

# 利用 HPLC 法测定水稻子粒主要黄酮类化合物

杜娟<sup>1</sup>, 杨涛<sup>1</sup>, 曾亚文<sup>1</sup>, 普晓英<sup>1</sup>, 杨树明<sup>1</sup>, 陈晓艳<sup>1</sup>, 贾平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650223; <sup>2</sup>昆明田康科技有限公司, 昆明 650205)

**摘要:**通过建立水稻儿茶素、杨梅素、槲皮素和山奈酚含量的 HPLC 测定方法, 研究水稻黄酮类化合物含量及组成差异, 为高黄酮水稻种质资源的定向改良提供理论依据。本研究建立了利用 HPLC 法测定水稻黄酮类化合物含量的测定方法; 水稻糙米的黄酮化合物组成主要以儿茶素和山奈酚的形式存在, 不含杨梅素和槲皮素, 不同品种儿茶素和山奈酚组成比例及含量存在差异; 粳稻含有更丰富的儿茶素, 有色稻山奈酚和儿茶素含量大于无色稻; 糙米中含有较高的黄酮类化合物, 而精米中不含或少含黄酮类化合物。

**关键词:** HPLC 法; 黄酮类化合物; 水稻; 儿茶素; 山奈酚

## Determination of Flavonoid in Rice Grain by HPLC

DU Juan<sup>1</sup>, YANG Tao<sup>1</sup>, ZENG Ya-wen<sup>1</sup>, PU Xiao-ying<sup>1</sup>, YANG Shu-ming<sup>1</sup>, CHEN Xiao-yan<sup>1</sup>, JIA Ping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Biotechnology and Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223;

<sup>2</sup>Kunming Tiankang Technology Co., Ltd., Kunming 650205)

**Abstract:** Analysis of the difference in major flavonoid contents and compositions by high performance liquid chromatography (HPLC) method to determine catechin, myricetin, quercetin, and kaempferol was conducted in rice grain, aiming at providing the theoretic basis for directional improvement of high flavonoid germplasm resource. The HPLC method for determining flavonoid in rice grain was developed. The major flavonoid in brown rice was composed of catechin and kaempferol, but did not contain myricetin and quercetin. There was significant difference among the proportions and contents. The cultivars (or lines) of *japonica* rice had more catechin, while the colored rice had more myricetin and kaempferol than uncolored rice. Brown rice contained more flavonoid than milled rice, while milled rice contained little or no flavonoid.

**Key words:** HPLC method; Flavonoid; Rice; Catechin; Kaempferol

黄酮类化合物的生理活性主要有抗氧化、抗癌、抗炎、抗菌、抗病毒、抗心血管疾病作用, 降血糖、镇痛止泻、防治溃疡和帕金森病等治疗作用<sup>[1]</sup>, 明代《本草纲目》记载黑米能“补血益气、润心肺、和百药、久服轻身延年”, 中医认为红米能滋阴补肾、健脾开胃, 是延缓衰老的保健食品。现代研究表明, 有色稻米富含黄酮和花色苷等抗氧化类黄酮物质<sup>[2-3]</sup>, 目前有关黑米<sup>[3-8]</sup>、紫米<sup>[6,8]</sup>、红米<sup>[6]</sup>及褐米<sup>[9]</sup>提取物花色苷的成分鉴定及含量分析进展显

著; 有关有色米的医用价值也有许多研究<sup>[10-12]</sup>; 且定位出米色、总黄酮、抗氧化基因与 RM228、RM339 和 RM316 连锁<sup>[13]</sup>; 克隆出 *OsFNS* 基因能催化水稻叶黄烷酮合成黄酮反应<sup>[14]</sup>; 但黄酮测定方法仍旧以陈旧的分光光度法和总黄酮为主<sup>[2]</sup>, 有色稻米黄酮单体 (flavone) 化合物组成及含量水平目前还未见报道。张名位等<sup>[12]</sup>研究表明 74 份黑米品种资源总黄酮的质量分数介于 0.098% ~ 0.750%, 平均为 0.305%, 粳型黑米的含量极显著高于籼型黑米。赵

收稿日期: 2011-09-05 修回日期: 2012-06-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31060186); 重点新产品开发计划项目 (2010BB001); 云南省技术创新人才培养项目 (2011CI059)

作者简介: 杜娟, 副研究员, 硕士, 从事水稻种质资源研究工作。E-mail: coockoo1976@yahoo.com.cn

杨涛, 副研究员, 博士, 从事作物遗传育种工作, 并列第一作者, 对本文具有同等贡献

通讯作者: 曾亚文, 研究员, 博士, 从事作物遗传育种工作。E-mail: zengyw1967@126.com

则胜等<sup>[15]</sup>检测黑米乌贡 1 号和上农黑糯总黄酮含量分别为 0.677% 和 0.628%, 黑米皮中总黄酮含量更高, 达 1.53%。杜娟等<sup>[16]</sup>用分光光度法检测结果表明云南有色稻总黄酮极显著高于云南无色稻。高效液相色谱法不但能测定总黄酮含量, 而且能测定单个黄酮化合物的含量<sup>[17]</sup>。本文通过建立儿茶素、杨梅素、槲皮素、山奈酚含量的 HPLC 单体黄酮测定方法, 以黑褐色云南临沧疣粒野生稻和 12 个水稻品种以及自主培育的高总黄酮的贡米 1 号(红米)和贡米 2 号(黑米)为研究材料, 研究水稻单体黄酮化合物组成及含量, 并比较有色稻及无色稻、精米和糙米、籼稻和粳稻黄酮单体含量差异, 旨在开展水稻主要黄酮类化合物含量研究, 并为筛选优异水稻种源及稻米主要黄酮类化合物含量的生产质量控制提供科学依据。

1 材料与方法

供试材料为 1 个云南临沧疣粒野生稻和 14 个水稻品种(系), 其中 10 份来自中国, 2 份来自韩国, 1 份来自日本, 1 份来自国际稻作所, 用分光光度法测定其总黄酮含量<sup>[16]</sup>。所有材料于 2008 年 3 月 5 日播种于云南省农业科学院日光温室, 4 月 15 日移栽, 水肥常规管理, 8 月 20 日成熟期收获, 随机采集穗子中上部成熟饱满种子, 存放 3 个月后备用。用日本小型(SATAKE)出糙机加工成糙米, 并粉碎至 80~100 目, 60℃ 恒温干燥, 精密称取 1g 水稻子粒

粉末, 置于 50ml 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度线; 超声处理 30min; 过滤; 干燥; 用 1ml 双蒸水溶解; 1ml 乙酸乙酯萃取; 水相蒸干; 于 10ml 容量瓶用甲醇定容至刻度线, 摇匀; 用微孔滤膜(0.45μm)滤过, 取滤液作为供试品溶液。

2 结果与分析

2.1 HPLC 法测定水稻黄酮类化合物含量测定方法的建立

试验使用 ODS AM-303 色谱柱(YMC-Pack, 4.6mm×250mm, 5μm)。优化的色谱条件为流动相 A-0.1% 冰乙酸, B-乙腈; 梯度洗脱: 0~5min 10% A, 5~10min 20% A, 10~17min 40% A; 流速 0.8ml/min; 检测波长 280nm; 进样量 10μl。儿茶素、杨梅素、槲皮素和山奈酚的标准曲线回归方程及线性范围, 分别在 0.0625~2μg ( $R^2=0.9999$ )、0.034375~1.1μg ( $R^2=0.9998$ )、0.025~0.8μg ( $R^2=0.9993$ ) 和 0.0175~0.56μg ( $R^2=0.9995$ ) 成良好的线性关系, 准确性较好。由图 1 可知, 对照品及供试品的色谱图, 根据单个标准品的出峰时间, 确定每个标准品在混合标准品中的出峰时间。在上述色谱条件下, 儿茶素、杨梅素、槲皮素和山奈酚与其他峰的峰形较好。儿茶素、杨梅素、槲皮素和山奈酚的保留时间分别约为 6.40min、13.36min、14.26min 和 15.05min。

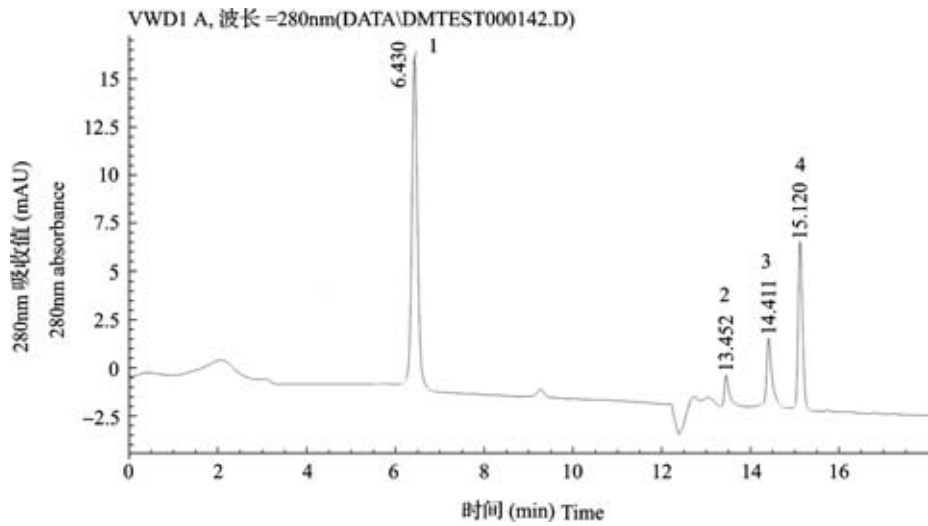


图 1 黄酮类化合物儿茶素、杨梅素、槲皮素、山奈酚的色谱分离图

Fig. 1 Chromatograms of catechin, myricetin, quercetin and kaempferol

1: 儿茶素, 2: 杨梅素, 3: 槲皮素, 4: 山奈酚  
1: catechin, 2: myricetin, 3: quercetin, 4: kaempferol

由图 2 可知,总黄酮含量和黄酮类化合物总量之间存在显著线性关系,相关系数均达到了显著水平,表明黑米的抗氧化作用与其中的黄酮和花色苷含量存在一定的相关性。

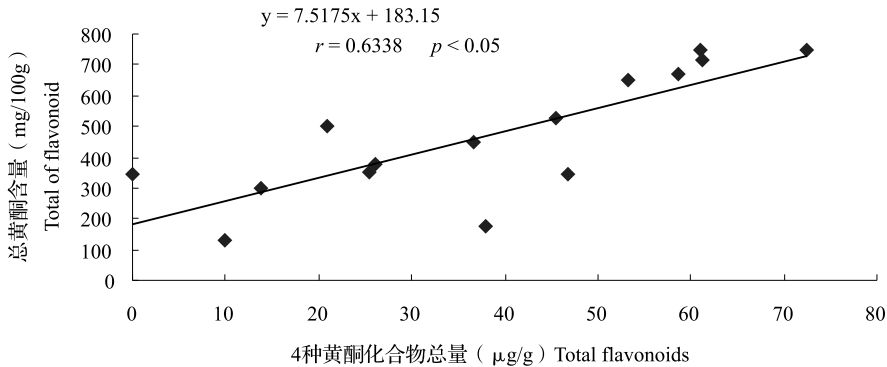


图 2 总黄酮含量和黄酮类化合物总量的关系  
Fig. 2 Correlation between total flavonoids and total flavonoid

2.2 糙米黄酮类化合物含量及组成分析

对 14 个水稻品种和疣粒野生稻糙米的黄酮类化合物含量分析结果表明,糙米中黄酮单体主要以儿茶素和山奈酚的形式存在,不同品种儿茶素和山奈酚组成比例及含量存在差异(表 1)。儿茶素的变异系数为 75.5%,变幅为 0~45.4%;山奈酚含量的

变异系数为 125.7%,变幅为 0~50.31%,变幅和变异系数均较大;有些品种只含有儿茶素,占 6.7%,如银光、合系 35、稻花香 2 号等;有的品种只含有山奈酚,占 46.7%,如地饵块谷;含儿茶素和山奈酚占 40.0%;IR36 不含儿茶素和山奈酚。表明不同品种儿茶素和山奈酚含量存在明显的基因型差异。

表 1 不同品种糙米黄酮类化合物含量及组成差异

Table 1 The difference of proportion and content among rice cultivars										(μg/g)
编号 No.	品种 Varities	来源 Origins	籼粳 Indica or japonica	果皮颜色 Peel color	儿茶素 Catechin	杨梅素 Myricetin	山奈酚 Kaempferol	槲皮素 Quercetin	4 种黄酮类化合物总量 Total of flavonoid	
1	疣粒野生稻	云南临沧	—	黑褐色	29.79	0	42.70	0	72.49	
2	饵块谷	云南澜沧	籼稻	黑褐色	10.70	0	50.31	0	61.01	
3	地饵块谷	云南澜沧	籼稻	白色	0	0	36.66	0	36.66	
4	IR36	菲律宾	籼稻	白色	0	0	0	0	0	
5	滇屯 502	云南	籼稻	白色	13.59	0	33.15	0	46.74	
6	明恢 86	浙江	籼稻	白色	17.06	0	3.90	0	20.96	
7	银光	云南	粳稻	白色	13.88	0	0	0	13.88	
8	云粳 20 号	云南	粳稻	白色	20.53	0	38.22	0	58.75	
9	合系 35	云南	粳稻	白色	9.83	0	0	0	9.83	
10	稻花香 2 号	黑龙江	粳稻	白色	37.88	0	0	0	37.88	
11	Sobaekbye	韩国	粳稻	白色	25.45	0	0	0	25.45	
12	Odeabyeo	韩国	粳稻	白色	26.03	0	0	0	26.03	
13	DU5	日本	粳稻	白色	45.40	0	0	0	45.40	
14	功米 1 号	云南	粳稻	红色	18.23	0	35.01	0	53.24	
15	功米 2 号	云南	粳稻	黑紫色	61.31	0	0	0	61.31	

进一步比较有色稻与无色稻,籼稻与粳稻等各类型间儿茶素和山奈酚含量的差异结果表明,3 个有色稻平均山奈酚含量 (28.44μg/g) > 无色稻 (10.18μg/g),差异达到极显著水平;有色稻平均儿

茶素含量 (30.08μg/g) > 疣粒野生稻 (29.79μg/g) > 无色稻 (19.06μg/g),且无色稻和有色稻差异达极显著水平。笔者之前的研究表明云南有色稻总黄酮含量高于无色稻,达极显著水平<sup>[16]</sup>,表明总黄酮和

山奈酚、儿茶素之间具有一定线性关系。籼稻平均山奈酚含量 ( $24.80\mu\text{g/g}$ ) > 粳稻 ( $8.14\mu\text{g/g}$ ), 经 t 测验表明, 差异达到极显著水平; 粳稻平均儿茶素含量 ( $28.73\mu\text{g/g}$ ) > 籼稻 ( $8.27\mu\text{g/g}$ ), 差异达到极其显著水平。与粳稻相比, 籼稻糙米中含有更丰富的山奈酚, 粳稻含有更丰富的儿茶素。

表 2 功米 1 号和功米 2 号精米和糙米黄酮含量差异

Table 2 Difference of flavonoids content between brown rice Gongmi 1 and 2 and milled rice		( $\mu\text{g/g}$ )				
品系		儿茶素	杨梅素	山奈酚	槲皮素	4 种黄酮类化合物总量
Lines		Catechin	Myricetin	Kaempferol	Quercetin	Total of flavonoid
功米 1 号	糙米	18.23	0	35.01	0	53.24
	精米	8.96	0	23.01	0	31.97
功米 2 号	糙米	61.31	0	0	0	61.31
	精米	0	0	0	0	0

### 3 讨论

#### 3.1 利用 HPLC 法测定黄酮类化合物较准确

采用高效液相色谱法, 分离检测水稻糙米中黄酮类化合物儿茶素、杨梅素、槲皮素、山奈酚, 其方法简便、快捷, 结果准确、重复性好。本试验建立了 HPLC 法同时测定儿茶素、杨梅素、槲皮素、山奈酚的含量的色谱条件, 各成分分离较好, 儿茶素、杨梅素、槲皮素、山奈酚分析时间约为 17min, 采用此方法整个提取和测定过程只需要 1h, 大大节约了提取测定时间。HPLC 法首次发现了单个黄酮化合物山奈酚的存在和含量, 分光光度法和 HPLC 法测定总黄酮含量和 4 种单体化合物的总量具有一定相关性, 平时筛选种源, 可以用分光光度法。另外, 有些品种在 13.0min 出现很大的峰面积, 说明这些品种含有未知的单体黄酮, 需要进行下一步研究, 以确定其成分。

#### 3.2 水稻子粒中黄酮类化合物差异及功能稻米品种选育

本研究表明, 不同品种儿茶素和山奈酚组成比例及含量存在明显的差异。籼稻糙米中含有更丰富的山奈酚, 粳稻含有丰富的儿茶素, 有色稻山奈酚和儿茶素含量大于无色稻, 这可能是品种类型间的遗传差异所决定, 因此可以通过育种手段改良水稻子粒中黄酮类化合物的组成和含量。紫黑米可以作为选育高黄酮类化合物含量水稻品种的优良亲本。另外, 糙米中含有较高的儿茶素和山奈酚, 而精米中不含或少含儿茶素和山奈酚, 说明活性物质大多存在于果皮和种皮, 即米糠中。在工业生产中提取开发

#### 2.3 精米和糙米黄酮类化合物含量差异比较

功米 1 号糙米儿茶素和山奈酚的含量分别为  $18.23\mu\text{g/g}$  和  $35.01\mu\text{g/g}$ , 大于其精米中二者的含量 ( $8.96\mu\text{g/g}$ 、 $23.01\mu\text{g/g}$ )。功米 2 号糙米儿茶素和山奈酚的含量分别为  $61.31\mu\text{g/g}$  和 0, 大于其精米。功米 2 号精米基本不含黄酮类化合物(表 2)。

黄酮类化合物(山奈酚和儿茶素)的产品可以有有色稻米糠为主要原料。

本研究首次发现水稻糙米中山奈酚的存在, 国内外尚无报道。山奈酚是一种有效的蛋白激酶 CK2 的抑制剂, 山奈酚对神经细胞有保护作用, 对 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 诱导的大鼠皮层细胞损伤有显著的保护作用, 可以抑制多类恶性肿瘤细胞的生长<sup>[18-19]</sup>。Nagao 等<sup>[20]</sup>的研究表明红米含有儿茶素、儿茶酸等黄酮类物质; 日本岐阜大学从褐米 (*Oryza sativa* L. koshihikari) 中分离到儿茶酸<sup>[21]</sup>。本研究在红米、紫黑米、白米中均发现了儿茶素的存在, 而紫黑米功米 2 号中含有的儿茶素最高。谷物中的花色素属花色苷类物质<sup>[22]</sup>, 部分研究均表明黑米的总抗氧化能力与其中的总黄酮和花色苷含量之间呈现极显著正相关关系<sup>[12-13, 23]</sup>; Finocchiaro 等<sup>[3]</sup>研究表明意大利黑米的多酚含量和抗氧化能力远大于红米和白米。本研究中紫黑米的儿茶素含量显著高于其他颜色糙米, 且发现各品种总黄酮含量和黄酮类化合物总和之间存在显著的相关性关系, 由此推测水稻子粒中黄酮类化合物(儿茶素)与花色苷类物质关系密切, 可能存在协同代谢作用。

### 4 结论

水稻糙米的黄酮化合物组成以儿茶素和山奈酚的形式存在, 不同品种儿茶素和山奈酚含量存在明显的基因型差异。红米、紫黑米、白米中均发现了儿茶素的存在, 籼稻糙米中含有更丰富的山奈酚, 粳稻含有丰富的儿茶素, 有色稻山奈酚和儿茶素含量大于无色稻。糙米中含有较高的儿茶素和山奈酚, 而



精米中不含或少含儿茶素和山奈酚,黄酮化合物大多存在于果皮和种皮。

## 参考文献

- [1] 张海容,武晓燕. 荧光探针法研究 10 种中药多糖及黄酮对 DNA 的保护作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(2): 346-349
- [2] Min B, McClung A M, Chen M H. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color [J]. J Food Sci, 2011, 76:117-126
- [3] Finocchiaro F, Ferrari B, Gianinetti A. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype [J]. J Cereal Sci, 2010, 51:28-34
- [4] 张名位,郭宝江,张瑞芬,等. 黑米抗氧化活性成分的分离纯化和结构鉴定[J]. 中国农业科学, 2006, 39(1): 153-160
- [5] Hu C, Zawistowski J, Ling W H, et al. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51:5271-5277
- [6] Morimitsu Y, Kubota K, Tashiro T, et al. Inhibitory effect of anthocyanins and colored rice on diabetic cataract formation in the rat lenses [J]. Int Congr Series, 2002, 1245:503-508
- [7] Chen P N, Kuo W H, Chui L C, et al. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression [J]. Chemico-Biol Interact, 2006, 163:218-229
- [8] Hyun J W, Chung H S. Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52:2213-2217
- [9] Yawadio R, Tanimori S, Morita N, et al. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities [J]. Food Chem, 2007, 101:1616-1625
- [10] Xia M, Hou M J, Zhou H L, et al. Anthocyanins induced cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages [J]. J Biol Chem, 2005, 280:36792-36801
- [11] Ling W H, Chen Q X, Ma J, et al. Red and black rice decrease atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status in rabbits [J]. J Nutr, 2001, 131:1421-1426
- [12] 张名位,郭宝江,池建伟,等. 不同品种黑米的抗氧化作用及其与总黄酮和花色苷含量的关系[J]. 中国农业科学, 2005, 38(7):1324-1331
- [13] Jin L, Xiao P, Lu Y, et al. Quantitative trait loci for brown rice color, phenolics, flavonoid contents, and antioxidant capacity in rice grain [J]. Cereal Chem, 2009, 86:609-614
- [14] Lee Y J, Kim B G, Chong Y, et al. Cation dependent O-methyltransferases from rice [J]. Planta, 2008, 227:641-647
- [15] 赵则胜,赖来展,郑金贵. 中国特种稻[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1995
- [16] 杜娟,杨涛,曾亚文,等. 分光光度法检测不同地区和类型稻种功能性成分的初步研究[J]. 云南大学学报, 2011, 33(2): 232-236
- [17] 邹耀洪,李桂荣. 反相高效液相色谱分析杨梅叶中抗氧化成分黄酮类化合物[J]. 分析化学, 1998, 26(5):531-534
- [18] 林小聪,刘新光,陈小文,等. 山奈酚抑制蛋白激酶 CK2 活性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(11):894-901
- [19] Wang C N, Chi C W, Lin Y L, et al. The neuron protective effects of phytoestrogens on amyloid beta protein induced toxicity are mediated by abrogating the activation of caspase cascade in rat cortical neurons [J]. J Biol Chem, 2001, 276:5287-5295
- [20] Nagao S, Takahashi M. Trial construction of twelve linkage groups in Japanese rice. Genetical studies on rice plant XXVII [J]. J Faculty Agric Hokkaido Univ, 1963, 53:72-130
- [21] Tian S, Nakamura K, Kayahara H, et al. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice and germinated brown rice [J]. J Agric Food, 2004, 52:4808-4817
- [22] Seok H N, Sun P C, Mi Y K, et al. Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars [J]. Food Chem, 2006, 94:613-620
- [23] Shao Y F, Jin L, Zhang G, et al. Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice [J]. Theor Appl Genet, 2011, 122:1005-1012

## 欢迎订阅 2013 年《中国水稻科学》、《水稻科学(英文版)》

《中国水稻科学》(ISSN 1001-7216, CN 33-1146/S)为中国水稻研究所主办的全国性学术期刊,主要报道以水稻为研究对象的未经发表的原始论文。所设栏目包括研究报告、研究简报、研究快报、研究简讯、实验技术、学术专论、文献综述等。读者对象为国内外从事水稻科研、教学、生产和管理的有关人员。同时,还办有姊妹刊《Rice Science》(水稻科学,英文版)(ISSN 1672-6308, CN 33-1317/S)。

为中文核心期刊、中国科学引文索引数据库核心期刊、中国科技核心期刊,也是国内外 20 余种数据库和检索期刊的文献源。

双月刊,大 16 开,112 页,每期定价 20.00 元(全年 120.00 元),邮发代号 32-94,国外代号 Q6533。读者可在各地邮政局订阅,也可向编辑部订阅。《水稻科学(英文版)》为季刊,大 16 开,80 页,每期定价 10.00 元(全年 40.00 元),自办发行,请读者直接向编辑部订阅。

地址:(310006)杭州市体育场路 359 号中国水稻研究所内

电话:0571-63370278(63371017)

E-mail: cjr@263.net; crm@fy.hz.zj.cn