰 3 是毛蕊异黄酮。

图 6 为待测液加入槲皮素标品溶液后的内标图。图 6 中峰 4 出现了明显的增高,峰 4 与待测液和标品溶液的保留时间相对应的峰均未发生分离,因此确定峰 4 是槲皮素。

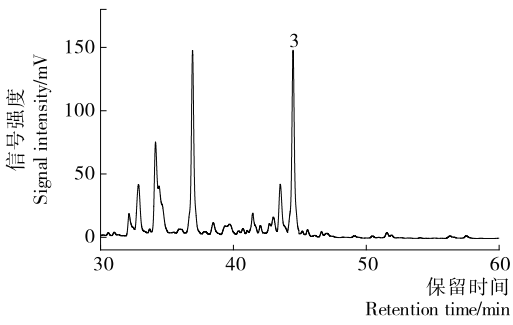


图 5 毛蕊异黄酮内标图

Figure 5 Internal standard liquid chromatogram of Calycosin

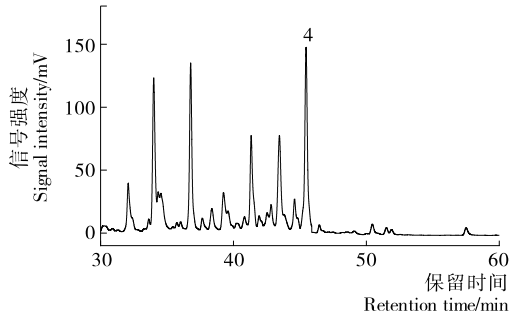


图 6 槲皮素内标图

Figure 6 Internal standard liquid chromatogram of quercetin

图 7 为待测液加入鼠李柠檬素标品溶液后的内标图。图 7 中峰 5 出现了明显的增高,峰 5 与待测液和标品溶液的保留时间相对应的峰均未发生分离,因此确定峰 5 为鼠李柠檬素。

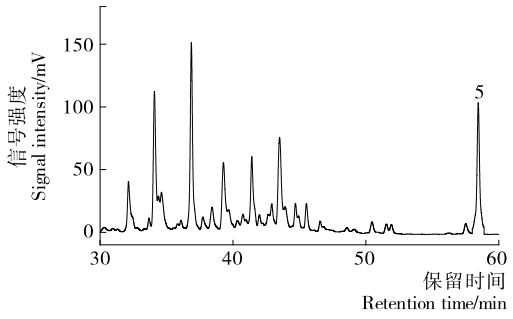


图 7 鼠李柠檬素内标图

Figure 7 Internal standard liquid chromatogram of Rhamnocitrin

综合图 3~7 可知,采用本试验的色谱条件可以有效检测出样品中的 5 种黄酮类成分,因此可以采用本试验所述的色谱条件测定样品中各黄酮成分的含量。

2.2 沙苑子在酿造过程中黄酮类化合物的变化

2.2.1 总黄酮含量的变化 由图 8 可知,在一定条件下,沙苑子酒中总黄酮含量随着酿造时间的延长整体呈先升高后降低的趋势,17 d 时总黄酮含量达到最大。2 种处理方法对比来看,酿造前经浸渍萌发处理的沙苑子酒总黄酮含量比未经过处理的高。

2.2.2 黄酮单体含量的变化

(1) 杨梅苷:不同酿造阶段沙苑子酒中杨梅苷含量变化

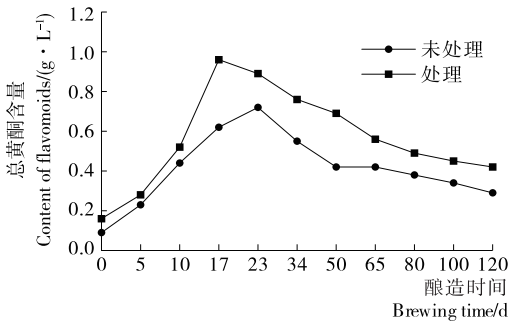


图8 酿造过程中总黄酮含量随时间的变化

Figure 8 Change of total flavonoids content brewing process

见图9。由图9可知,随酿造时间的延长,杨梅苷含量总体变化呈先升后降的趋势。在整个酿造阶段,酿造前的浸渍萌发处理并没有提高杨梅苷的浸提,反而使杨梅苷损失了。未处理的沙苑子在酿造的第50天,杨梅苷含量达到整个酿造过程的最大值,随后逐渐下降;而处理的沙苑子在酿造的第65天,杨梅苷含量才达到整个酿造过程的最大值,与未浸渍处理的含量接近。

这可能是在沙苑子酒酿造初期,酒精体积分数不断增大,酒精度不断增大,杨梅苷在酒中的溶解度也不断增大,并且此时沙苑子新陈代谢活跃,因此含量一直增加。当沙苑子到了酿造后期时,酒已经老化,这时受到光照的影响,杨梅苷稳定性降低,发生氧化分解,甚至结构遭到破坏,不适合杨梅苷的浸提,导致含量下降^[14]。

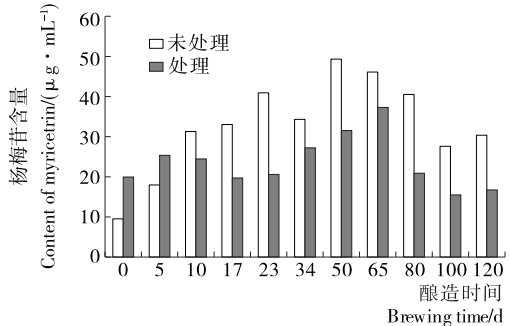


图9 杨梅苷在酿造过程中的变化

Figure 9 Change of myricitrin in the brewing process

(2) 沙苑子苷A:不同酿造阶段沙苑子酒中沙苑子苷A含量变化见图10。由图10可知,随酿造时间的延长,沙苑子苷A含量总体变化也呈先升后降的趋势。浸渍萌发前处理的沙苑子在酿造过程中,沙苑子苷A含量一直高于未处理。

由图10还可以看出,在沙苑子酿造的整个阶段,浸渍萌发前处理明显加速了沙苑子苷A的浸提,浸渍处理过的沙苑子,在酿造的第17天,沙苑子苷A含量达到整个酿造过程的最大值,随后逐渐下降;而未处理的沙苑子在酿造的第23天,沙苑子苷A含量才达到整个酿造过程的最大值,并且低于浸渍萌发处理的。

出现上述现象的原因,可能是在酿造初期,随着发酵的进行,酒精度不断提高,酒的极性不断增大,沙苑子苷A是一种极性较大的化合物,在酒中的溶解度迅速增大,越来越多

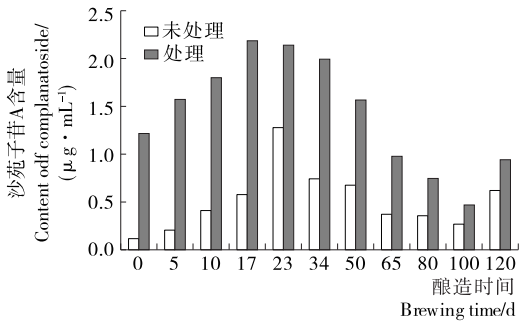


图10 沙苑子苷A在酿造过程中的变化

Figure 10 Change of complanatoside A in the brewing process

的沙苑子苷A会溶于酒中,因此含量一直增大。到了陈酿后期,酒已经老化,酒精度基本不变,这时受到光照和温度以及酵母苷酶的影响,沙苑子苷A会被生物酶分解或转化成其他物质,导致含量降低^[15]。

(3) 毛蕊异黄酮:不同酿造阶段沙苑子酒中毛蕊异黄酮含量变化见图11。由图11可知,毛蕊异黄酮含量总体变化同样呈先升后降的趋势。在沙苑子酿造前期,浸渍处理一定程度上提高了毛蕊异黄酮的浸提,但到了后期浸渍处理并不能提高毛蕊异黄酮的浸提,2种酒的毛蕊异黄酮含量相差甚微。

由图11还可以看出,浸渍萌发前处理同样加速了沙苑子酒酿造期间毛蕊异黄酮的浸提,在酿造的第17天,毛蕊异黄酮含量达到整个酿造过程的最大值,随后逐渐波动下降;而未处理的沙苑子在酿造的第50天,毛蕊异黄酮含量才达到整个酿造过程的最大值,随后波动下降。

毛蕊异黄酮的这种变化可能是在酿造前期,沙苑子的新陈代谢活跃,酒精体积分数不断增大,毛蕊异黄酮在酒中的溶解度不断增大。在酿造后期,光照和温度不断变化,毛蕊异黄酮本身不稳定易分解,容易发生氧化分解等反应,导致含量一直降低。

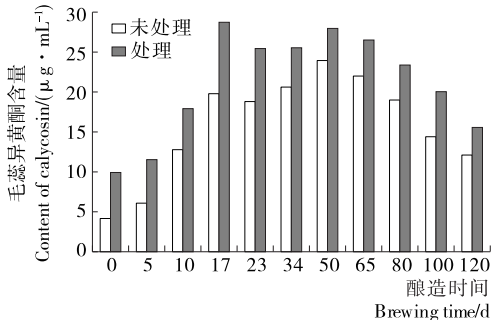


图11 毛蕊异黄酮在酿造过程中的变化

Figure 11 Change of calycosin in the brewing process

(4) 槲皮素:不同酿造阶段沙苑子酒中槲皮素含量变化见图12。由图12可知,随酿造时间的延长,槲皮素含量总体变化也呈先升后降的趋势。在沙苑子酿造前期,槲皮素含量有一定程度的提高,处理组在酿造的第17天,槲皮素含量达到整个酿造过程的最大值,随后波动下降,渐渐趋于稳定;而未处理的沙苑子在酿造的第34天,其含量才停止上升,但处理组槲皮素含量始终高于未处理的。

这可能是在酿造前期,随着发酵的进行,酒的极性体系增大,槲皮素在酒中的溶解度也增大,从沙苑子转移到酒中,此时微生物生长也比较活跃,沙苑子酶系活性增加,导致酒中槲皮素含量增加。在酿造后期,由于光照和温度的关系,使槲皮素产生转化和分解,除此之外促使黄酮产生降解的微生物大量繁殖,微生物及微生物分泌的各种胞内、胞外酶类,特别是多酚氧化酶,大大加速了多酚类物质的氧化聚合,导致黄酮的降解^[16-17],使槲皮素含量下降。

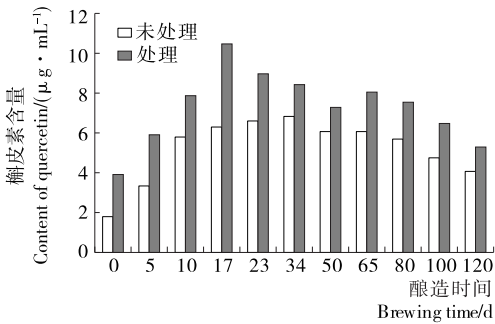


图 12 槲皮素在酿造过程中的变化

Figure 12 Change of quercetin in the brewing process

(5) 鼠李柠檬素:不同酿造阶段沙苑子酒中鼠李柠檬素含量变化见图 13。由图 13 可知,浸渍处理后的沙苑子酒中鼠李柠檬素在酿造期间大体呈波动上升的趋势,而未处理的在酿造前期是上升的,到了后期则是出现不同程度的上下波动。从图 13 可以看出,浸渍处理明显加速了沙苑子酿造期间鼠李柠檬素的浸提,在整个酿造过程中,浸渍萌发处理后沙苑子酒的鼠李柠檬素含量较未处理的有了明显的提高。

出现上述变化的原因,可能是在酿造前期,乙醇含量不断增加,酒的极性体系不断增大,鼠李柠檬素在酒中的溶解度增加,渐渐从沙苑子转移到酒中,导致酒中鼠李柠檬素含量的增加,除此之外,沙苑子自身酶催化水解也会产生一部分的鼠李柠檬素。到了酿造后期,乙醇含量发生的变化不大,但酒同样会受到光照和温度的影响,因此鼠李柠檬素也会发生不同程度的氧化聚合等反应,出现不同程度的波动。

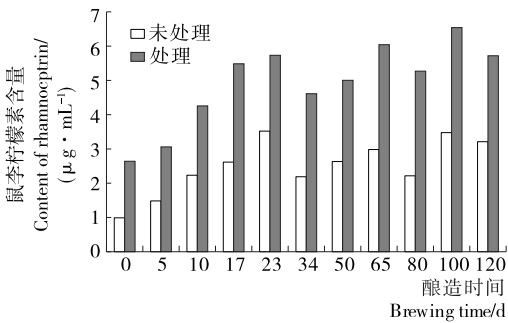


图 13 鼠李柠檬素在酿造过程中的变化

Figure 13 Change of rhamnocitrin in the brewing process

3 结论

本试验测定了 2 种方法预处理的沙苑子酒酿造过程中总黄酮和 5 种黄酮类单体含量的变化。结果表明,总黄酮含量大体呈先升后降的趋势,除了鼠李柠檬素外,其他 4 种黄

酮类单体的变化趋势与总黄酮一致。在酿造过程中,处理组与未处理组相比,除了杨梅苷,其他 4 种黄酮单体物质均有升高,其中沙苑子苷 A、鼠李柠檬素含量有显著性差异。说明通过浸渍炒制前处理可以提高沙苑子酒中黄酮类物质含量,从而提高其营养价值。

本研究对其黄酮成分单体物质进行测定,为沙苑子酒的产品质量控制提供了有益参考。至于沙苑子酒中这些重要黄酮类物质在酿造过程中的具体变化原因及控制将是后续研究的重要内容。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:171.

[2] 刘银芳,吴文倩,刘春宇,等.沙苑子黄酮提取工艺研究[J].时珍国医国药,2010,21(6):1401-1402.

[3] 刘妮娜,李晓东,张金政,等.玉簪属植物花瓣中类黄酮化合物价值评价[J].草业学报,2013,22(1):234-244.

[4] 李昌勤.沙苑子化学成分及药理作用研究进展[J].时珍国医国药,2000,11(11):1041-1042.

[5] NG Y F, TANG P C T, SHAM T T. Semen astragali complanati: An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review[J]. Journal of Ethnopharmacolog, 2014, 155(1): 39-53.

[6] 陈小萍,张卫明,史劲松,等.茶树花黄酮的提取及对羟自由基的清除效果[J].南京师大学报:自然科学版,2007,30(2):93-95.

[7] 李莉,刘成梅,田建文,等.现代提取分析技术在黄酮类化合物中的应用[J].江西食品工业,2006,4(12):42-44.

[8] ZHANG Qing-an, FAN Xue-hui, LI Tao, et al. Optimisation of ultrasound extraction for flavonoids from semen astragali complanati and its identification by HPLC-DAD-MS/MS[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2013, 48(9): 1970-1976.

[9] ZHANG Qing-an, FAN Xue-hui, ZHANG Zhi-qi, et al. Extraction, antioxidant capacity and identification of Semen Astragali Complanati (Astragalus complanatus R. Br.) phenolics[J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 1295-1300.

[10] 陈玲,余昆,崔振华.枸杞果酒发酵过程中黄酮含量变化及其发酵条件优化[J].酿酒,2015,33(6):65-68.

[11] 贾翠英,杨天佑,刘琳,等.柿子酒中非花色素苷类物质的提取及组成分析[J].食品工业科技,2010,31(10):158-160.

[12] 孙敏,岳田利,袁亚宏.猕猴桃果汁多酚类物质的提取工艺研究[J].农产品加工:学刊,2007,54(3):40-43.

[13] 戴永强,赵雨云,曾何华.茶叶中多酚类物质的提取与快速含量测定[J].湖南科技学院学报,2008,8(15):55-56.

[14] 赵丽,李宗阳,张泽生,等.杨梅苷的稳定性研究[J].食品研究与开发,2011,24(12):9-11.

[15] 孙建中,张怀,贾天柱,等.沙苑子及其炮制品中沙苑子苷 A 和鼠李柠檬素的含量测定研究[J].中成药,2010,26(8):1368-1371.

[16] 龚加顺,周红杰,张新富,等.云南晒青绿毛茶的微生物固态制备及成分变化研究[J].茶叶科学,2005,26(4):300-304.

[17] 郭刚军,龚加顺,张新富,等.云南普洱茶中黄酮含量的测定及槲皮素、芦丁的提取分离[J].食品工业科技,2007,28(8):67-70.