高粱单宁的结构、分布及分析方法综述

郑学玲,王旭娟,韩小贤
河南工业大学 粮油食品学院,河南 郑州 450001

摘要:当高粱作为酿酒材料时,单宁的存在有着积极的影响,但是作为饲料时单宁的存在则会降低动物的消化效率。由于高粱单宁结构复杂,定量测定相对来说较为困难。主要从高粱单宁的化学结构、分布、提纯分离与结构鉴定、测定方法以及影响其含量测定的因素进行综述。测定方法主要围绕分光光度法、蛋白质沉淀法以及高压液相色谱法进行讨论。

关键词:高粱单宁;结构;分布;测定方法;影响因素
中图分类号:TS201.2　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1673-2383(2020)02-0132-09
DOI:10.16433/j.1673-2383.2020.02.021

A review on structures, distribution and analysis methods for sorghum tannins

ZHENG Xueling, WANG Xujuan, HAN Xiaoxian
College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Sorghum tannins have positive effects on sorghum winemaking and negative effects on digestive efficiency of animals. Due to the complex structure of sorghum tannins, it is relatively difficult to determine. This paper mainly reviewed chemical structures, distribution, determination methods and factors affecting the determination of tannins in sorghum. Determination methods including spectrophotometry, protein precipitation and HPLC were mainly discussed.

Key words: sorghum tannins; structure; distribution; determination method; influencing factors

高粱单宁溶于水、甲醇、乙醇、丙酮,微溶于乙酸乙酯,不溶于苯、氯仿、石油醚、二硫化碳,其多酚羟基基团与蛋白质、金属离子或者别的大分子如多糖可以生成复合物[1],从而阻碍机体对蛋白质、脂肪等营养物质的消化吸收,且具有苦涩味,影响适口性;高粱中单宁的含量是决定其品质的重要指标。高粱单宁还具有潜在的健康益处,如自由基清除剂和化学保护剂[2-3],是非常好的抗氧化剂源,有着各种各样的用途。长期以来,人们发现含有单宁的高粱作为饲料使得动物消化效率降低,并对单胃动物(大鼠、猪、家禽等)的体质量增加产生负面影响。饲料消化效率的降低主要归因于高粱单宁-蛋白质的络合作用[4-5]。虽然单宁可使蛋白质变得不易被人体吸收,但盲肠中的微生物可以将多聚单宁降解成小分子的酚酸,这些酚酸在盲肠中是可以被动物机体吸收的,同时单宁可以降低人对食物的消化速率,这一特性对Ⅱ型糖尿病的治疗有一定的效果,还能够结合营养物质,降低食物的卡路里。

由于高粱单宁结构比较复杂,定量测定相对来说较为困难,目前已经使用许多分析方法来量化植物材料中的单宁[6]。常用的方法包括单宁的氧化解聚与芳香醛的反应[7],以及氧化还原反应[8],其他方法还涉及酸裂解反应[9],沉淀反应[10],酶和微生物抑制和质量分析以及昂贵的核磁共振技术以及高压液相色谱法[11]等。

作者主要从高粱单宁的结构、分布、分离纯化鉴定、测定检测方法以及在测定高粱单宁含量

收稿日期:2019-06-20
基金项目:国际标准修订 ISO9648"Sorghum-determination of tannin content"(ISO/TC34/SC4)
作者简介:郑学玲(1972—),女,河南宁陵人,教授,博士生导师,研究方向为谷物化学与品质。

过程中的影响因素等方面进行综述。

1　高粱单宁的结构

单宁根据结构特性可以分为两类:一类是水解单宁,另一类是缩合单宁。水解单宁是棓酸,或与棓酸有生源关系的酚羧酸与多元醇组成的酯,其分子内的酯键在酸、酶或碱的作用下易水解,产生多元醇及酚酸。其中常作为高粱单宁含量测定标准品的单宁酸(图 1a)则为水解单宁。水解后生成一个葡萄糖分子及多个多元醇[12]。缩合单宁是多羟基黄烷-3-醇寡聚体或者多聚体,黄烷醇单体之间通过 C—C 键连接。缩合单宁又称原花青素,由表儿茶素和儿茶素亚基组成,其主要通过C4→C8 键连接的黄烷-3-醇单元组成低聚物和高聚物的混合物,也可能通过C4→C6 键的连接,均称为 B 型原花青素(图 1b)。黄烷-3-醇单元也可以通过 C2→O7 之间的醚键双键连接,为 A 型原花青素(图 1c)[13]。从结构上分析,高粱单宁属于 B 型原花青素中的一种。有学者[14]采用正相 HPLC-MS/MS 方法,并利用硫解测定高粱中原花青素的平均聚合度(*DP*)为 17.67±3.92。

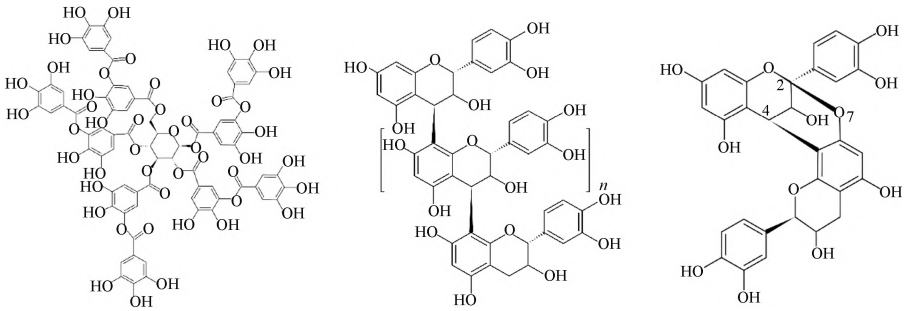


图 1　单宁的结构

Fig.1　Chemical structures of tannins

2　高粱单宁的分布

高粱单宁主要分布在种皮上,胚乳中也有一定的含量,其具体含量因品种而异,变化幅度为 0.2%~2.3%[15],然而种皮颜色也并不完全是高粱单宁含量高低的可靠指示剂。Boren 等[16]研究了不同种皮颜色的高粱中单宁的含量,结果表明,种皮颜色及其强度不是单宁含量的良好指标。人们一直错误地认为所有具有红色/褐色种皮的高粱都含有单宁,其实无论白色、黄色、红色或棕色种皮的高粱是否存在单宁主要取决于着色种皮基因的控制。Dykes 等[17]根据它们的遗传学和化学分析,将高粱品种划分为 3 组:Ⅰ型高粱($b_1b_1B_2-$、$B_1-b_2b_2$、$b_1b_1b_2b_2$)没有色素种皮,含有低水平的酚类物质而不含单宁;Ⅱ型高粱和Ⅲ型高粱均具有色素并含有单宁。Earp 等[18]研究表明Ⅱ型高粱的单宁在种皮层中沉积不同。在Ⅱ型高粱的籽粒中,单宁沉积在种皮层内的囊泡中,而Ⅲ型单宁沿着种皮的细胞壁沉积,有的存在于果皮中,这可以解释为什么酸可以破坏囊泡的结构,从而释放Ⅱ型高粱中的单宁。

3　高粱单宁的提纯分离与结构鉴定

高粱中单宁的提取率与提取条件密切相关。高粱的贮存方式、干燥、粉碎度、提取溶剂、温度等都可能导致单宁化学结构的变化和提取率的改变,从而改变单宁的理化性质和生物活性。

高粱单宁分离纯化的方法主要有:溶剂萃取分离法、膜过滤法、层析法、制备液相色谱法等,其中层析法效果好,成本低,色谱填料主要有:NKA、ADS-17、Sephadex LH-20、硅胶柱及聚酰胺等[19]。Sephadex LH-20 是一种对黄酮类化合物具有高度亲和性的羟丙基化葡聚糖凝胶,目前多用于高粱单宁的纯化和分离[20],但是其价格昂贵,层析操作过程烦琐,不利于实验室的推广应用。

Strumeyer 等[20]提出了提取分离高粱单宁的新方法:100 g 高粱粉碎后,用无水乙醚(3×125 mL)脱脂,干燥后的样品质量为 89 g,然后加

入 95%乙醇(2×125 mL)在 25 ℃下提取 1 h,离心取上清液旋转蒸发得 6.8 g 固体。样品干燥后,加载到葡聚糖 LH-20(Sephadex LH-20)层析柱上,分别采用无水乙醇与 50%丙酮溶液进行洗脱。结果表明,乙醇洗脱产物为非单宁多酚类物质和部分低分子量单宁,而 50%丙酮水洗脱产物则主要为高粱单宁。Awika 等[14]研究了高粱中原花青素的提取与分离,该方法采用酸化 70%丙酮进行单宁的提取,并利用高压液相色谱法(HPLC)对高粱单宁的纯度进行计算分析。Gu 等[21]建立了一种正相 HPLC-MS 方法,可将原花青素分离为 *DP* 1~10,并且可以达到基线分离,*DP*>10 的聚合物呈现一个大峰,并通过硫解测定了组成单元的比例和原花青素的平均聚合度[22]。

高粱单宁的浸提溶剂主要是对单宁有良好溶解能力的水合有机溶剂,少量水的存在能够增加单宁在有机溶剂中的溶解度,不同比例的丙酮-水是最常用的提取溶剂。提取后的原料需要进一步分离和纯化,但是过程较为困难,单宁有较大的分子量和强的极性,是许多结构与理化性质相似的复杂混合物,同时分离过程中可能发生氧化、解离等反应,改变之前的结构。虽然分离纯化方法也在不断优化,但是过程还是十分费时且对仪器设备要求比较高,所以单宁的分离纯化仍需不断探索优化。

4 高粱单宁的检测方法

4.1 分光光度法

4.1.1 柠檬酸铁铵比色法

柠檬酸铁铵比色法是国际标准 ISO 9648-1988《Sorghum-Determination of tannin content》以及国家标准 GB/T 15686—2008《高粱 单宁含量测定》所采用的对高粱单宁的分析方法,其实验原理是在碱性条件下高粱中的单宁与铁离子形成一种棕色络合物,用分光光度计在 525 nm 波长处测定其吸光度值,与标准系列比较定量。此方法存在的问题是所采用的提取溶剂为 75%二甲基甲酰胺,其毒性相比于其他方法中的提取溶剂如丙酮、乙醇的毒性大,且不利于人体降解,操作过程需要做好防护措施。而作为标准品的单宁酸属于可水解的没食子单宁,而且在高粱中从未有检测到单宁酸的存在[17]。King 等[23]研究发现单宁酸是 4 个酚类物质的混合物,其结构与高粱单宁存在一定的差异性,但作为高粱单宁含量测定的标准品还有待进一步研究。

4.1.2 磷钼酸比色法

磷钼酸比色法是国家标准 GB/T 27985—2011《饲料中单宁的测定—分光光度法》所采用的测定饲料中单宁含量的方法,其实验原理是用丙酮溶液提取饲料中单宁类化合物,经过滤后,取滤液加钨酸钠-磷钼酸混合溶液和碳酸钠溶液,显蓝色后在 760 nm 处有最大吸收波长,用单宁酸作标准曲线测定饲料中单宁含量。

磷钼酸比色法中提取液的体积与高粱的品种有一定的关系。该法单宁含量在 1 000 μg 以下时,吸光度与单宁含量成直线关系。室温下显色 25 min 后显色基本稳定,并于 3 h 内稳定。此方法简单快速,适合大量样品分析测定。但是此方法受温度影响较大,当室温高于一定温度时,显色液出现浑浊现象,使比色过程无法进行;室温低于一定温度时,又会出现在规定时间内显色液反应不完全的现象,生成的不是蓝色物质,而是绿色反应物,影响测定结果[24]。该方法作为测定植物中总酚的分析方法但不能区分高粱中非单宁多酚类物质,测定结果可能高估高粱中单宁的含量。

4.1.3 香草醛法

香草醛法是基于香草醛与缩合单宁红色复合物的生色反应。香草醛检测的关键因素有溶剂类型、酸浓度、反应时间、温度、香草醛浓度以及标准品的选择[7]。

通常香草醛法使用儿茶素作为标准品,但是一般情况的反应条件下儿茶素单体和相关的原花青素反应动力学是不同的[25]。正是由于这个问题,建议使用内标测定高粱单宁含量。香草醛法的另一个缺点是对单宁测定特异性较差,任何黄烷醇单体都能发生香草醛反应[26];同时该法也缺乏对原花青素和原翠雀定敏感性[25]。Sun 等[7]改进的香草醛法可以评估缩合单宁的分子量而不是定量总酚。

4.1.4 普鲁士蓝法

普鲁士蓝法可能是目前定量总酚最常用的方法,简单、快速和不容易被非酚类化合物干扰[27-29],但是测定高粱中单宁含量则缺乏特异性,结果存在偏高的可能性。它有两个重要缺

陷:一是在恒温条件下一段时间后会产生沉淀,色密度随时间延长而增加,温度和 pH 值也是影响色密度的关键因素[15];二是试剂加入的顺序会影响普鲁士蓝所形成的颜色。

经过 Graham 等[27]的综合研究, H_3PO_4 可用来保持颜色稳定,降低 pH 值和络合过量铁离子。只要添加 1%阿拉伯胶并放置 60 h,可以避免沉淀来稳定溶液[28-29]。试剂应该按照顺序加入:首先是样品,然后为铁氰化钾试剂,接下来加入氯化铁溶液,最后一步加入稳定溶液的试剂。氧化还原反应如下所示[30]:

酚类物质+三价的铁氰化离子→氧化酚+二价的铁氰化离子,

二价铁氰化离子+三价铁离子→普鲁士蓝。

反应时间和试剂浓度等反应条件强烈影响不溶酚羟基基团的反应性。这种测定将提供取代基活化酚基团的测量,这可能与单宁生物活性有很好的相关性。Budini 等[8]描述了一个过程:非邻位取代酚类物质如苔藓醇和间苯二酚反应后没有颜色产生,而具有一对邻基或对位酚基团的基团近似地给出了相同的颜色,没食子酸(有两个邻位酚类)[31]反应后的颜色更深。该方法灵敏度较高,反应快速并且可以节省物料,但是同样的问题是难以通过显色反应区分其他酚类物质与单宁的含量。

4.1.5　酸丁醇法

酸丁醇法具有悠久的历史[25],实验原理是利用缩合单宁的酸催化氧化解聚来产生红色花青素。Beart 等[32]描述了使用该反应来定量分析缩合单宁的方法。该方法存在以下限制和考虑因素:(1)据报道[33-34],反应介质中水分含量在颜色形成中起到了重要作用。(2)酸在裂解黄烷醇键的难易程度上差异显著,与通常黄烷醇间的 4→8 键相比,4→6 键相对来说更不容易被酸裂解,同时 A 环取代基的性质也影响酸裂解的能力[35]。(3)黄烷醇单体上的 R 基中的酚基团数影响最大吸光度的波长和花色素产物的消光系数,例如矢车菊素与飞燕草素最大吸收波长分别为 545 nm 和 557 nm[36]。(4)Porter 等[37]报道,Fe^{3+}是催化正丁醇-HCl 反应中形成颜色最有效物质,是过渡金属离子,推测过量的 Fe^{3+}抑制单宁解聚或降低花青素在相应波长下的吸光度。由于反应会产生不一致的颜色,导致一些研究人员停止使用金属离子催化剂[38]。(5)还有一个重要的影响因素是体系中酸与丁醇的比例[26],另外反应温度和时间也对反应有非常重要的影响。(6)由于高粱单宁的异质性和缺乏适当的量化标准,标准品的选择仍然是一个尚未解决的问题。

4.2　蛋白质沉淀法

使用现代技术(包括竞争性结合方法和光谱方法)检查单宁-蛋白质相互作用,已经清楚地证明蛋白质结构在复合物形成中起重要作用。蛋白质沉淀法主要是利用单宁和蛋白质产生的沉淀反应分离提纯单宁,再将单宁溶解使其与显色剂发生显色反应,并在 510 nm 波长下有最大吸收,其吸光值与单宁的含量在一定浓度范围内呈线性关系[39],由此来定量单宁的含量。

Bate-Smith 等[40]提出了一种基于单宁沉淀血红蛋白的检测方法。该方法操作比较困难,主要是由于该方法必须使用抽取的新鲜血液,而且皂苷和其他植物代谢物对单宁测定存在干扰[41]。Goldstein 等[42]提出了一种基于单宁抑制 β-葡萄糖苷酶酶活性的方法,但该方法实验原理难以解释,因为酶活性与形成的不溶性复合物之间结合的情况还有待进一步探索。

蛋白质沉淀牛血清蛋白近年来使用较多,该方法操作相对简单,方便快捷,适合实验室操作[10]。胡立志等[43]采用了蛋白质沉淀法对葡萄籽中的原花青素含量进行了测定,此法是基于牛血清蛋白和碱性磷酸酶的共沉淀作用,通过蛋白质沉淀法很好地测量了单宁的含量,并验证了方法的可行性,为实验室提供了一种方便快捷的方法。

4.3　高压液相色谱法

高压液相色谱法可以定量分析高粱单宁含量,正相和反相高压液相色谱方法已用于分离原花青素聚合物。反相高压液相色谱法用于分离较低分子量的原花青素;正相高压液相色谱法用于分离原花青素低聚物和多聚物,洗脱顺序与聚合度一致;并且串联 MS 已用于表征 $DP \leqslant 6$(通常 m/z 50~2 000)的原花青素[44]。高压液相色谱法准确度与精密度高,但是仪器价格昂贵,仍难于广泛推广应用。

反相高压液相色谱法常用的色谱柱主要是 C_{18}柱,流动相 A 为甲醇或者乙腈,流动相 B 主要是加酸水溶液,检测器为紫外检测器(UV),检测

波长为 280 nm。Jaworski 等[45]利用反相 C_{18} Radial-PAK 柱对葡萄中的酚类物质进行了高压液相色谱分析。流动相 A 为 0.5%冰醋酸水溶液,B 为 40%乙腈水溶液,原花青素 B_1、儿茶素、原花青素 B_2、表儿茶素的保留时间分别为9.4、13、15.6、20.2 min。

近些年来正相高压液相色谱法应用较多,在正相高压液相色谱法中主要是基于聚合度分离原花青素的制备方法。Kelm 等[13]进一步改进比较了 5 μm 硅胶柱(250 mm×4.6 mm)与 5 μm 二醇柱(250 mm×4.6 mm)对原花青素聚合度的分离效果,在相同色谱条件下保留特性存在显著差异。在相同色谱条件以及相同梯度洗脱条件下,二醇柱分离到十聚体部分的保留时间比在硅胶柱上所观察到的保留时间长约 50%,说明二醇柱对原花青素的亲和度较好,吸附能力较强,可以提高原花青素的分离效果。为了研究这种分离行为不是一个制造商所特有的,Robbins 等[46]在相同流动相条件下检查了 5 种二醇柱,其中根据聚合度分离的有 4 个柱子,结果表示二醇柱能达到一致的分辨率。其中 Develosil Diol 柱具有近似对称的峰形和一致的分辨率,可以用于定量实验的进一步检验和方法性能评价。HPLC 法在定量高粱单宁的过程中,缺乏市售的标准品仍是一个尚未解决问题。

5 影响高粱单宁含量测定的因素

5.1 提取溶剂

单宁通常以结合态与蛋白质、纤维素结合在一起[26],一般不容易被提取出来。通常情况下采用有机溶剂进行单宁的提取,其具有断裂氢键的作用,由于有机溶剂的渗透性比较差,一般采用水溶液作为传递介质。有机溶剂体系主要分为丙酮水体系、乙醇水体系以及甲醇水体系等。樊金玲等[47]使用 70%丙酮水溶液对原花青素进行提取,还有一些学者[32, 44, 48-49]则采用的是含 2%甲酸的 70%丙酮水溶液。乙醇是常用的提取溶剂,价格低廉,还可以回收利用,同时可以除去一些亲水性物质,金海英[50],陆胜民等[51],Cheynier[52]则分别利用 70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇对单宁进行了提取,Adamson[11]采用 70%甲醇以及 Ajm[53]使用纯甲醇对高粱单宁进行提取,发现无水甲醇更有利于随后的纯化与分析,但是甲醇不能完全提取单宁。ISO 9648、GB/T 15686—2008 则是利用 75%二甲基甲酰胺对高粱中单宁进行提取分离,但是二甲基甲酰胺毒性较强,进入人体后不容易降解,易污染环境。

5.2 样品粒度

单宁提取样品的粒度间接反映研磨和磨制的程度,在单宁测定过程中有很大的影响。然而,其效果似乎随所测的样品类型而变化,测定方法的差异也随着颗粒大小的减小而更加明显。高粱研磨时间的延长导致单宁的氧化损失,所以研磨过程中要注意高粱粉样品在空气中暴露的时间。

5.3 储藏条件

由于高粱单宁容易氧化,高粱粉碎后暴露在空气中或存放在阳光下,对单宁都有一定的影响。为了避免氧化损失,优选在研磨后 6~8 h 内对高粱单宁含量进行分析。

贮藏高粱籽粒的相对湿度对高粱中单宁的含量也会造成一定的影响。Mitaru 等[54]研究在高湿度条件下贮藏的高单宁含量的高粱,与在正常条件下低单宁含量的高粱最终所测单宁含量相似。在研究的高湿度贮藏条件下的 4 个高粱品种中,发现单宁含量在贮藏前 10 d 内下降最为明显,然后在接下来的 20 d 内下降到最低值。Davis[55-56]观察到,随着籽粒的成熟,高粱籽粒中单宁的含量逐渐下降,虽然在高水分贮藏条件下单宁失活的机理尚不完全清楚。Mitaru 等[54]指出,该过程可能类似于种子成熟过程中单宁聚合的过程,在聚合过程中水分起到了一种传质作用。在这种介质中,高粱单宁不断聚合,一旦单宁聚合度大于 10 个黄烷单体就会变得高度不溶并难以测定。

5.4 标准品

由于高粱单宁的异质性和缺乏适当量化标准,标准品的选择仍然是一个尚未解决的问题。酚类化合物与不同试剂的摩尔反应性的变化,也给高粱单宁分析参考标准的选择带来了额外的问题。单宁酸经常被选择为总酚分析中的标准品,主要原因可能是其与天然单宁有紧密结构关系,但是单宁酸为典型的水解单宁,在高粱中也没有发现单宁酸的存在。同时 King 等[23]发现单宁酸性质会因样品不同而变动。

Price 等[57]用香草醛法研究了儿茶素和部分纯化的缩合单宁的反应动力学。虽然起始动力学行为非常相似,但在后期,儿茶素和缩合单宁的反应动力学明显不同,其研究还表明儿茶素作为参考标准在颜色、产量上高估了高粱单宁而且儿茶素的标准曲线偏离了线性度。根据所采用的方法,当儿茶素被用作标准时,高估值从 1.2~4 倍不等。显然,香草醛分析中的反应动力学对于单体和聚合黄烷是非常不同的,并且只有当天然聚合物用作参考标准时才能获得真正的单宁定量估计值。

Kelm 等[13]分析了二醇柱上的荧光检测色谱峰,利用制备型 HPLC 从可可提取物中分离收集各个级分,分离得到了高纯度的原花青素,以此作为分析过程中的标准品来进行高粱中原花青素含量的分析,这种方法能非常准确地测定高粱中单宁的含量。但是制备标准品对仪器要求较高、造价昂贵且不同来源的原料所制备的标准品也有很大差距,不利于实验室的推广应用。

6　结论

高粱单宁具有复杂的化学结构,定量分析比较困难。单宁主要分布在高粱种皮中,胚乳中也有一定的含量,其分离纯化过程相对烦琐,且不利于普遍推广应用。分光光度法仍在不断优化与发展,HPLC 法虽繁琐但能较为准确地定量单宁。无论是分光光度法还是 HPLC 法,目前仍面临的问题是没有市售的标准品,快速准确地检测高粱中单宁含量的方法仍需不断发展与优化,以提高方法的准确性与特异性。

参考文献:

[1] SCHOFIELD P, MBUGUA D M, PELL A N. Analysis of condensed tannins: a review [J]. Animal Feed Science and Technology, 2001, 91(1): 21-40.

[2] AND K M R, HAGERMAN A E. Tannin-protein complexes as radical scavengers and radical sinks [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(10): 4917-4923.

[3] AWIKA J M, YANG L, BROWNING J D, et al. Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential of sorghum (Sorghum bicolor) varieties [J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(6): 1041-1046.

[4] DEAVILLE E R, GREEN R J, MUELLER-HARVEY I, et al. Hydrolyzable tannin structures influence relative globular and random coil protein binding strengths [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(11): 4554-4561.

[5] HASLAM E. Polyphenol-protein interactions [J]. Biochemical Journal, 1974, 139(1): 285-288.

[6] SMITH P. Methods in polyphenol analysis (Eds C. Santos-Buelga and G. Williamson) [J]. Australian Journal of Chemistry, 2004, 57(8): 817.

[7] SUN B, RICARDO-DA-SILVA J M, SPRANGER I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(10): 4267-4274.

[8] BUDINI R, TONELLI D, GIROTTI S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method [J].Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1980, 28(6): 1236-1238.

[9] 洪新, 唐克, 牟晓刚,等.葡萄籽中原花青素铁盐催化比色法的测定条件研究 [J].河南工业大学学报(自然科学版), 2009, 30(6): 41-46.

[10] HAGERMAN A E, BUTLER L G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins [J].Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(4): 568-569.

[11] ADAMSON G E, LAZARUS S A, MITCHELL A E, et al. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(10): 4184-

4188.

[12] DESHPANDE S S, CHERYAN M, SALUNKHE D K. Tannin analysis of food products [J]. C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1986, 24(4): 401-449.

[13] KELM M A, JOHNSON J C, ROBBINS R J, et al. High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao L.*) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(5): 1571-1576.

[14] AWIKA J M, DYKES L, GU L, et al. Processing of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products alters procyanidin oligomer and polymer distribution and content [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(18): 5516-5521.

[15] SCALBERT A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues [M]// HEMINGWAY R W, LAK P E. Plant polyphenols, New York: Plenum Press, 1992: 259-260.

[16] BOREN B, WANISKA R D. Sorghum seed color as an indicator of tannin content [J]. Journal of Applied Poultry Research, 1992, 1(1): 117-121.

[17] DYKES L, ROONEY L W. Sorghum and millet phenols and antioxidants [J]. Journal of Cereal Science, 2006, 44(3): 236-251.

[18] EARP C F, MCDONOUGH C M, AWIKA J, et al. Testa development in the caryopsis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench [J]. Journal of Cereal Science, 2004, 39(2): 303-311.

[19] WEI S D, ZHOU H C, LIN Y M. Antioxidant activities of fractions of polymeric procyanidins from stem bark of acacia confusa [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(2): 1146-1160.

[20] STRUMEYER D H, MALIN M J. Condensed tannins in grain sorghum: isolation, fractionation, and characterization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1975, 23(5): 909-914.

[21] GU L, KELM M A, HAMMERSTONE J F, et al. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(25): 7513-7521.

[22] GU L, KELM M, HAMMERSTONE J F, et al. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(17): 4852-4860.

[23] KING H G C, PRUDEN G. Lower limits of molecular weights of compounds excluded from sephadex G-25 eluted with aqueous acetone mixtures: Application of the results to the separation of the components of tannic acid [J]. Journal of Chromatography A, 1970, 52(2): 285-290.

[24] 李景琳, 王意春, 刘树琴,等. 饲料高粱单宁含量测定方法的改进 [J]. 饲料研究, 1988, 5(2): 12-13.

[25] TOMÁS-BARBERÁN F A. Analysis of phenolic plant metabolites [M]. Phytochemistry, 1995, 38(4): 1064.

[26] HAGERMAN A E, RICE M E, RITCHARD N T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin16 (4 → 8) catechin (procyanidin) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(7): 2590-2595.

[27] GRAHAM H D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(5): 801-805.

[28] BAE H D, MCALLISTER T A, MUIR A D, et al. Selection of a method of condensed tannin analysis for studies with rumen bacteria

[J]. European Journal of Cancer Supplements, 1993, 41(8): 1-18.

[29] HAGERMAN A E. Methods for determination of condensed and hydrolyzable tannins [J]. Antinutrients and Phytochemicals in Food, 1997, 662:209-222.

[30] BETA T, ROONEY L W, MAROVATSANGA L T, et al. Phenolic compounds and kernel characteristics of Zimbabwean sorghums [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79(7): 1003-1010.

[31] HASLAM E. Plant polyphenols-vegetable tannins[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

[32] BEART J E. Plant polyphenols-secondary metabolism and chemical defence: Some observations [J]. Phytochemistry, 1985, 24(1): 33-38.

[33] HAGERMAN A E, BUTLER L G. Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants [J]. Methods in Enzymology, 1994, 234(1): 429-437.

[34] DALZELL S A, KERVEN G L. A rapid method for the measurement of Leucaena spp Proanthocyanidins by the proanthocyanidin (butanol/HCl) assay [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 78(3): 405-416.

[35] GINERCHAVEZ B I, VAN SOEST P J, ROBERTSON J B, et al. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbrium [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 74(3): 359-368.

[36] HEMINGWAY R W. Reactions at the interflavanoid bond of proanthocyanidins [M]// HEMINGWAY R W, KARCHESY J J, BRANHAM S J. Chemistry and significance of condensed tannins. Boston: Springer, 1989: 265-283.

[37] PORTER L J, HRSTICH L N, CHAN B G. The conversion of procyanidins to prodelphinidins to cyanidin and delphinidin[J]. Phytochemistry, 1985,25(1):223-230.

[38] TERRILL T H, ROWAN A M, DOUGLAS G B, et al. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 58(3): 321-329.

[39] 张一中, 周福平, 张晓娟, 等. 高粱种质籽粒蛋白质含量和单宁含量的测定及聚类分析 [J]. 天津农业科学, 2017, 25(8): 10-14.

[40] BATE-SMITH E C. Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency [J]. Phytochemistry, 1973, 12(4): 907-912.

[41] BATE-SMITH E C. *Astringent tannins of Acer species* [J]. Phytochemistry, 1977, 16(9): 1421-1426.

[42] GOLDSTEIN J L, SWAIN T. The inhibition of enzymes by tannins [J]. Phytochemistry, 1965, 4(1): 185-192.

[43] 胡立志, 袁春龙, 袁琳. 蛋白-单宁沉淀法测定葡萄籽中单宁含量 [J]. 北方园艺, 2012(14): 23-26.

[44] HAMMERSTONE J F, LAZARUS S A, MITCHELL A E, et al. Identification of procyanidins in cocoa (Theobroma cacao) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(2): 490-496.

[45] JAWORSKI A W, LEE C Y. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35(2): 257-259.

[46] ROBBINS R J, LEONCZAK J, JOHNSON J C, et al. Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography-fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(24): 4831-

4840.

[47] 樊金玲, 罗磊, 武涛, 等. 沙棘籽原花色素与葡萄籽原花青素抗氧化活性的比较 [J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 26-30.

[48] WATERHOUSE A L, PRICE S F, MCCORD J D. Reverse-phase high-performance liquid chromatography methods for analysis of wine polyphenols [J]. Methods in Enzymology, 1999, 299(1): 113-121.

[49] PRIOR R L, LAZARUS S A, CAO G, et al. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*vaccinium spp.*) Using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(3):1270-1276.

[50] 金海英. 沙棘籽原花青素提取单因素实验研究 [J]. 沙棘, 2005, 18(4): 29-32.

[51] 陆胜民, 徐国军. 提取工艺条件对葡萄籽中 opc's 含量的影响 [J]. 粮油加工与食品机械, 2003(8): 63-64.

[52] CHEYNIER V, SOUQUET J M, ROUX E L, et al. Size separation of condensed tannins by normal-phase high-performance liquid chromatography [J]. Methods in Enzymology, 1999, 299:178-184.

[53] AJM J. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals [J]. Nutrition Research Reviews, 1993, 6(1): 209-236.

[54] MITARU B N, REICHERT R D, BLAIR R. Improvement of the nutritive value of high tannin sorghums for broiler chickens by high moisture storage (*Reconstitution*) [J]. Poultry Science, 1983, 62(10): 2065-2072.

[55] DAVIS A B, HOSENEY R C. Grain sorghum condensed tannins. I. Isolation, estimation, and selective adsorption by starch [J]. Cereal Chemistry, 1979, 56(4):310-314.

[56] DAVIS A B, HOSENEY R C. Grain sorghum condensed tannins. II. Preharvest changes [J]. Cereal Chemistry, 1979, 56(4):314-316.

[57] PRICE M L, SCOYOC S V, BUTLER L G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(5): 1214-1218.

(上接第 131 页)

[33] LV Y Y, LV A, ZHAI H C, et al. Insight into the global regulation of laeA in *Aspergillus flavus* based on proteomic profiling [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 284: 11-21.

[34] LV Y Y. Proteome-wide profiling of protein lysine acetylation in *Aspergillus flavus* [J]. PloS One, 2017, 12(6): e0178603.

[35] REN S L, YANG M K, YUE Y W, et al. Lysine succinylation contributes to aflatoxin production and pathogenicity in *Aspergillus flavus*[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2018, 17 (3): 457-471.

[36] NIE X Y, LI B W, WANG S H. Epigenetic and posttranslational modifications in regulating the biology of *Aspergillus* species [J]. Advances in Applied Microbiology, 2018, 105:191-226.