

3 种不同类型黄酒抗氧化作用比较研究

李 灿^{1,2}, 陈同强^{1,2*}

(1. 食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 长沙 410111; 2. 湖南省食品质量监督检验研究院, 长沙 410000)

摘 要: **目的** 比较 3 种不同类型黄酒的抗氧化作用。**方法** 测定了 3 种不同类型黄酒中总酚含量, 采用二苯苦味酰肼 (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 法、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS] 法、邻苯三酚自氧化法及羟自由基抑制法对 3 种不同类型黄酒的清除自由基活性进行比较。**结果** 传统型、清爽型和特型黄酒中总酚含量分别为 254、185、205 mg/L。传统型黄酒对 DPPH 自由基、ABTS^{·+}自由基、超氧阴离子自由基的清除率分别为 63.2%、63.8% 和 58.6%, 清爽型对上述 3 种自由基的清除率分别为 28.9%、25.8% 和 22.7%, 特型黄酒对这 3 种自由基的清除率分别为 45.9%、35.9% 和 34.7%。传统型、清爽型和特型黄酒对羟自由基的抑制率分别是 38.6%、18.2% 和 24.1%。**结论** 3 种不同类型黄酒对 DPPH 自由基、ABTS^{·+}自由基、超氧阴离子自由基、羟自由基均具有较强的清除作用, 其中, 传统型黄酒抗氧化能力最强。

关键词: 黄酒; 二苯苦味酰肼法; 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸法; 超氧阴离子自由基; 羟自由基

Comparative study on the antioxidant effect of 3 kinds of different types of yellow rice wine

LI Can^{1,2}, CHEN Tong-Qiang^{1,2*}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of food Safety Monitoring and Early Warning, Changsha 410111, China; 2. Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Changsha 410000, China)

ABSTRACT: Objective To compare the antioxidant effects of 3 different types of yellow rice wine. **Methods** The content of total phenols in 3 kinds of yellow rice wine was determined. The activities of scavenging free radicals of 3 kinds of yellow rice wine were compared by 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method, 2,2'- diazo-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), o-pyrogallol autoxidation method and hydroxyl radical inhibition method. **Results** The content of total phenols in traditional, fresh and special type rice wine was 254, 185 and 205 mg/L, respectively. The scavenging rates of DPPH, ABTS^{·+} and superoxide anion free radicals of traditional type rice wine were 63.2%, 63.8% and 58.6%, respectively, the scavenging rates of 3 free radicals of fresh type rice wine were 28.9%, 25.8% and 22.7% respectively, and the scavenging rates of 3 free radicals of special type rice wine were 45.9%, 35.9% and 34.7% respectively. The inhibition rates of traditional, fresh and special yellow rice wine to hydroxyl radicals were 38.6%, 18.2% and 24.1%, respectively. **Conclusion** Three kinds of yellow rice wine have strong scavenging effects on DPPH free radical, ABTS^{·+} free radical, superoxide anion free radical and hydroxyl free

基金项目: 湖南省市场监督管理局科技计划项目(2020KJJH03)

Fund: Supported by the Science and Technology Plan Project of Hunan Market Supervision Administration (2020KJJH03)

*通讯作者: 陈同强, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术研究。E-mail: 351155452@qq.com

*Corresponding author: CHEN Tong-Qiang, Engineer, Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, No. 238, Sunshine Road, Changsha 410000, China. E-mail: 351155452@qq.com

radical. Among them, traditional yellow rice wine has the strongest antioxidant capacity.

KEY WORDS: yellow rice wine; 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); superoxide anion radical; hydroxyl radical

1 引言

黄酒作为世界三大古酒之一,在我国享有“国酒”的美誉。随着生活水平的不断提高以及保健意识的增强,人们饮酒价值观念发生了改变,开始转向崇尚健康、营养、保健等方面。黄酒中含有丰富的氨基酸、肽类、维生素及人体所需的大量矿物质微量元素^[1-5],是饮酒中的保健养生佳品。

GB/T 13662-2018《黄酒》^[6]按产品风格将黄酒分为传统型黄酒、清爽型黄酒和特型黄酒 3 个不同类型。人体在代谢过程会产生大量的自由基,其中包括超氧自由基、羟自由基等,而研究证明自由基的存在与动脉粥样硬化、老年痴呆等多种疾病存在一定的联系,同时也是生物体衰老的主要因素之一。国内外关于抗氧化作用研究甚多,其研究方法差不多都是采用对一种或数种自由基清除能力来表征^[7-14]。目前已有研究报道证实黄酒具有较强清除自由基的能力^[15,16],然而关于不同类型黄酒的清除自由基能力比较研究鲜见。本研究通过对标准 GB/T 13662-2018《黄酒》中 3 个不同类型黄酒对 DPPH 自由基、ABTS^{·+}自由基、超氧阴离子自由基的清除能力以及对羟自由基的抑制率进行研究,进而评价它们对自由基的清除能力,为更科学地认识这 3 种类型黄酒的营养保健作用提供一定依据。

2 材料与方法

2.1 实验样品

绍兴黄酒[传统型黄酒、清爽型黄酒和特型黄酒 3 种不同类型,酒精度均在(16±1)% vol 范围内,生产年份均为 2019 年,产于绍兴。

2.2 试剂

乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)(含量≥99%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);邻苯三酚(含量≥98%,南京化学试剂股份有限公司);ABTS(含量≥98%,上海华蓝化学科技有限公司);硫代巴比妥酸(含量≥98%,国药集团化学试剂有限公司);其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

2.3 仪器设备

TE3102S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);HWS-28 恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);101 电热鼓风干燥箱(上海魅宇仪器设备有限公司);UV1901 紫外可见分光

光度计(成都一科仪器设备有限公司)。

2.4 实验方法

2.4.1 样品处理方法

3 种不同类型黄酒分别经超声脱气,4℃环境中保存,备用。

2.4.2 总酚含量测定

总酚含量采用福林-酚制剂法^[17]进行测定,采用没食子酸作标准品。分别准确移取 3 个不同类型黄酒 1 mL,加 50 mL 蒸馏水,加 1 mL 福林-酚制剂,混匀。反应 5 min 后,加入 3.0 mL 2%的碳酸钠溶液,室温放置 2 h,其间每隔约 20 min,将反应液涡旋混匀,760 nm 波长处测吸光值 A 。黄酒中的总酚含量按照以下公式计算:

$$\text{吸光值 } OD_{760 \text{ nm}} = 0.0009 \times \text{总酚含量} + 0.0183$$

2.4.3 DPPH 自由基清除能力比较

准确称取 10.0 mg DPPH,无水乙醇溶解后,定容至 100 mL。分别取 3 种酒样 0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 3.0 mL 于 10 mL 比色管中,加 2.0 mL DPPH 溶液,混匀,室温下放置 20 min,无水乙醇作为空白在 517 nm 测吸光度值 A_i ,计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = (1 - A_i/A_c + A_j/A_c) \times 100\%$$

式中: A_c -2 mL 无水乙醇加 2 mL DPPH 溶液的吸光度;

A_j -2 mL 待测液加 2 mL 无水乙醇的吸光度;

A_i -2 mL 待测液加 2 mL DPPH 的吸光度。

2.4.4 ABTS 自由基清除能力比较

分别加入 0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 3.0 mL 传统型、清爽型和特型 3 类黄酒于比色管中,加入 5.0 mL ABTS^{·+}自由基工作液,涡混均匀,40℃下放置 10 min,无水乙醇作空白在 405 nm 下读取吸光值 $A_{\max}$,另取 1 支比色管,用无水乙醇代替样品液,其他条件与样品管相同,读取吸光值记为 A_s 。之后再读取各样品液的吸光值,记为 A_c 。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = (1 - A_s/A_{\max} + A_c/A_{\max}) \times 100\%$$

2.4.5 邻苯三酚自氧化法

邻苯三酚的自氧化速率(A_1): 加入 5.0 mL pH8.43 的缓冲溶液与 5.0 mL 蒸馏水于比色管中,混匀,25℃水浴中放置 30 min,取出后立即加入 25℃预热过的邻苯三酚工作液 0.5 mL(空白管用蒸馏水代替邻苯三酚工作液),迅速摇匀,倒入比色皿,在波长 322 nm 处每隔 30 s 测定 1 次吸光值,线性范围内每 1 min A 的增加值即为邻苯三酚的自氧化速率。取 5.0 mL pH8.43 的缓冲溶液,分别与空白、0.4、0.8、1.2、1.6 和 2 mL 传统型、清爽型和特型 3 种不同类型黄酒混匀,其他步骤同上,线性范围内每 1 min A 的增加

值即为加样后邻苯三酚的自氧化速率(A_2)。

超氧阴离子自由基清除率(%)= $1-A_2/A_1 \times 100\%$

2.4.6 羟基自由基抑制实验

分别准确移取 0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL 传统型、清爽型和特型 3 类黄酒于 10 mL 的试管中; 再依次加入 pH 7.4 磷酸缓冲液 2 mL, EDTA 溶液 0.3 mL, 硫酸亚铁溶液 0.3 mL, 15 mmol/L H_2O_2 0.5 mL, 抗坏血酸溶液 0.5 mL, 脱氧核糖溶液 0.5 mL, 然后将试管于 40 °C 的水浴中放置 1 h。取出后, 迅速加入 1 mL 25% 的 HCl 和 1% TBA 1 mL, 100 °C 沸水中加热 10 min, 532 nm 处测吸光度值 A_x , 另取 1 支试管, 以蒸馏水代替酒类工作液, 其他条件同上, 测得其吸光度, 记为 A_0 。

羟基自由基的抑制率(%)= $1-A_x/A_0 \times 100\%$

3 结果与分析

3.1 传统型、清爽型和特型 3 种不同类型黄酒中酚类物质含量

由图 1 可知, 总酚标准曲线线性关系良好, $r^2=0.9991$, 计算得到传统型、清爽型和特型 3 类黄酒样品的总酚含量分别为 254、185、205 mg/L(以五倍子酸计)。

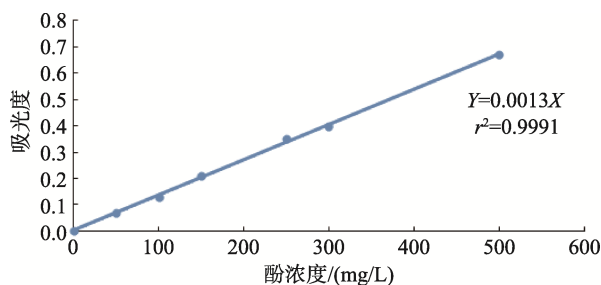


图 1 总酚测定的标准曲线

Fig.1 Standard curve of total phenol determination

3.2 3 种不同类型黄酒对 DPPH 自由基清除作用

作为一类较稳定的有机自由基, DPPH 自由基常用来衡量物质的体外抗氧化能力。DPPH 自由基的抗氧化能力常用清除率来表示, 清除率越大, 表示其抗氧化能力也就越强^[18]。对传统型、清爽型和特型 3 类黄酒对 DPPH 自由基的清除率进行了测定, 如图 2, 结果发现 3 类黄酒均对 DPPH 自由基均有较强的清除能力。其中传统型最强, 清除率达到 63.2%; 清爽型清除能力相对较弱, 为 28.9%; 特型黄酒居中, 为 45.9%, 这一结果与其中总酚含量高低可能存在一定关系。该结果表明黄酒在清除 DPPH 自由基的能力较为明显。当自由基的形成超过人体自身保护能力时, 黄酒可以在降低自由基在人体中产生的危害中

发挥一定作用。

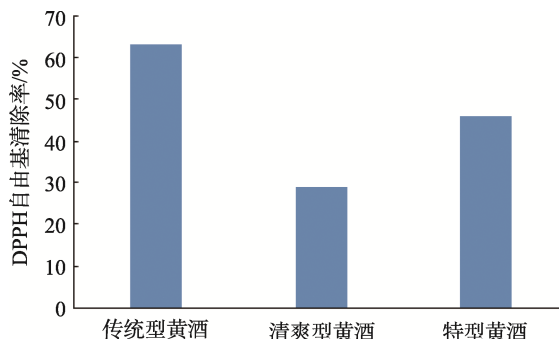


图 2 DPPH 清除自由基实验($n=6$)

Fig.2 DPPH radical scavenging assay($n=6$)

3.3 3 种黄酒对 ABTS·+ 自由基清除作用

ABTS·+ 自由基作为一种性质稳定自由基, 物质的抗氧化能力越强, 其提供电子的能力也就越强, 与该有机自由基发生反应的量越大, 反应速率也越快, 通过测定反应液吸光值的变化, 直接反应出物质还原能力的大小。对传统型、清爽型和特型 3 类黄酒对自由基 ABTS·+ 的清除率进行了测定计算, 如图 3, 结果表明传统型、清爽型和特型 3 类黄酒对 ABTS·+ 自由基均有一定的清除能力。传统型的最强, 达到 63.8%; 清爽型清除能力最弱, 25.8%; 特型黄酒居中, 清除率为 35.9%。

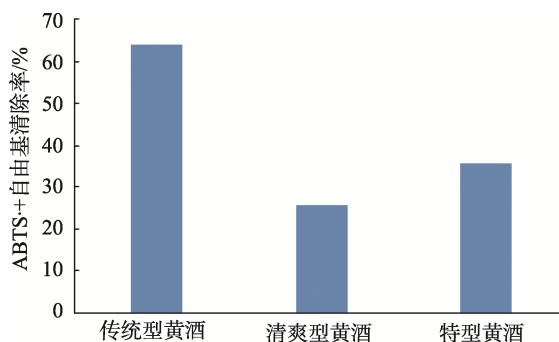


图 3 ABTS·+ 清除自由基实验($n=6$)

Fig.3 ABTS·+ radical scavenging assay($n=6$)

3.4 3 种黄酒对超氧阴离子自由基清除作用

超氧阴离子自由基作为生物体内主要自由基之一, 其可引起生物体内脂质过氧化, 导致细胞膜结构和功能发生改变。通过邻苯三酚自氧化法对传统型、清爽型和特型 3 类黄酒对超氧阴离子自由基清除能力进行测定, 如图 4, 发现 3 类黄酒对超氧阴离子自由基均有较强的清除能力。传统型的最强, 清除率达到 58.6%; 清爽型清除能力最弱, 为 22.7%; 特型黄酒居中, 为 34.7%。

3.5 3 种黄酒对羟自由基抑制作用

羟自由基是目前已知的活性氧中对生物体毒性最强、危害最大的一类自由基。其主要通过电子转移、加成和脱氢等方式与生物体内的氨基酸、糖类及核酸等大分子物质发生作用,从而导致此类物质氧化损伤,失去正常的生理功能。通过实验测定得出,3 类黄酒对羟自由基均有一定的抑制能力,如图 5,但相差不大,传统型黄酒抑制率为 38.6%;清爽型抑制率较弱,仅为 18.2%;特型黄酒抑制率为 24.1%。

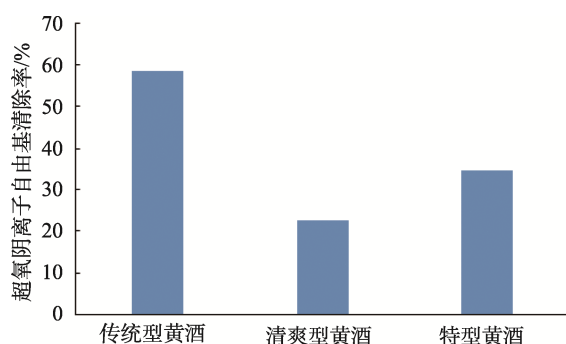


图 4 超氧阴离子清除自由基实验($n=6$)

Fig.4 Experiments on scavenging free radicals by oxygen anion($n=6$)

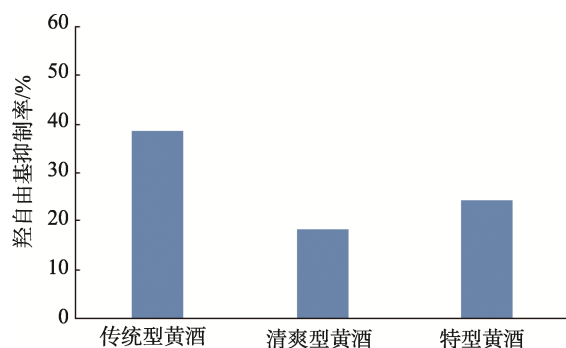


图 5 羟自由基抑制实验($n=6$)

Fig.5 Hydroxyl radical inhibiting assay($n=6$)

4 结 论

本研究通过比较传统型、清爽型、特型黄酒的总酚含量及抗氧化活性的差异,并通过多种方法对 3 种黄酒的抗氧化功能进行了综合性的评价。结果表明,传统型、清爽型和特型黄酒对 DPPH 自由基、羟基自由基、ABTS $^{\cdot+}$ 自由基、超氧阴离子自由基均具有清除和抑制作用。综合评价显示,传统型黄酒抗氧化能力最强,清爽型黄酒最弱。

随着人们生活水平与质量的提高,各类酒的消费逐年呈现较快的增长。人们在饮酒时需适量,在考虑某些酒中存在酚类等物质而具有保健作用的同时,也要关注酒精

过量时对人体危害性。通过比较 3 种不同类型黄酒抗氧化能力,不仅让人们更好地认识黄酒,同时也给人们更科学地消费黄酒提供参考依据。

参考文献

- [1] 张元,白卫东,刘功良. 黄酒生物活性成分及其功能研究进展[J]. 中国酿造,2017,36(7): 5-9.
Zhang Y, Bai WD, Liu GL. Research progress in bioactive components and functions of yellow rice wine [J]. China Brew, 2017, 36(7): 5-9.
- [2] 谢广发,戴军,赵光鳌,等. 黄酒中的 γ -氨基丁酸及其功能[J]. 中国酿造,2005,144(3): 49-50.
Xie GF, Dai J, Zhao GA, et al. GABA in rice wine and its function [J]. China Brew, 2005, 144(3): 49-50.
- [3] 惠明,邱聪,张会娟,等. 老户周黄酒色泽与易褐变营养物质含量的相关性研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2018,39(2): 15-19.
Hui M, Qiu C, Zhang HJ, et al. A study on the correlation between the color of old Huzhou yellow rice wine and the content of browning nutrients [J]. J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed), 2018, 39(2): 15-19.
- [4] 周建弟,张蕾,钱斌,等. 功能性黄酒提高机体免疫力研究[J]. 中国酿造,2019,38(3): 18-22.
Zhou JD, Zhang L, Qian B, et al. Study on improving immunity of functional yellow rice wine [J]. China Brew, 2019, 38(3): 18-22.
- [5] 郝飞克,刘蓉,韩兴林,等. 饮料酒饮用舒适度及健康评价体系的研究与应用[J]. 食品科学技术学报,2019,37(2): 10-16.
Hao FK, Liu R, Han XL, et al. Research and application of drinking comfort and health evaluation system of beverage wine [J]. J Food Sci Technol, 2019, 37(2): 10-16.
- [6] GB/T 13662-2018 黄酒[S].
GB/T 13662-2018 Yellow wine [S].
- [7] 史红梅,丁燕,孙玉霞,等. 葡萄酒中多酚物质抗氧化活性测定方法的研究[J]. 酿酒科技,2011, (7): 95-97.
Shi HM, Ding Y, Sun YX, et al. Determination of antioxidant activity of polyphenols in wine [J]. Brew Technol, 2011, (7): 95-97.
- [8] 高川,缪冰旋,马二梅,等. 葡萄酒抗氧化的研究进展[J]. 食品与发酵工业,2013,39(5): 149-153.
Gao C, Miao BX, Ma EM, et al. Research progress of wine antioxidant [J]. Food Ferment Ind, 2013, 39(5): 149-153.
- [9] Oktay M, Gulcin I, Kufrevioglu OI. Determination of in vitro anti-oxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. lebensmittel-wissenschaftund-technologie [J]. Food Sci, 2003, 36: 263-271.
- [10] Sokmen M, Angelova M, Kn E, et al. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. [J]. Life Sci, 2005, 76: 2981-2993.
- [11] 孙娟,郑朝辉,刘磊,等. 种珍稀食用菌粗多糖的抗氧化活性研究[J]. 安徽农业大学学报,2011,38(3): 404-409.
Sun J, Zheng ZH, Liu L, et al. Study on antioxidant activity of crude polysaccharides from rare edible fungi [J]. J Anhui Agric Univ, 2011, 38 (3): 404-409.
- [12] 翁夏蒙,鲁光耀,王鸯妮,等. 白及愈伤组织总酚含量测定及抗氧化作用研究[J]. 中药材,2013,36(1): 32-35.
Weng XM, Lu GY, WangYN, et al. Determination of total phenol content

- in white and callus and study on its antioxidant effect [J]. *Tradit Chin Med*, 2013, 36(1): 32–35.
- [13] 米俐勤, 戚向阳, 陈维军, 等. 罗汉果提取物的抗氧化活性研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(1): 213–216.
- Mi LQ, Qi XY, Chen WJ, *et al.* Study on antioxidant activity of extracts of *Siraitia grosvenorii* [J]. *Food Sci*, 2006, 27(1): 213–216.
- [14] 岳慧芬. 糜子黄酒发酵工艺与抗氧化特性研究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2019.
- Yue HF. Study on fermentation technology and antioxidant properties of millet yellow wine [D]. Xi'an: Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2019.
- [15] 刘晓艳, 曹甜, 傅筱鸥, 等. 广东客家黄酒体外抗氧化能力的初步评价[J]. *中国酿造*, 2019, 38(1): 154–157.
- Liu XY, Cao T, Fu XO, *et al.* Preliminary evaluation of antioxidant capacity of Guangdong Hakka yellow rice wine *in vitro* [J]. *China Brew*, 2019, 38(1): 154–157.
- [16] 曹甜, 刘晓艳, 刘露, 等. 客家黄酒多糖提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业*, 2018, 39(10): 40–45.
- Cao T, Liu XY, Liu L, *et al.* Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from Hakka rice wine [J]. *Food Ind*, 2018, 39(10): 40–45.
- [17] 徐秋月, 周志磊, 毛健, 等. 固相萃取-高效液相法测定黄酒中多酚[J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(10): 1021–1027.
- Xu QY, Zhou ZL, Mao J, *et al.* Determination of poly-phenols in rice wine by solid phase extraction HPLC [J]. *J Food Biotechnol*, 2018, 37(10): 1021–1027.
- [18] 胡博然, 阴淑贞, 闻雯, 等. 干白葡萄酒清除自由基的能力及其与总酚含量的关系[J]. *食品发酵工业*, 2011, 37(11): 60–64.
- Hu BR, Yin SZ, Wen W, *et al.* The ability of dry white wine to scavenge from mountain base and its relationship with total phenol content [J]. *Food Ferment Ind*, 2011, 37(11): 60–64.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李 灿, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术研究。
E-mail: 491291349@qq.com



陈同强, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术研究。
E-mail: 351155452@qq.com