

基于发酵原理的淡豆豉异黄酮分析方法

王思齐, 王满元*, 仇峰, 阮佳琦, 史赫男

(首都医科大学 中医药学院, 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069)

[摘要] **目的:**探究淡豆豉中异黄酮合适的分析评价方法,分析《中国药典》方法(简称药典法)的科学性。**方法:**从发酵原理的角度,分析淡豆豉异黄酮不同分析方法的差异;应用高效液相色谱法,同时定量分析药典法淡豆豉与对照组淡豆豉发酵过程中3种异黄酮苷元的变化。**结果:**淡豆豉中大豆苷元、黄豆黄素、染料木素3种苷元的线性、精密性、重复性、稳定性均良好,平均加样回收率分别为99.76%,99.96%,100.22%。与前酵制曲工序结束样品相比,两种方法经过后酵再闷工序后,苷元含量显著增加;与对照组相比,药典法工艺制备淡豆豉样品异黄酮苷元总量有显著优势,以后发酵再闷15 d作为发酵终点,异黄酮苷元总量可达 $1\ 212.23\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。**结论:**历代以来,淡豆豉发酵制备讲究“发透”。从发酵原理分析,淡豆豉发酵制备过程中异黄酮总量略有下降,异黄酮苷元类化合物含量显著升高。采用HPLC法直接定量分析生物活性较高的异黄酮苷元类成分,该分析方法较为简单,灵敏度、准确度较高,建立合适的标准,可更有效控制淡豆豉的质量。药典法收载工艺发酵制备的淡豆豉,质量较佳。

[关键词] 淡豆豉; 异黄酮; 高效液相色谱法; 辅料; 系统误差

[中图分类号] R284.1;R289;R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)15-0100-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181513

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180516.1029.030.html>

[网络出版时间] 2018-05-16 13:56

Evaluation Method of Isoflavones in Semen Sojæ Preparatum Based on Fermentation Process

WANG Si-qi, WANG Man-yuan*, QIU Feng, RUAN Jia-qi, SHI He-nan

(School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the suitable evaluation method of isoflavones in Semen Sojæ Preparatum (SSP), in order to analyze the scientificity of the method in *Chinese Pharmacopoeia*. **Method:** Based on the principle of fermentation, the differences of various analysis methods of isoflavone from SSP were analyzed; and HPLC method was used for the determination of daidzein, glycitein and genistein during the fermentation process of the pharmacopoeia group and the control group. **Result:** The linearity, precision, repeatability and stability of daidzein, glycitein and genistein were all good, with the average sample recoveries of 99.76%, 99.96%, 100.22%. Compared with the pre-fermented samples, the content of glycosides increased significantly in the post-fermented samples in the two groups. The total amount of isoflavone glycosides in the samples of the pharmacopoeia group was significantly better than that of the control group. With the 15-days post-fermentation as the end of fermentation, the content of isoflavone glycosides can reach about $1\ 212.23\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. **Conclusion:** Since the previous dynasties, the production standard of SSP has been focused on full fermentation. According to the analysis of fermentation principle, the total molar mass of isoflavones in the fermentation process of SSP was

[收稿日期] 20180104(012)

[基金项目] 国家公益性行业科研专项(201507004-03-4)

[第一作者] 王思齐,在读硕士,从事中药活性成分及炮制原理研究,Tel:010-83950165,E-mail:siqiawang33@163.com

[通信作者] *王满元,博士,教授,从事中药活性成分及炮制原理研究,Tel:010-83916548,E-mail:wangmy@ccmu.edu.cn

unchanged or slightly decreased, and the content of isoflavone aglucones was significantly increased. The HPLC method was used to directly quantify the isoflavone compounds with a higher bioactivity, which was simple and highly sensitive and accurate. With the suitable standard established, it was effective to control the quality of SSP. SSP fermented by the pharmacopoeia method shows a better quality.

[Key words] Semen Sojae Preparatum; isoflavones; HPLC; fermented material; systematic error

淡豆豉是唯一一味从 1963 年版至 2015 年版《中国药典》一直收载制法工艺及质量标准的发酵类中药饮片^[1]。然而长期以来,其质量控制水平仍然较低,不能有效保证药物质量。淡豆豉具有解表、除烦、宣发郁热的功效,用于感冒、寒热头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠,在临床上常配伍应用,如葱豉汤、栀子豉汤等。

目前淡豆豉的药效物质基础尚不明确,有研究表明大豆低聚糖、大豆皂苷、大豆异黄酮,具有一定的生物活性。其中,大豆低聚糖属于天然保健食品,很难被人体消化吸收,但可以通过促进人体肠道益生菌快速增殖等方式有效降低血脂水平,还可以抑菌,具有抗氧化功能。大豆皂苷与大豆异黄酮均具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖^[2]、降血脂^[3]的功效,对动脉粥样硬化类心血管系统疾病具有良好的改善作用^[4-8],可以减少脂肪在冠状动脉壁沉积,从而抑制动脉粥样硬化发生率以及动脉粥样硬化形成,大豆异黄酮可以对缺血性心脏病起到保护作用,从而使血液循环通畅。大豆异黄酮具有特殊的化学结构,与人体内分泌的雌激素雌二醇(E₂)很相似,可在一定条件下表现出类似雌激素的生物活性,故又被叫做天然植物雌激素,可以对内分泌与代谢系统疾病具有良好的调节改善作用^[9]。可以看出,大豆异黄酮在淡豆豉发挥疗效时,起重要作用。

结合淡豆豉化学成分的生物活性与药效作用进行分析。针对淡豆豉治疗感冒的功效,尚无明确的化学成分具有解表退热作用。笔者对淡豆豉药物对干酪菌致发热模型大鼠的解热作用进行研究,发现淡豆豉本身并无明显的退热功效。配伍栀子后,也并未增强其退热作用,表明淡豆豉的解表作用较弱,不适宜作为质量评价指标。针对淡豆豉治疗头痛的作用,大豆皂苷以及大豆异黄酮均可以在一定程度上改善心血管系统疾病,如降血糖、降血脂等,可以作为指标性成分进行定量。针对淡豆豉治疗更年期综合征,在淡豆豉中,起到除烦、宣发郁热功效的化学成分为大豆异黄酮类成分,可以缓解更年期综合征伴随的骨质疏松,并且在一定范围内,大豆异黄酮的雌激素样作用存在量效关系,测定大豆异黄酮含

量的高低,可以代表淡豆豉的除烦、宣发郁热作用强弱,因此可以通过评价淡豆豉中异黄酮类成分,控制其质量。

淡豆豉发酵原料大豆中含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物,并且含有具有生物活性的大豆异黄酮、大豆皂苷等成分,在发酵后,蛋白质等大分子营养物质分解,变为小分子,有利于人体的吸收。在微生物的酶解作用下,活性成分异黄酮与大豆皂苷糖苷键断裂,这类次生代谢产物会发生“苷”向“苷元”的转化。大豆皂苷含量的测定方法,多采用香草醛-高氯酸比色法进行总皂苷的定量,研究发现,总皂苷在发酵过程中有损失,含量有所降低,但变化不明显,以此为指标评价淡豆豉质量较为困难。因此,不对其进行质量评价。

大豆异黄酮的含量变化受到了极大关注。文献报道的大豆异黄酮测定方法,主要有紫外分光光度法(UV)^[10]及高效液相色谱法(HPLC)^[11-13]。不少学者采用 UV 测定淡豆豉总黄酮的含量,大多认为,大豆发酵制备成淡豆豉后总黄酮含量增加^[10,14]。笔者认为异黄酮在植物中分布有局限性,即使在发酵过程中存在化学成分的转移与转化过程,其摩尔含量亦不应显著增加;发酵过程中应用的桑叶及青蒿等辅料,含有黄酮、香豆素及有机酸等酚酸类成分,也会对 UV 测定结果造成干扰。总体上,应用 UV 测定发酵前后总黄酮来评价淡豆豉异黄酮的变化规律是不合理的,存在系统误差。HPLC 测定淡豆豉异黄酮多组分的方法研究较多。大豆异黄酮目前已知共有基于 3 类苷元结构(大豆苷元、黄豆黄素、染料木素)的 12 种化合物^[12],包括 3 种乙酰基葡萄糖苷,3 种丙二酰基葡萄糖苷,3 种葡萄糖苷以及 3 种异黄酮苷元。不同团队采用 HPLC 直接定量分析大豆发酵制品中异黄酮类化合物的总含量。考虑到异黄酮苷水解转化为苷元,糖苷配基丢失,其总含量自然会降低,研究者为准确评价其变化规律,将异黄酮苷全部折算为相应的苷元以计量总异黄酮。WANG 等^[15-16]分别对发酵过程中不同品种豆豉的异黄酮含量进行评价,发现在发酵加工过程中,异黄酮含量存在损失,分别达到了 76% 和 61%。采用

HPLC-MS 同时定量 12 种异黄酮的方法虽然比较准确,然而该法花费较高,推广较困难,并且其大豆异黄酮总量在发酵过程中逐步降低,总量不适宜作为指标评价淡豆豉质量。传统工艺发酵淡豆豉的质量优劣取决于是否发“透”,优质淡豆豉中异黄酮大部分会转化为生物活性较高的苷元形式。

淡豆豉的炮制工艺,《中国药典》标准及各地方炮制规范均有记载,但存在差异。部分地区不使用辅料,也有仅采用单次发酵工艺,不包含再闷工艺的发酵方法。目前《中国药典》收录的淡豆豉的炮制工艺应用桑叶、青蒿作为辅料,包含前酵制曲与后酵再闷工序为主要流通工艺。本研究以《中国药典》方法(药典法)为研究对象,制作不添加辅料的对照样品,分析药典法发酵淡豆豉的科学性,建立 HPLC-DAD 同时测定 3 种大豆异黄酮苷元的方法,优化药典炮制工艺,为淡豆豉的质量提升提供依据。

1 材料

黑大豆、青蒿、桑叶购自河北安国药材市场,由首都医科大学中医药学院王满元教授鉴定均为正品。淡豆豉参考 2015 年版《中国药典》^[1]炮制而成,其制作工艺流程为大豆筛选→辅料煎液浸泡→沥干→蒸煮→冷却→自然发酵制曲→洗曲→后发酵(再闷)→略蒸、干燥→成品。根据添加辅料有无,分为桑叶、青蒿煎液浸泡的药典法组淡豆豉(YD)与不加辅料发酵清水浸泡的对照组淡豆豉(DZ)。取样点代表豆豉样品不同的发酵阶段,见表 1。DZ 样品组的取样点同 YD 组。

表 1 淡豆豉编号及制备工艺信息

Table 1 Information of sampling number and preparation

编号	制备工艺	编号	制备工艺
S0	原料大豆(黑大豆)	DZ1	对照组蒸煮后大豆,制曲 0 d
YD1	药典法组蒸煮后大豆,制曲 0 d	DZ2	对照组制曲 3 d,前酵结束
YD2	药典法组制曲 3 d,前酵结束	DZ3	对照组后发酵 7 d
YD3	药典法组后发酵 7 d	DZ4	对照组后发酵 12 d
YD4	药典法组后发酵 12 d	DZ5	对照组后发酵 15 d
YD5	药典法组后发酵 15 d	DZ6	对照组后发酵 17 d
YD6	药典法组后发酵 17 d	DZ7	对照组后发酵 20 d
YD7	药典法组后发酵 20 d		

染料木素,大豆苷元(中国食品药品检定研究所,批号 111709-200501,111502-200402,纯度 99.1%,99.0%),黄豆黄素(美国 Sigma,批号

BCBP9034V,纯度 98%)。乙腈(色谱纯,美国 Fisher),水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为国产分析纯。

DV215CD 型电子分析天平(奥豪斯仪器有限公司),HWS-150B 型恒温恒湿箱(天津市泰斯特仪器有限公司),KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);日本岛津高效液相色谱仪,包含 LC-20AT 泵,SIL-20A 恒温自动进样器,CTO-20A 柱温箱,SPD-M20A 检测器,LC solution 色谱工作站。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A 为 0.1% 冰乙酸, B 为乙腈,梯度洗脱(0 ~ 25 min, 20% ~ 45% B);检测波长 260 nm;柱温 30 °C;流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 20 μL。

2.2 供试品溶液 取 S0 以及 YD, DZ 各取样点样品,真空冷冻干燥后,粉碎,过 40 目筛,精密称取 0.5 g,加 80% 甲醇溶液 25 mL,超声提取 1 h,过滤,取续滤液,用 0.45 μm 有机滤膜过滤,即得供试品溶液。

2.3 对照品溶液 精密称取大豆苷元、黄豆黄素、染料木素适量,80% 甲醇配制为 1 g·L⁻¹的对照品储备液,精密吸取每种对照品储备液,配成每种质量浓度为 10 mg·L⁻¹的混合对照品储备液。取混合对照品储备液,依次稀释为 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg·L⁻¹,进样量 20 μL。

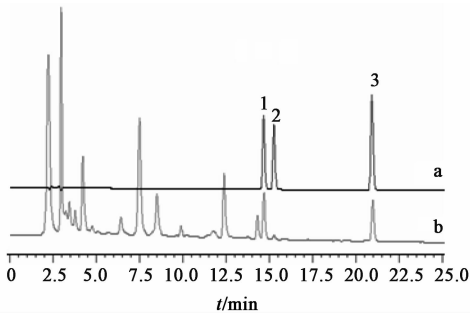
2.4 测定方法 精密吸取供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪中,按 2.1 项下色谱条件进行测定。计算样品中各成分含量。

3 结果

3.1 大豆异黄酮苷元系统适用性试验 大豆异黄酮苷元经过 HPLC-DAD 测定,依据单一对照品保留时间对样品中的组分进行定性,可得到大豆异黄酮苷元混合对照品的 HPLC,对照品与样品色谱图见图 1。其中大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的保留时间分别为 14.662, 15.257, 20.917 min。该条件下系统适用性良好。

3.2 大豆异黄酮苷元的线性关系 经过 HPLC-DAD 测定,以质量浓度为横坐标 X,峰面积为纵坐标 Y 绘制标准曲线,其线性关系,见表 2。

3.3 精密度、重复性、稳定性试验 取淡豆豉(YD5)0.5 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,测定 3 种苷元峰面积,考察精密度。结果大豆苷元、黄豆黄素、染料木素峰面积



1. 大豆苷元;2. 黄豆黄素;3. 染料木素

图 1 大豆异黄酮苷元对照品(a)以及样品(b)的 HPLC 色谱

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed soybean isoflavone standards and sample

表 2 3 种大豆异黄酮苷元的线性关系

Table 2 Standard curve of isoflavones

成分	回归方程	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	R^2
大豆苷元	$Y=111\ 857X-2\ 170.2$	0.010 2 ~ 10.02	0.999 9
黄豆黄素	$Y=101\ 486X-2\ 193$	0.010 1 ~ 10.01	1
染料木素	$Y=157\ 117X-2\ 647.4$	0.010 0 ~ 10.00	0.999 8

的 RSD 分别为 0.1% ,0.2% ,0.1% 。

取淡豆豉(YD5) 0.5 g,精密称定,平行 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,测定 3 种苷元峰面积,考察重复性。结果大豆苷元、黄豆黄素、染料木素含量的 RSD 分别为 0.1% ,0.2% ,0.03% 。

取淡豆豉(YD5)供试品溶液,分别于 0,2,4,8,12,24 h 进样,测定 3 种苷元峰面积,考察稳定性。结果大豆苷元、黄豆黄素、染料木素峰面积的 RSD 分别为 0.2% ,1.6% ,0.02% 。

3.4 加样回收率试验 取已知含量的淡豆豉(YD5)粉末,精密称定,分别加入与相应含量的大豆苷元、黄豆黄素、染料木素混合对照品溶液,平行 6 份,按 2.2 项下方法进行提取,测定 3 种苷元峰面积,考察加样回收率。大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的加样回收率分别为 99.76% ,99.96% ,100.22% ,RSD 分别为 1.2% ,1.0% ,0.5% 。

3.5 样品中大豆异黄酮含量测定 淡豆豉发酵过程中 3 种异黄酮苷元含量测定结果见表 3。结果显示,发酵过程中的每个取样点与原料黑大豆相比,苷元含量及总量都与黑大豆具有极显著性差异,说明在苷元水平,发酵样品与黑大豆具有极显著性差异;对比相同取样时间点的不同发酵工艺淡豆豉,在绝大部分发酵时间点,YD 组都与 DZ 组的苷元含量具有极显著性差异,且 YD 组样品苷元含量水平更高,添加辅料对淡豆豉发酵更有利;对比后发酵样品与

前发酵样品,无论是 YD 组还是 DZ 组,后发酵不同时间样品,与前酵结束样品(YD2,DZ2)在 3 种异黄酮苷元含量上,存在极显著性差异。说明后酵过程可以显著增加异黄酮苷元含量,后酵工序在淡豆豉发酵中,是必要步骤。为明确后酵具体时间,对比分析两种发酵工艺后酵过程相邻取样时间点的异黄酮苷元含量差异,发现仅有 YD5 与 YD6,YD6 与 YD7,DZ5 与 DZ6,DZ6 与 DZ7 的大豆苷元含量,以及 YD4 与 YD5,YD6 与 YD7 的黄豆黄素含量相比,没有显著性差异,大部分相邻时间点淡豆豉的异黄酮苷元具有显著性差异。说明发酵过程中的异黄酮类成分含量始终在发生变化,并且后发酵过程中,苷元含量先上升,后下降,染料木素的含量下降的最为显著。提示在异黄酮苷元含量达到峰值后,继续发酵,会导致异黄酮苷元含量的显著性损失,提示后酵时间为影响淡豆豉异黄酮苷元含量的重要因素。结合发酵数据,后发酵 15 d,淡豆豉中的异黄酮苷元含量最高,发酵的淡豆豉质量最好。

表 3 样品中 3 种大豆异黄酮苷元质量分数($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Change in soybean isoflavone composition during SSP fermentation($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	大豆苷元	黄豆黄素	染料木素	苷元总量
S0	6.06 ± 0.23	2.15 ± 0.13	4.51 ± 0.51	12.72 ± 0.52
YD1	37.13 ± 0.62 ¹⁾	8.24 ± 0.25 ¹⁾	35.84 ± 0.77 ¹⁾	81.21 ± 1.05 ¹⁾
YD2	126.59 ± 1.18 ¹⁾	14.59 ± 0.52 ¹⁾	74.42 ± 0.52 ¹⁾	215.6 ± 2.88 ¹⁾
YD3	513.04 ± 11.91 ¹⁾	52.57 ± 0.51 ¹⁾	189.13 ± 1.03 ¹⁾	754.74 ± 1.64 ¹⁾
YD4	583.87 ± 4.81 ¹⁾	72.81 ± 1.05 ¹⁾	395.62 ± 0.54 ¹⁾	1 052.3 ± 3.95 ¹⁾
YD5	607.32 ± 1.14 ¹⁾	74.45 ± 0.51 ¹⁾	530.46 ± 0.51 ¹⁾	1 212.23 ± 2.21 ¹⁾
YD6	594.47 ± 5.51 ¹⁾	72.43 ± 0.52 ¹⁾	392.34 ± 0.57 ¹⁾	1 059.24 ± 3.73 ¹⁾
YD7	583.17 ± 3.82 ¹⁾	72.56 ± 0.51 ¹⁾	311.15 ± 1.03 ¹⁾	966.88 ± 3.69 ¹⁾
DZ1	19.05 ± 0.12 ^{1,2)}	4.66 ± 0.57 ^{1,2)}	17.58 ± 0.52 ^{1,2)}	41.28 ± 1.13 ^{1,2)}
DZ2	97.03 ± 1.01 ^{1,2)}	10.46 ± 0.51 ^{1,2)}	53.66 ± 0.57 ^{1,2)}	161.14 ± 1.05 ^{1,2)}
DZ3	365.21 ± 2.86 ^{1,2)}	48.37 ± 0.55 ^{1,2)}	233.87 ± 1.02 ^{1,2)}	647.45 ± 1.25 ^{1,2)}
DZ4	297.46 ± 6.46 ^{1,2)}	71.46 ± 0.51 ¹⁾	398.4 ± 0.53 ^{1,2)}	482.87 ± 5.52 ^{1,2)}
DZ5	345.94 ± 5.26 ^{1,2)}	74.63 ± 0.55 ¹⁾	520.13 ± 1.63 ^{1,2)}	940.7 ± 4.15 ^{1,2)}
DZ6	334.99 ± 13.22 ^{1,2)}	64.52 ± 0.51 ^{1,2)}	325.47 ± 4.75 ^{1,2)}	724.98 ± 3.63 ^{1,2)}
DZ7	327.5 ± 7.51 ^{1,2)}	54.38 ± 0.54 ^{1,2)}	100.07 ± 1.11 ^{1,2)}	481.96 ± 4.61 ^{1,2)}

注:与 S0 比较¹⁾ $P < 0.01$;与 YD 组相同取样时间点比较²⁾ $P < 0.01$ 。

对比发酵成品与黑大豆的异黄酮苷元含量,YD 组大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的含量分别增加了约 100,30,100 倍;DZ 组大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的含量分别增加了约 50,30,100 倍。成品的苷

元含量水平较高,生产的淡豆豉质量较好。并且YD组发酵淡豆豉更有优势。

4 讨论

4.1 UV测定淡豆豉总黄酮的系统误差 发酵过程中,作者曾采用灵敏度较高的LC-ESI-MS/MS对淡豆豉发酵过程中辅料的成分进行定性分析。对YD组样品可能存在的转移成分芦丁、槲皮素、紫花牡荆素、芹菜素、木犀草素、山柰酚、瑞香素、七叶亭、滨蒿内酯、东莨菪苷、青蒿素、青蒿乙素、青蒿丙素、青蒿酸、二氢青蒿酸、猫眼草酚D进行分析,发现在YD组辅料中的槲皮素、紫花牡荆素、青蒿素、青蒿乙素、青蒿丙素、青蒿酸、二氢青蒿酸、猫眼草酚D均能检测到。虽然倍半萜类成分在紫外吸收波段260 nm左右处无明显吸收峰,但是黄酮、香豆素等酚酸类成分必然会干扰UV定量评价淡豆豉异黄酮的结果。总体上评价,发酵过程中营养成分的损失以及辅料的转移成分,都会对UV法直接测定总黄酮从而评价淡豆豉异黄酮变化规律的方法产生影响,从而出现系统误差。

4.2 基于发酵原理的异黄酮定量方法 淡豆豉异黄酮在发酵过程中,糖苷键断裂,糖苷配基丢失,转化为苷元后,其异黄酮总质量含量理应下降。理论上,若只存在12种异黄酮之间的酶解转化,不考虑降解等损失,异黄酮的摩尔含量应该保持一致。实际上,在复杂的发酵过程中,受多重因素的影响,大豆异黄酮会发生降解。索化夷等^[17]开展的相关研究证实了发酵过程中异黄酮确实存在相当程度的降解损失。

在大豆异黄酮组分方面,研究表明发酵前的浸泡与加热环节可使乙酰基与丙二酰基葡萄糖苷异黄酮转化为葡萄糖苷型^[12,18-19],淡豆豉发酵成品中主要含有6种异黄酮类成分,即3种单糖苷及3种异黄酮苷元。淡豆豉传统制备工艺要求达到“发透”的标准,其实质是“糖苷应尽量转化为苷元”,3种单糖苷在成品中的含量不应过高。笔者测定了YD5样品中的3种葡萄糖苷异黄酮的含量,结果显示,黄豆苷与大豆苷含量低于定量限度,含量最高的染料木苷的含量在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 左右,远远低于苷元类含量。总之,淡豆豉发酵成品中的异黄酮组分主要是3种苷元。在整个发酵过程中,都会伴随异黄酮类成分的损失^[15-16],过度发酵会显著降低成品中生物活性较高的异黄酮苷元类化合物的含量。从发酵原理分析,以3种苷元为指标,可以优化发酵条件,更好地控制淡豆豉质量。

4.3 药典法工艺的科学性 淡豆豉目前“各地各法”现象仍较为突出,对于淡豆豉发酵是否需要“后酵”,有一些争议。2015年版《中国药典》收载工艺包含“再闷”的后发酵阶段。本研究结果显示,YD组与DZ组“前酵制曲”阶段异黄酮苷元含量水平相近,“后酵”后两组淡豆豉异黄酮苷元含量显著增加,淡豆豉制备工艺中需要“后酵”工序。并且在相同发酵时间,YD组发酵淡豆豉的异黄酮苷元含量水平均高于DZ组淡豆豉,加入辅料发酵的工艺可以发酵出质量更好的淡豆豉。药典法下发酵的淡豆豉质量更佳,优化后发酵时间为15 d,优化后的药典法最佳工艺为取桑叶、青蒿各70~100 g,加水煎煮,滤过,煎液拌入净大豆1 000 g中,待吸尽后,蒸透,取出,稍晾,置容器内,用煎过的桑叶、青蒿渣覆盖,闷并发酵至黄衣上遍时,取出,除去药渣,洗净,置容器内再闷15 d,至充分发酵、香气溢出时,取出,略蒸,干燥,即得。发酵成品淡豆豉异黄酮苷元总量可达 $1\ 212.23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,远高于一般市售样品的异黄酮苷元含量。

《中国药典》收载的淡豆豉炮制工艺使用辅料桑叶与青蒿,能够调控微生物的生长^[20]。本研究发现,YD组样品微生物性状均匀稳定,发酵全过程生长状态良好;DZ组淡豆豉发酵过程中,微生物缺少外部制约,容易产生杂菌,会影响发酵的程度和产品质量。以异黄酮苷元含量为指标,药典法发酵具有优势。由于目前淡豆豉的质量控制水平较低,异黄酮作为淡豆豉中的主要活性成分,具有多种生理活性,应该受到更多关注。异黄酮苷元是淡豆豉发酵后异黄酮的最终转化形式,并且其生物活性高于其糖苷,建议增加淡豆豉中异黄酮苷元的含量限度,以更好地控制淡豆豉质量。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:328.
- [2] 张静. 中药淡豆豉有效成分含量与结构分析以及降血糖机理研究[D]. 北京:北京化工大学,2008.
- [3] 张亮. 大豆异黄酮降脂作用及其机制研究[D]. 延吉:延边大学,2014.
- [4] 李培兵,王永辉,邓炳楠,等. 大豆异黄酮对动脉粥样硬化小鼠 Nrf2 核转位和抗氧化功能的影响[J]. 营养学报,2015,37(1):47-50.
- [5] 买文丽,刘行海,刘亮,等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠学习记忆和海马谷氨酸细胞及 NR2B 受体的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(15):160-163.

- [6] 买文丽,刘行海,刘亮,等.大豆异黄酮对去卵巢大鼠学习记忆和脑内神经递质的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(21):223-226.
- [7] 曾靖,黄志华,李良东,等.3'-大豆苷元磺酸钠对大鼠脑缺血再灌注损伤后视网膜作用的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):197-200.
- [8] 钟声,李泽玲,钟星明,等.大豆苷元对异丙肾上腺素所致心肌肥厚与抗氧化的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(9):204-206.
- [9] 李琛,师哲,冯薇,等.淡豆豉异黄酮对大鼠成骨细胞增殖及雌激素受体表达的影响[J].中成药,2015,37(9):1901-1905.
- [10] 崔力剑,黄芸,詹文红,等.发酵处理对大豆中总异黄酮含量的影响[J].大豆科学,2007,26(4):588-590,596.
- [11] 陈岑,宋粉云,范国荣,等.ASE-HPLC-ESI-IT/MS法分析淡豆豉中大豆异黄酮类化合物[J].广东药学院学报,2014,30(2):164-168.
- [12] Lee M J, Chung I M, Kim H, et al. High resolution LC-ESI-TOF-mass spectrometry method for fast separation, identification, and quantification of 12 isoflavones in soybeans and soybean products[J]. Food Chem, 2015, 176:254-262.
- [13] 张景,冯亭亭,张明柱.淡豆豉 UPLC 指纹图谱[J].中成药,2017,39(7):1531-1533.
- [14] 霍红,田明,王秀海,等.大豆与其生物发酵制品淡豆豉异黄酮含量研究[J].中医药学报,2011,39(3):74-76.
- [15] WANG H J, Murphy P A. Mass balance study of isoflavones during Soybean processing [J]. J Agricult Food Chem, 1996,44(8):2377-2383.
- [16] WANG L J, YIN L J, LI D, et al. Influences of processing and NaCl supplementation on isoflavone contents and composition during douchi manufacturing [J]. Food Chem, 2007,101(3):1247-1253.
- [17] 索化夷,蹇宇,卢露,等.永川豆豉传统发酵过程中的大豆异黄酮变化[J].食品科学,2012,33(8):270-273.
- [18] Mahungu S M, Diaz-Mercado S, LI J, et al. Stability of isoflavones during extrusion processing of Corn/Soy mixture [J]. J Agricult Food Chem, 1999, 47(1):279-284.
- [19] Otieno D O, Ashton J F, Shah N P. Isoflavone phytoestrogen degradation in fermented soymilk with selected beta-glucosidase producing *L. acidophilus* strains during storage at different temperatures[J]. Int J Food Microbiol, 2007,115(1):79-88.
- [20] 陈丽艳,刘青,张蕾,等.分离筛选淡豆豉发酵菌的培养基优化[J].中国现代中药,2016,18(7):822-825.

[责任编辑 顾雪竹]