

## 葛根发酵液的总黄酮与抗氧化活性的研究<sup>\*</sup>

仲桢玉<sup>1</sup>, 杨小生<sup>2\* \* \*</sup>

(1. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014)

**[摘要]** 目的: 考察 10 种葛根发酵液的总黄酮和抗氧化能力的相关性。方法: 将葛根通过茅台酒曲、高效酒曲、甜酒曲、酵母和新型发酵粉 5 种酒曲制备成 10 种葛根发酵液(5 种发酵酒样和 5 种发酵醋样), 将不加糖和酒曲的葛根水提物(原料水提物)作为对照, 测定这 11 种样品中总黄酮含量和总超氧化歧化酶(T-SOD)活力; 以维生素 C(VitC)为阳性对照, 检测 1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH 自由基)和羟基自由基(OH 自由基)清除率, 并对总黄酮含量、T-SOD 活力、DPPH 自由基清除率和 OH 自由基清除率进行相关性分析。结果: 葛根发酵液的总黄酮含量低于同等葛根水提物( $P < 0.05$ ), T-SOD 活力也是低于同等葛根水提物( $P < 0.01$ ), OH 自由基清除率也比同等葛根水提物降低( $P < 0.01$ ), 但是 DPPH 自由基清除率高于同等葛根水提物( $P < 0.01$ ); 对 10 种葛根发酵液中黄酮含量与其抗氧化能力进行了相关性分析( $P < 0.01$ ), 发现总黄酮含量与 DPPH 自由基清除率呈一定正相关( $r = 0.79$ ), DPPH 自由基清除率与 T-SOD 活力呈正相关( $r = 0.80$ )。结论: 不同的酒曲发酵对发酵液的总黄酮含量和抗氧化能力都有影响, 葛根发酵时用高效酒曲和新型发酵粉相对较佳。

**[关键词]** 葛根发酵液; 总黄酮; 抗氧化; 自由基; 超氧化歧化酶; 酒曲

**[中图分类号]** R282; K917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)12-1379-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.12.004

## Total Flavonoid Contents and Antioxidant Activities of Fermented Pueraria

ZHONG Zhenyi, YANG Xiaosheng

(1. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. The Key Chemistry Laboratory for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the correlation between total flavonoid contents and antioxidant activities in 10 kinds of fermented pueraria. **Methods:** Five starters (Maotai starter, efficient starter, sweet wine starter, wine yeast, new type yeast powder) were used to prepare 10 kinds of fermented puerarias, and compared with raw material control. The total flavonoid contents and T-SOD from pueraria were detected. OH and DPPH radical scavenging capacity were analyzed and the correlation among total flavonoid contents, T-SOD and radical scavenging capacity were analyzed. **Results:** Flavonoid contents in fermented pueraria were less than that in aqueous extract of raw pueraria ( $P < 0.05$ ), so this is also for OH radical scavenging capacity ( $P < 0.01$ ) and the activity of SOD ( $P < 0.01$ ), but DPPH radical scavenging capacity were higher than that in aqueous extract of pueraria ( $P < 0.01$ ). The flavonoid contents were positively correlated with the capacity of DPPH radical scavenging ( $r = 0.79$ ), and the DPPH radical scavenging capacity were positively correlated with the activity of SOD ( $r = 0.80$ ). **Conclusion:** Different kinds of starters influence the total flavonoid contents and the antioxidant activities, the suitable starters for pueraria to ferment are efficient starter and new type yeast powder. **[Key words]** fermented pueraria; total flavonoid content; antioxidation; radical; superoxide dismutase; distiller's yeast

<sup>\*</sup> [基金项目] 贵州省高层次创新型人才培养项目[黔科合人才(2015)4027号]

<sup>\*\*</sup> 通信作者 E-mail: gzcnnp@sina.cn

网络出版时间: 2017-12-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20171218.2311.002.html>

葛根中主要活性物质为黄酮类、异黄酮类,具有改善心脑血管循环、降低心肌耗氧量、降低血糖、预防高血压和动脉硬化、提高免疫力、抗菌和抗病毒等药理保健作用<sup>[1]</sup>。葛根中大分子物质经过酒曲分解作用形成了更易被人体吸收、口感良好的小分子,葛根酒不仅能利用酒的辛温行散功能活络通经,还可以畅通血脉、祛风散寒;葛根醋则有解酒作用,并且具有降低血糖和增强免疫力的功能<sup>[2]</sup>。由于黄酮类物质是天然存在的抗氧化剂,能够通过清除人体内的自由基和活性氧来实现抗氧化作用<sup>[3-4]</sup>,因此葛根所制成的葛根酒和葛根醋,也具有抗氧化能力。邵伟等<sup>[5]</sup>报道,葛根发酵得到的成品酒中总黄酮含量为 410 mg/L。羟基自由基(OH 自由基)、1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH 自由基)清除率和总超氧化歧化酶(T-SOD)可用以反映抗氧化能力<sup>[6-7]</sup>,本实验对 5 种不同酒曲发酵获得的葛根酒醋中的总黄酮含量及抗氧化能力进行检测,以评价葛根发酵产品的抗氧化功能,以期对葛根资源的开发应用提供数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜葛根,2016 年冬季采购于贵州榕江县。葛根素纯度 99% (成都普思生物科技有限公司)、DPPH (日本 Ruitaibio 公司)、T-SOD 试剂盒 (南京建成有限公司)、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、水杨酸、硫酸亚铁和 30% 过氧化氢均为 AR 级 (成都金山化学试剂有限公司)。紫外分光光度计 UV-1800 (日本岛津公司)。5 种酒曲分别为茅台酒曲 (实验室自制)、高效酒曲 (标准号 Q/QK 05-2003,贵州省酿酒工程技术开发中心研制)、安琪甜酒曲 (标准号 Q/YB 2002S,产地湖北省宜昌市)、安琪葡萄酒高活性干酵母 (标准号 Q/YB J02.48,产地湖北省宜昌市)和新型发酵粉 (标准号 Q/QK 07-2008,贵州省酿酒工程技术开发中心研制)。

### 1.2 样品制备

本实验以 5 种酒曲发酵葛根酒,采用低温避光发酵<sup>[8]</sup>。发酵时,葛根用量为 100 g,加入质量分数 10% 的葡萄糖 (30 g) 和 0.5% 的酒曲 (1.5 g),补水 200 mL 使每瓶最终含量为 300 g。发酵前按酒曲分类,每组 6 瓶,发酵成酒得到 5 种酒样,每组取 3 瓶再加入红茶菌母液继续发酵成醋,得到 5 种醋

样;另取 100 g 葛根粉碎溶于 300 mL 水中,不加糖和曲配成原料水提物作为对照 (葛根水提物)。以上各组发酵时间均为 20 d,将获得的酒样、醋样以及原料水提物压榨过滤,滤液补水定容至 300 mL,每种发酵液分别称取 10 mL,蒸干后待用。

### 1.3 总黄酮含量测定

采用硝酸铝显色法测葛根酒、醋中的总黄酮含量<sup>[9-11]</sup>。用葛根素标准品制作标准曲线,精密称定 2 mg 葛根素乙醇定容至 10 mL 容量瓶中,依次量取 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 和 1.4 mL,分别乙醇定容至 5 mL 容量瓶中,配成终浓度为 16、24、32、40、48 和 56 mg/L 的标准液,于 250 nm 处测得标准液吸光度,得到回归方程  $y = 13.862x + 0.001$ ,  $r = 0.999$ 。11 种样品各取 0.2 mL,根据标准曲线计算得出每种发酵液的总黄酮含量,以葛根素的含量表示,单位为 mg/L。每个样品做 3 组平行实验,最终数据绘制表格,酒样、醋样的总黄酮含量分别与同等原料水提物比较。

### 1.4 DPPH 自由基清除率测定

精密称取 DPPH 试剂 3.943 mg 置于 50 mL 棕色容量瓶中,加入无水乙醇充分溶解,得到浓度为 2 mmol/L DPPH 贮备液,避光冷藏。将发酵得到的 5 种酒样、5 种醋样及原料水提物共计 11 种待测样品,依次取 5、4、3、2、1、0.5 和 0.25 mL 至 10 mL 容量瓶中,配成 7 个梯度依次降低的溶液,摇匀待测。依次取各样品的 7 种梯度各 2 mL,加入 2.0 mL DPPH 溶液,室温下避光反应 30 min 后,充分摇匀后测吸光值,517 nm 下测得吸光值记为  $A_j$ ;另取各样品的 7 种梯度各 2 mL,均加入 2.0 mL 纯水,517 nm 下测得吸光值记为  $A_i$ 。对照组为 2 mL DPPH 溶液加 2 mL 纯水,吸光值记为  $A_c$ 。用等浓度维生素 C (VitC) 溶液作为阳性对照。按以下公式计算 DPPH 自由基清除率 ( $K$ ),  $K(\%) = [1 - (A_i - A_j)] / A_c$ 。绘制葛根样品梯度浓度与 DPPH 自由基清除率相关性曲线,计算样品提取液抑制 DPPH 自由基的吸光度 50% 时提取物的浓度 ( $IC_{50}$ ),表示各样品的抗氧化活性<sup>[10-11]</sup>。

### 1.5 OH 自由基清除率测定

称取水杨酸溶液 10 mol/L,记为储备液 1;硫酸亚铁溶液 10 mol/L,记为储备液 2;过氧化氢溶液 100 mol/L,为储备液 3,现配现用。将发酵得到的 5 种酒样、5 种醋样及同等原料水提物共计 11 个样,依次取 5、4、3、2 和 1 mL 至 10 mL 容量瓶中,配成 5 个梯度依次降低的溶液,摇匀待测。依次取

各样品 5 种梯度的样品各 0.5 mL,加入 0.5 mL 储备液 1,0.5 mL 储备液 2,双蒸水 3.5 mL,最后加入 5 mL 储备液 3 启动反应,摇匀后在 510 nm 下测吸光值  $A_m$ ;另取 5 种梯度的样品各 0.5 mL,只加入 0.5 mL 储备液 1 和双蒸水 4 mL,最后加入 5 mL 储备液 3 启动反应,摇匀后在 510 nm 下测吸光值  $A_n$ 。对照组不加样品液,只加储备液 1、2 各 0.5 mL,双蒸水 4 mL,再加 5 mL 储备液 3,其吸光值记为  $A_c$ 。用等浓度 VitC 溶液作为阳性对照。按下式计算 OH 自由基清除率( $K$ ), $K(\%) = [1 - (A_m - A_n)]/A_c$ 。根据绘制葛根样品梯度浓度与 OH 自由基清除率相关性曲线,计算  $IC_{50}$  值表示其抗氧化活性<sup>[10]</sup>。

### 1.6 T-SOD 活力测定

根据试剂盒上植物组织中 T-SOD 测定方法操作。22 g/L 葛根发酵液稀释 10 倍后取 0.2 mL,比较同种取样量下每种样品的 SOD 活力单位,计算出每克组织的总 SOD 活力。总 SOD 活力 = (对照 OD 值 - 测定 OD 值)/对照 OD 值 ÷ 50% × 反应液总体积/(取样量 × 匀浆液浓度)。

### 1.7 总黄酮含量与抗氧化能力的相关性分析

以各种发酵液的总黄酮含量为横坐标,氧化抑制率(SOD 活力等同于超氧阴离子抑制率)为纵坐标绘制氧化抑制率与总黄酮含量的一元一次方程,比较相关系数( $r$ )<sup>[12]</sup>。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,总黄酮水平以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对总黄酮、DPPH 自由基清除率、OH 自由基清除率和 T-SOD 活力进行单因素 ANOVA 检验,对总黄酮含量与抗氧化能力进行相关性分析,图表采用 EXCEL 和 Origin 9.0 绘制。

## 2 结果

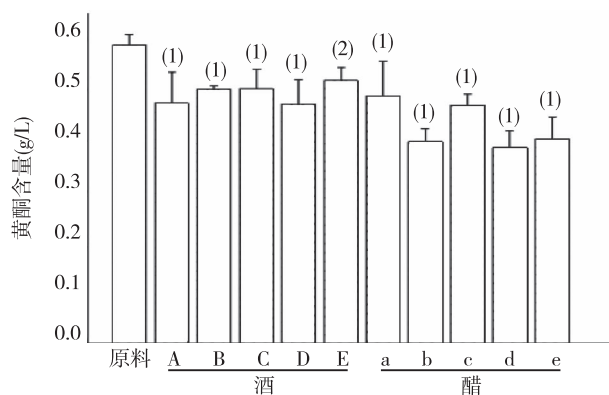
### 2.1 总黄酮含量

5 种醋样和 5 种酒样的总黄酮含量低于葛根水提物,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。如图 1。

### 2.2 DPPH 自由基清除率

5 种酒样和 5 种醋样的 DPPH 自由基清除能力在 0 ~ 5 g/L 高于同等葛根水提物( $P < 0.01$ )。在浓度高于 3.3 g/L 时,茅台酒曲、高效酒曲、酵母和新型发酵粉发酵得到的 8 种样酒、醋的 DPPH 自由基清除率 > 90%;浓度达 5 g/L 后,甜酒曲发酵酒、醋及原料水提物的 DPPH 自由基清除率也高于

90%;但这 5 种酒样和 5 种醋样的 DPPH 自由基清除率与阳性对照相比仍有差距,在浓度超过 4.5 g/L 后才与 VitC 的抗氧化能力相近。5 种酒样清除率的  $IC_{50}$  值从大到小依次为高效酒曲发酵酒、酵母发酵酒、新型发酵粉发酵酒、茅台酒曲发酵酒和甜酒曲发酵酒,前 3 者清除能力相似;5 种醋样清除率的  $IC_{50}$  值从大到小依次为高效酒曲发酵醋、新型发酵粉发酵醋、茅台酒曲发酵醋、酵母发酵醋和甜酒曲发酵醋。见图 2。



注:原料为葛根水提物,A、a 为茅台酒曲发酵,B、b 为高效酒曲发酵,C、c 为甜酒曲发酵,D、d 为酵母发酵,E、e 为新型发酵粉发酵;与葛根水提物比较,(1)  $P < 0.05$ , (2)  $P < 0.01$

图 1 11 种样品的总黄酮含量

Fig. 1 Total flavonoid contents in 11 samples

### 2.3 OH 自由基清除率

葛根水提物的 OH 自由基清除率高于 5 种葛根酒和 5 种葛根醋( $P < 0.01$ ),茅台酒曲发酵酒样和高效酒曲发酵酒样浓度高于 0.5 g/L 后,OH 自由基清除率与原料水提物相近,但其他 3 种酒样清除率未能达到 60%,且 11 种样品中的 OH 自由基清除率均低于阳性对照。5 种酒样 OH 自由基清除率的  $IC_{50}$  值从大到小依次为茅台酒曲发酵酒、高效酒曲发酵酒、酵母发酵酒、甜酒曲发酵酒和新型发酵粉发酵酒,5 种醋样 OH 自由基清除率的  $IC_{50}$  值从大到小依次为酵母发酵醋、新型发酵粉发酵醋、高效酒曲发酵醋、茅台酒曲发酵醋和甜酒曲发酵酒。见图 3。

### 2.4 总 SOD 活力

茅台酒曲发酵酒、高效酒曲发酵酒、甜酒曲发酵酒、酵母发酵酒及新型发酵粉发酵酒总 SOD 活力分别为  $(767.96 \pm 55.01)$ 、 $(837.75 \pm 87.21)$ 、 $(876.77 \pm 138.54)$ 、 $(861.77 \pm 2.75)$ 、 $(573.98 \pm 60.58)$  U/mg · prot,茅台酒曲发酵醋、高效酒曲发

醇醋、甜酒曲发酵醋、酵母发酵醋及新型发酵粉发酵醋总 SOD 活力分别为 ( $632.81 \pm 48.01$ )、( $791.64 \pm 79.55$ )、( $534.24 \pm 51.59$ )、( $802.94 \pm 105.05$ )、( $779.03 \pm 63.08$ ) U/mg · prot。葛根水提物的总 SOD 活力为( $1\,742.61 \pm 24.47$ ) U/mg · prot,大

于与所有发酵液,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 2.5 总黄酮含量与抗氧化能力的相关性分析

葛根 11 种样品的总黄酮含量与 DPPH 自由基清除率呈正相关( $r = 0.79$ ),DPPH 自由基清除率与 SOD 活力值呈正相关( $r = 0.80$ )。见表 1。

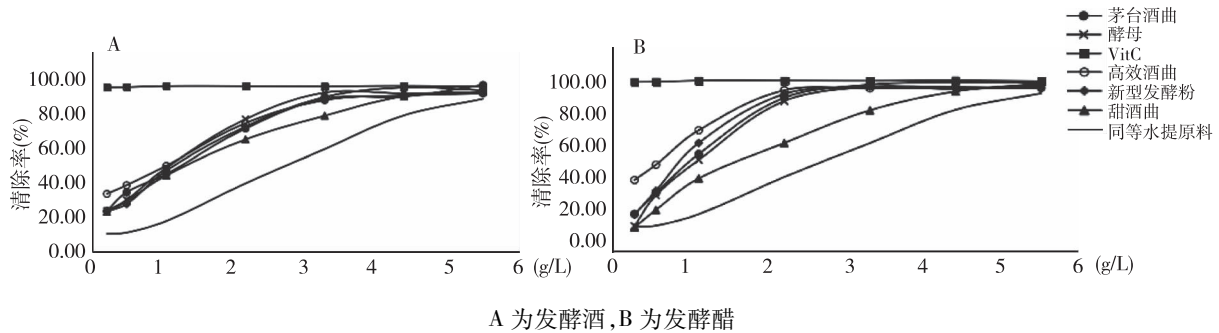


图 2 7 个浓度梯度下 11 个样品的 DPPH 自由基清除率

Fig. 2 DPPH radical scavenging capacity in 11 samples at different concentration

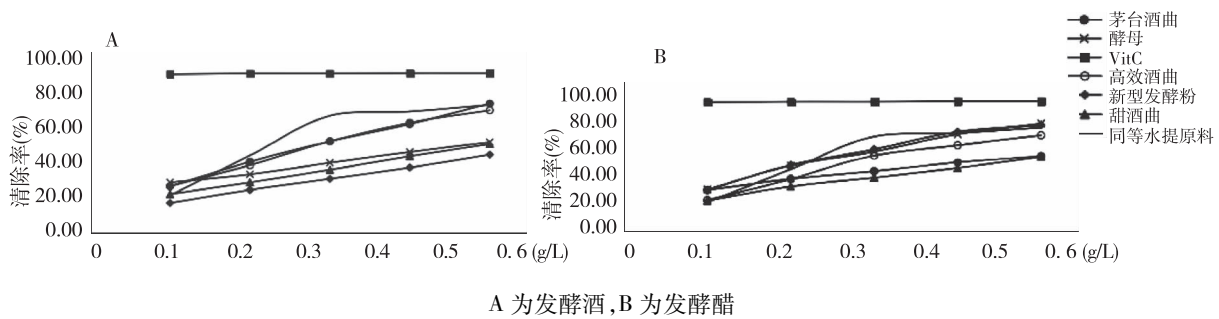


图 3 5 个浓度梯度下 11 种样品的 OH 自由基清除率

Fig. 3 Hydroxyl radical scavenging capacity in 11 samples at different concentration

表 1 11 种样品中总黄酮含量与 DPPH 自由基清除率、OH 清除率和 SOD 活力值的相关性( $r$ )

Tab. 1 Correlation between total flavonoid contents and antioxidant activities in 11 samples

参数	总黄酮含量	DPPH 自由基清除率	OH 自由基清除率	SOD 活力值
总黄酮含量	1.00			
DPPH 清除率	0.79 <sup>(1)</sup>	1.00		
OH 清除率	0.28	0.01	1.00	
SOD 活力值	0.57	0.80 <sup>(1)</sup>	0.28	1.00

<sup>(1)</sup>  $P < 0.01$

## 3 讨论

发酵得到的葛根酒醋中总黄酮含量均低于同等水提原料,从其中发酵最完全(发酵液无气泡产生且颜色澄清)的高效酒曲发酵酒和酵母发酵酒

中总黄酮含量偏低,而发酵不算完全(发酵液浑浊粘稠)茅台酒曲发酵酒和甜酒曲发酵酒中总黄酮含量偏高,并且 5 种醋样的总黄酮含量普遍低于 5 种酒样。由此推断可能是发酵的过程中微生物将黄酮类物质分解成为其他小分子致使黄酮含量降低,因而发酵更加完全的酒样醋样总黄酮含量更低。

使用高效液相色谱仪辅助检测黄酮类的变化,发现发酵酒样和醋样比原料缺少 3'-羟基葛根素,大豆苷和染料木苷这 3 种物质,而且葛根素芹菜糖苷、芒柄花苷和大豆素的含量还有所降低。因此高效液相分析得到的结果是符合紫外测得的总黄酮变化规律的。由于茅台酒曲属于高温酒曲,对温度和时间要求较高,因此低温避光发酵不彻底,发酵出的酒醋太过浑浊,酒样在检测时离心多次导致测量的数值一度偏低,而醋样稍微澄清些直接测量,所以酒醋间差异较大。并且 5 种醋样比酒样发酵时间长了一倍,因此醋样总黄酮含量会略小于酒样的。

胡琴等<sup>[13]</sup>在研究葛根黄酮的体外抗氧化实验时发现,葛根黄酮对 DPPH 自由基有很好的清除作用,并且对于肝组织脂质过氧化产物的形成具有显著的抑制作用,可以清除 OH 自由基。但并不是所有的黄酮类物质都有清除自由基的能力。葛根中黄酮成分主要是异黄酮类物质<sup>[14]</sup>,胡春等<sup>[15-16]</sup>提出,黄酮化合物 B 环上的 3',4'-邻二羟基是其具有清除自由基生物活性的关键结构,其它位上的羟基起一定作用。但是在葛根中,葛根素、大豆苷、染料木素和大豆素等只在 B 环的 4' 位有一个羟基,仅 3'-羟基葛根素具备 3',4'-邻二羟基,因此这些异黄酮类物质抗氧化能力不如黄酮类强<sup>[17]</sup>。本实验中,原料总黄酮含量高于发酵液,但 DPPH 自由基清除率却低于发酵液,但总体趋势还是呈正比关系,造成这种现象的原因也许是葛根发酵液中还的三萜类、芳香类物质也存在抗氧化活性。这些因素都可能影响了发酵液中黄酮含量与 DPPH 自由基清除率的相关性。

由总黄酮和 OH 自由基清除率的相关性系数可以推断出:葛根总黄酮并不是决定葛根发酵液中 OH 自由基清除率的主要因素,有其它的抗氧化物质一并起着作用,导致整个发酵液黄酮含量与 OH 自由基清除率不呈线性相关。

SOD 酶能清除超氧阴离子保护细胞免受损伤,因此 SOD 活力值即为超氧阴离子清除率,即总黄酮含量与超氧阴离子清除率的相关性系数为  $r=0.57$ ,相关性不明显。张玲等<sup>[18]</sup>指出:黄酮类 C 环上 C2-3 双键和 B 环中邻二羟基(3',4'-二羟基)是清除超氧阴离子的主要活性部位,这与胡春等的发现一致,这也是为什么 DPPH 自由基清除率与 SOD 活力值的相关系数为  $r=0.80$  的原因。葛根中也有着其他物质起着清除超氧阴离子的作用。

本实验发现使用不同的酒曲发酵对于葛根酒、醋的总黄酮含量和抗氧化能力都有影响。适宜发酵葛根的曲种为高效酒曲和新型发酵粉,其发酵出的酒醋都有较高的总黄酮含量、DPPH 自由基清除能力和 T-SOD 活力(即超氧阴离子自由基清除能力),但 OH 自由基清除能力稍弱于其它。发酵液虽然口感提升但是黄酮含量和抗氧化性都不如直接食用高,因此葛根发酵后总黄酮含量和抗氧化能力降低,葛根饮品的保健效果有待进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] 王文亮,杜方岭,祝清俊. 葛根素提纯方法研究新进展[J]. 中国食物与营养, 2009(8):40-42.
- [2] 史路路. 葛根黄酒发酵工艺研究[D]. 武汉:湖北工业大学, 2014.
- [3] 彭游,胡小铭. 葛根黄酮提取与保健功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2011(12):581-584.
- [4] And SS, Akoh CC. Flavonoids and antioxidant capacity of georgia-grown vidalia onions[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002(19):5338-5342.
- [5] 邵伟,唐明,熊泽,等. 生料葛根保健酒发酵参数变化规律研究[J]. 中国酿造, 2003(6):21-23.
- [6] 李铨军,崔胜云. 抗坏血酸清除 DPPH 自由基的作用机理[J]. 食品科学, 2011(1):86-90.
- [7] 阿依姑丽·艾合麦提,李珊,英提扎尔·艾合买提江,等. 野山杏果肉总有机酸的分离纯化及其清除自由基能力的研究[J]. 食品科技, 2017(5):219-224.
- [8] 裴莉昕,纪宝玉,陈随清. 不同采收期葛根中总黄酮含量的动态变化研究[J]. 中国医药导报, 2017(19):28-30.
- [9] 甘琳,周芳,张越非,等. 葛根总黄酮提取工艺的比较[J]. 时珍国医国药, 2010(4):929-931.
- [10] 罗秋水,杜华英,熊建华,等. 葛根异黄酮类化合物提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2015(2):104-110.
- [11] 周率,张彬,周武,等. 葛根总黄酮的提取及其抗氧化性能研究[J]. 安徽农业科学, 2008(17):7402-7404.
- [12] 陈伟,曹杰,张莹,等. 蔬菜水果的抗氧化活性与总黄酮含量的相关性[J]. 现代预防医学, 2010(7):1245-1247.
- [13] 胡琴,齐云,许利平,等. 葛根黄酮的体外抗氧化活性研究[J]. 中药药理与临床, 2007(6):29-31.
- [14] 杨利军,田迪英. 11 种中草药抗氧化活性与黄酮含量相关性研究[J]. 食品工业科技, 2008(1):119-120.
- [15] 胡春,丁霄霖. 黄酮类化合物在不同氧化体系中的抗氧化作用研究[J]. 食品与发酵工业, 1996(3):46-53.
- [16] 张红雨. 黄酮类抗氧化剂结构活性关系的理论解释[J]. 中国科学, 1999(1):91-96.
- [17] 陈季武,胡斌,赵实,等. 天然黄酮类化合物清除 DPPH 的构效关系[J]. 发光学报, 2005(5):664-668.
- [18] 张琳,陆维敏. 黄酮类化合物抗氧化性能与其结构的关系[J]. 浙江大学学报(理学版), 2006(2):187.

(2017-10-10 收稿,2017-11-29 修回)

中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 丁廷森

