

杨泽南,张庆路,李凯凯,等.液质联用法测定不同地域种植的“华墨香5号”黑米中花青苷和酚酸类化合物含量[J].华中农业大学学报,2022,41(5):266-272.DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.05.032

液质联用法测定不同地域种植的“华墨香5号” 黑米中花青苷和酚酸类化合物含量

杨泽南^{1,2},张庆路²,李凯凯¹,陈浩²

1. 华中农业大学环境食品学教育部重点实验室,武汉 430070;
2. 华中农业大学作物遗传改良全国重点实验室,武汉 430070

摘要 为研究不同种植地域对“华墨香5号”黑米中花青苷和酚酸类化合物含量的影响,在武汉、西安、陵水、宁波等14个地区种植了该黑米品种,通过高压液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)测定不同种植地域来源的“华墨香5号”样品中靶向代谢物,以外标法进行定量分析。结果显示,不同地域种植的“华墨香5号”黑米中花青苷和酚酸类化合物含量存在显著性差异,其中来自西安地区样品检出量最高,含矢车菊素-3-O-葡萄糖苷2.855 mg/g、芍药色素-3-O-葡萄糖苷0.491 mg/g、原儿茶酸0.088 mg/g;黄石地区样品检出量最低,分别为0.865、0.162、0.048 mg/g。表明黑米中花青苷和酚酸类化合物积累显著受到种植环境影响,为生产高营养价值黑米,需针对特定品种筛选合适的种植地域。

关键词 “华墨香5号”黑米;花青苷;酚酸类化合物;地域差异;种植环境

中图分类号 S511; TS201.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)05-0266-07

随着生活水平的提升,人们对于主粮健康的作用愈加关注。黑米是一种重要的有色稻米,“黑米主食化”不仅会大大提高人类的营养健康水平,还将减轻对粮食需求的压力,保障粮食安全;同时还能有效减轻粮食生产对资源和环境的不良影响,促进农业绿色发展^[1]。近些年,我国科学家逐步培育出多种口感食味俱佳的黑米品种。黑米籽粒的成熟过程中,花青苷在果皮大量积累,故呈现紫黑色。黑米中最主要的花青苷是矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药色素-3-O-葡萄糖苷。果蝇喂饲试验证明,黑米具有延长寿命的功效^[2]。除了肉眼看得见的“健康”成分外,黑米还有许多看不见的“健康”成分,如酚酸类化合物,其和花青苷一样都具有显著的健康效益^[3-4]。在黑米中含量最高的酚酸类化合物是原儿茶酸(proto-catechuic acid),具有抗氧化、抗菌、抗糖尿病、抗癌、抗炎等多种生理功能^[5-7]。因此,酚酸类化合物含量的高低也是影响黑米健康效应的重要因素。

现已有较多对黑米的农艺性状、食味品质、营养物质的研究报道^[8-9]。通常特定黑米品种仅在2~3

邻近地理位置种植,而难以在不同地域广泛种植,因此,对于特定黑米品种在不同地理环境下的营养物质的定量比较分析较少见。“华墨香5号”是华中农业大学自主选育的黑米新品系,其稻米食味感官评价优良,直接蒸煮的黑米饭香润、软、弹、滑、甜,具有特殊香气。本研究在国内不同地域种植黑米品种“华墨香5号”,对不同地域“华墨香5号”的花青苷含量和酚酸类化合物进行比较,探究地域差异对“华墨香5号”花青苷和酚酸含量的影响,以期为其适宜的产业化种植提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试品种为黑米品种“华墨香5号”。试验于2021年夏季在湖北省武汉市(华中农业大学)、潜江市、襄阳市南漳县、襄阳市高新区、荆门市东宝区、石首市高基庙镇、监利市红城乡、咸宁市赤壁市、黄冈市罗田县、黄石市阳新县,浙江省宁波市慈溪市,陕西省西安市、汉中市,海南省陵水县14个地区进行大

收稿日期:2022-05-11

基金项目:华中农业大学环境食品学教育部重点实验室专项(2662021SPPY002)

杨泽南,E-mail: yzn@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:陈浩,E-mail: hchen@mail.hzau.edu.cn

田种植,开花30 d后取成熟穗,保存于-20℃。

1.2 样品前处理方法

1)黑米粉的制备。将黑米穗脱粒后置于冷冻干燥机中充分冻干,砻谷机去壳后得到黑糙米,取10 g黑糙米置于全自动组织研磨仪中研磨(60 Hz, 2 min),将得到的黑糙米米粉过孔径0.425 mm筛,密封后放于-20℃备用。

2)游离酚酸和花青苷的提取。参照文献[10-11]进行,略有改动。称取50 mg左右米粉样品于离心管A中,加入1 mL纯100%甲醇超声抽提30 min,以8 000 r/min离心后吸取上清液置于2 mL离心管B,再次加入1 mL 70%甲醇(pH=1)于离心管A,重复上述抽提步骤1次,上清液于离心管B中合并,再用OASIS HLB SPE小柱与真空萃取装置中对样品进行净化,将净化后的样品置于棕色进样瓶中,放于-80℃保存备用。汲取每份黑米待测物20 μL,混合后作为质控样品;以抽提液为空白对照。

1.3 仪器设备与试剂

1)仪器设备。高压液相色谱串联质谱仪(HPLC, Shim-pack UFLC SHIMADZU CBM20A system; MS, AB SCIEX Triple Quad 5500)、UVF超声波清洗机(小美超声仪器昆山有限公司)、全自动组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司)、真空萃取装置(Sigma-Aldrich上海贸易有限公司)。

2)试剂。乙腈、乙酸(色谱纯, Sigma-Aldrich)。OASIS HLB SPE小柱(沃特世科技上海有限公司)。香草酸、原儿茶酸、龙胆酸、阿魏酸、异阿魏酸、对香豆酸、丁香酸、咖啡酸、间苯三酚、芥子酸、水杨酸、绿原酸、没食子酸、对羟基苯乙酸、2,4-二羟基苯甲酸、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G)和芍药素-3-O-葡萄糖苷(P3G)标准品(TRC,艾美捷科技有限公司)。

1.4 LC-MS/MS测定靶向代谢物

色谱柱为Shim-pack GIST 3.0 μm C18-AQ 2.1 mm×250 mm(HSS),使用VP-ODS C18 2.1 mm×150 mm和Poroshell 120 EC-C18 2.1 mm×150 mm进行对比。

色谱条件设定。流速0.25 mL/min,柱温40℃。流动相A为水(0.25%乙酸),流动相B为乙腈(0.25%乙酸)。洗脱程序如表1所示。质谱元件参数如下:正离子模式离子喷雾电压为5 500 V,负离子

模式离子喷雾电压为-4 500 V。气帘气为0.24 MPa,雾化气为0.38 MPa,干燥气为0.41 MPa。源温度为550℃。质谱运行模式:多反应监测模式(multi-reaction monitoring, MRM)。使用Analyst 1.6.2软件处理数据。

表1 流动相梯度

Table 1 The gradient of mobile phase

时间/min Time	流动相 A/% Mobile phase A	流动相 B/% Mobile phase B
0	95	5
2	95	5
24	0	100
27	0	100
30	95	5

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱分析方法的优化

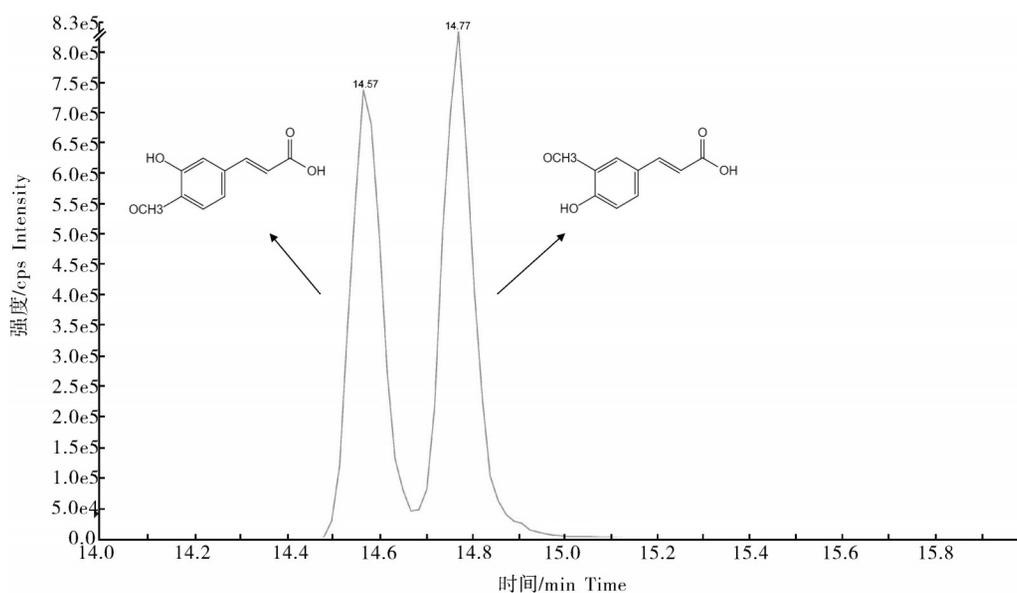
由于几种重要的酚酸类化合物存在同分异构体,对色谱分离有更高的要求。酚酸类化合物的色谱流动相通常为甲醇-水和乙腈-水。本研究测试了不同的流动相体系和添加剂,发现添加有0.04%乙酸的乙腈-水体系分离效果良好。对Poroshell 120 EC-C18、GIST C18-AQ和VP-ODS C18色谱柱进行比较,发现使用GIST C18-AQ色谱柱酚酸类化合物的分离效果和峰型更好。本研究在色谱柱选用相同填料的基础上使用250 mm的长柱,发现长柱分析时间加长但分离效果更佳(图1),阿魏酸与异阿魏酸得到了较好的分离。

2.2 质谱方法的优化

通过液质联用技术中的多反映监测模式,在正/负离子模式下利用标准品逐个对2种花青苷和15种酚酸化合物进行扫描,确定Q1和Q3,并优化各项电离参数(表2),最终建立MRM检测方法。

2.3 花青苷和酚酸类代谢物提取条件的优化

为比较不同地域黑米花青苷和酚酸类代谢物的差异,采用酸水解法提取了可溶性糖苷型代谢物。由于没有使用碱水解法,淀粉以沉淀形式存在,未发生糊化,非常适合使用固相萃取小柱进行纯化。固相萃取法(HLB)纯化后的样品基质中的杂质大幅度减少,有利于提高样品的信号强度。另外,黑米样品所富含的矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷也会受到抽提过程的影响,其C6-C3-C6结构部分发生断裂生成酚酸类化合物,本研究选择在pH=1的酸水解条件下提取30 min。



阿魏酸保留时间为 14.77 min, 异阿魏酸保留时间为 14.57 min。The retention time of ferulic acid and isoferulic acid was at 14.77 min and at 14.57 min, respectively.

图1 在 193.10>178.00 离子对的色谱图

Fig.1 XIC in 193.10>178.00 ion pair

表2 靶向代谢物 MRM 参数

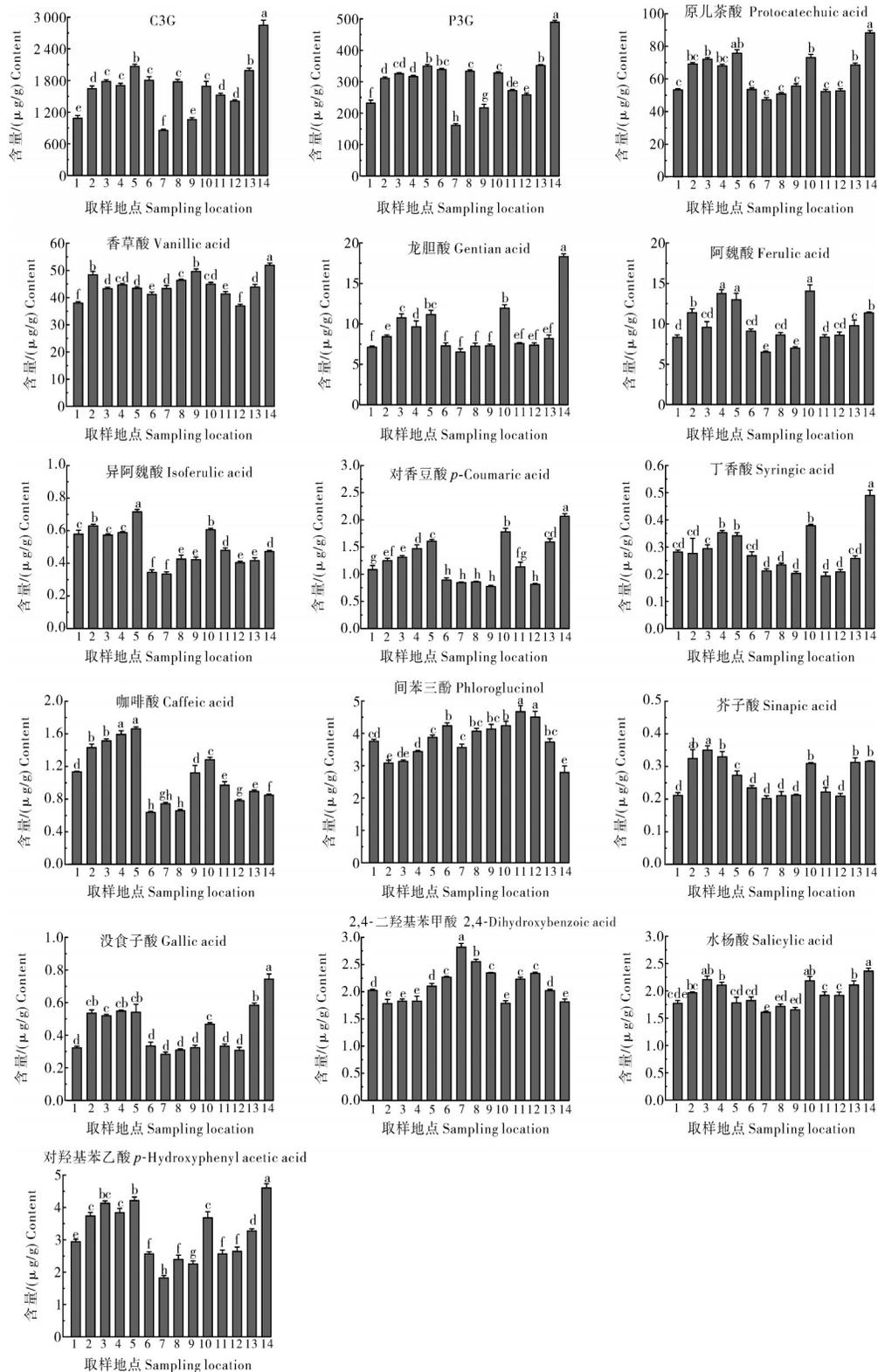
Table 2 MRM parameters for target compounds

靶向代谢物 Targeted metabolite	电离方式 Ionization mode	去簇电压/V Debunching voltage	入口电压/V Entrance voltage	碰撞电压/V Collision voltage	母离子 Q1 Parent ion Q1	子离子 Q3 Daughter ion Q3
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 Cyanidin 3-O-glucoside	ESI+	100	10	47	449.3	287.3
芍药素-3-O-葡萄糖苷 Peonidin 3-O-glucoside	ESI+	70	10	15	463.3	301.2
香草酸 Vanillic acid	ESI-	-100	-6	-15	167.1	123.1
原儿茶酸 Protocatechuic	ESI-	-140	-6	-17	153.0	109.0
龙胆酸 Gentisic acid acid	ESI-	-70	-10	-25	153.1	108.1
阿魏酸 Ferulic acid	ESI-	-100	-7	-21	193.1	134.1
异阿魏酸 Isoferulic acid	ESI-	-110	-8	-20	193.1	133.8
对香豆酸 <i>p</i> -Coumaric acid	ESI-	-100	-10	-19	163.2	119.2
丁香酸 Syringic acid	ESI-	-100	-10	-16	197.1	153.1
咖啡酸 Caffeic acid	ESI-	-110	-10	-20	179.1	135.1
芥子酸 Sinapic acid	ESI-	-100	-6	-10	223.0	121.1
没食子酸 Gallic acid	ESI-	-70	-7	-18	169.0	125.0
绿原酸 Chlorogenic acid	ESI-	-100	-10	-22	353.2	191.2
水杨酸 Salicylic acid	ESI-	-80	-8	-24	137.1	93.1
2,4-二羟基苯甲酸 2,4-Dihydroxybenzoic acid	ESI-	-90	-6	-23	153.0	107.0
对羟基苯乙酸 4-Hydroxyphenyl acetic acid	ESI-	-60	-8	-22	151.1	107.1

2.4 不同种植地域黑米中花青苷和酚酸类化合物含量比较

使用 Analyst 1.6.2 对质谱数据进行分析, 使用

GraphPad Prism 8 软件进行作图和统计分析, 获得了矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、芍药素-3-O-葡萄糖苷和 14 种酚酸类化合物的定量结果(图 2), 其中, 绿原酸



采用 One-way ANOVA 分析进行多重比较,柱状图中标注不同字母的组存在显著性差异 ($P < 0.05$)。1: 武汉 Wuhan; 2: 陵水 Lingshui; 3: 襄阳南漳 Nanzhang, Xiangyang; 4: 襄阳市高新区 High-Tech Zone of Xiangyang City; 5: 荆门 Jingmen; 6: 咸宁 Xianning; 7: 黄石 Huangshi; 8: 潜江 Qianjiang; 9: 黄冈 Huanggang; 10: 宁波 Ningbo; 11: 监利 Jianli; 12: 石首 Shishou; 13: 荆州 Jingzhou; 14: 西安 Xi'an; Mean values followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$) as determined by One-way ANOVA multiple comparisons.

图2 不同种植地域黑米中花青苷和酚酸类化合物含量

Fig.2 The content of anthocyanins and phenolic acids in different locations

含量较低未能检出。含量从高到低的前6种次生代谢物为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷>芍药素-3-O-葡萄糖苷>原儿茶酸>香草酸>龙胆酸>阿魏酸。在不同地域种植的黑糙米中C3G含量为865.2~2 855.7 $\mu\text{g/g}$, P3G为218.6~490.7 $\mu\text{g/g}$, 原儿茶酸为47.5~88.4 $\mu\text{g/g}$, 香草酸为37.1~52.0 $\mu\text{g/g}$, 龙胆酸为6.6~18.4 $\mu\text{g/g}$, 阿魏酸为6.5~14.1 $\mu\text{g/g}$, 异阿魏酸为0.3~0.6 $\mu\text{g/g}$, 对香豆酸为0.8~2.1 $\mu\text{g/g}$, 丁香酸为0.2~0.5 $\mu\text{g/g}$, 咖啡酸为0.6~1.7 $\mu\text{g/g}$, 间苯三酚为2.8~4.7 $\mu\text{g/g}$, 芥子酸为0.2~0.4 $\mu\text{g/g}$, 没食子酸为0.3~0.7 $\mu\text{g/g}$, 2,4-二羟基苯甲酸为1.8~2.8 $\mu\text{g/g}$, 水杨酸为1.6~2.4 $\mu\text{g/g}$, 对羟基苯乙酸为1.8~4.6 $\mu\text{g/g}$ 。其中西安地区样品含C3G 2.855 mg/g, P3G 0.491 mg/g, 原儿茶酸0.088 mg/g, 在所有样品中是最高的;而黄石地区样品检出量最低,含C3G 0.865 mg/g, P3G 0.162 mg/g, 原儿茶酸0.048 mg/g。

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和部分酚酸的相关性分

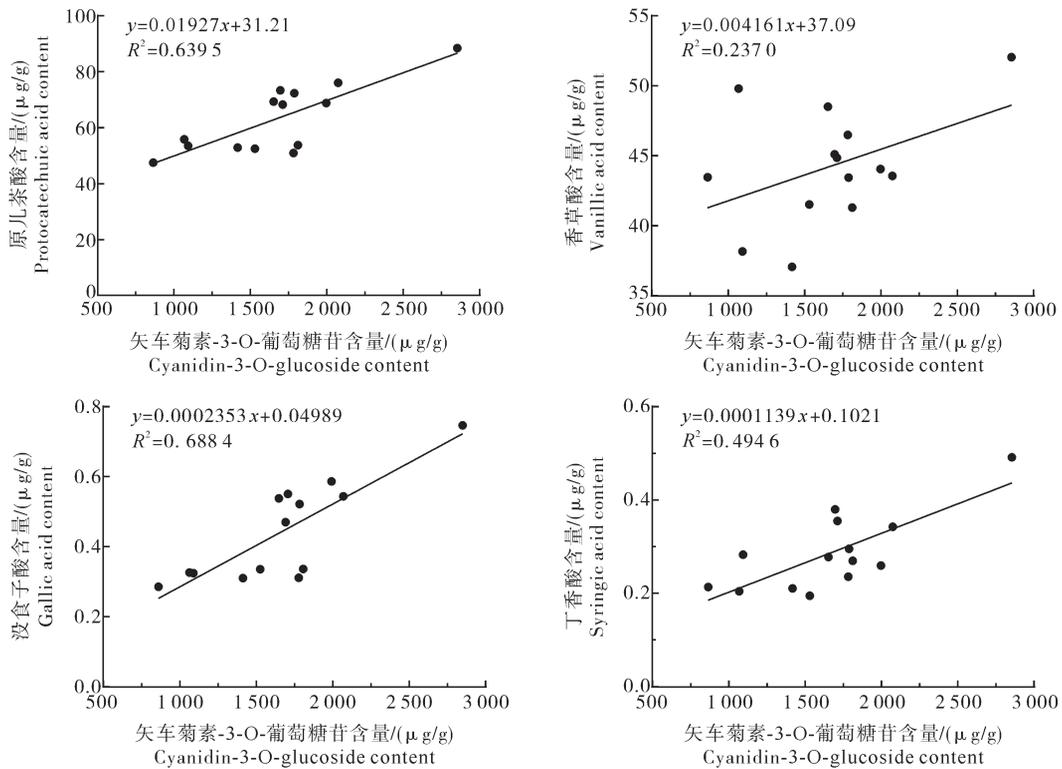


图3 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和部分酚酸的相关性分析

Fig. 3 Correlation of cyanidin-3-O-glucoside and phenolic acids

3 讨论

黑米中花青苷含量丰富,作为水稻重要的次生代谢产物,其在应对环境胁迫方面起到重要作用,如紫外、低温、干旱等都能诱导花青苷的合成。水稻花

青苷的合成机制目前已基本被解析,普遍认为花青苷的合成受到MYB类转录因子或MYB-bHLH-WD40转录因子复合体调控^[12]。因此,花青苷的积累受到多种生物和非生物因素的影响。在本研究

析结果显示,C3G与原儿茶酸相关性较高,回归方程 R^2 为0.6395(图3)。这也间接证明C3G在黑米中发生分解,得到较多酚酸类化合物(原儿茶酸是其降解产物之一)。因此,在鉴别黑米营养品质时,把同样具备丰富生物活性的原儿茶酸纳入考查因素具有一定意义,可综合两者含量来进行黑米品质评价。

在不同地域种植的“华墨香5号”黑米中所含的一些花青苷和酚酸类化合物差异较大,如西安种植的黑米中C3G、P3G、香草酸、原儿茶酸含量均最高。在襄阳市南漳县、高新区种植的黑米样品中无显著性差异,但是在荆州、监利、石首种植的3份样品间C3G存在显著性差异,含量变化较大。西安、武汉和陵水3地的花青苷和酚酸类化合物都存在显著性差异,但差异程度与纬度不相关。在西安和襄阳等海拔较高的地区,花青苷和酚酸类化合物相对较高。

中,西安地区种植的黑米中C3G等含量最高,我们推测这是高纬度带来的低平均气温造成的;而黄石地区样品C3G等含量最低的原因则可能是土地肥力因素或田间管理等导致。

黑米中各种酚酸类化合物的生物合成途径较为相似,都来自莽草酸、苯丙素和类黄酮合成途径。这些酚类物质在结构上被分为两大类,一类具有羟基苯甲酸骨架,包括原儿茶酸、龙胆酸、没食子酸、香草酸和丁香酸等;另一类具有羟基肉桂酸骨架,包括咖啡酸、芥子酸、对香豆酸、阿魏酸等^[13]。本研究通过对不同地域种植的黑米酚酸类化合物含量进行对比分析,发现在西安种植的黑米样品中羟基苯甲酸类酚酸的含量最高,但羟基肉桂酸类酚酸含量并不是最高的。结合对羟基苯甲酸和羟基肉桂酸类酚酸的合成通路在花青苷断裂模式分析发现,羟基苯甲酸的含量与花青苷含量相关。而羟基肉桂酸类酚酸则与木质素合成通路等重叠较多,其含量受到多种通路的影响,积累规律也较为复杂。此外,黑米成熟后具有C6-C3-C6结构的花青苷会自发缓慢降解,生成具有C6-C1或C6-C3骨架的化合物,这种现象也使得酚酸类化合物被间接积累^[14]。因此,在生产高营养价值黑米时,需针对特定品种选择合适的种植地域。

由于不同黑米品种间不可溶酚酸类差异较大,并且不可溶酚酸类多以衍生物形式存在,积累规律复杂,可能受到多种通路影响,因此,本研究对不可溶性酚酸类未做提取和分析,使操作方法更加便捷,不需要多次水解,极大地保护了提取出来的代谢物,防止其在提取过程中发生降解和氧化。前人研究发现,羟基肉桂酸类酚酸在酸水解条件下并不稳定,如阿魏酸、咖啡酸、对香豆酸等会发生降解^[15];本研究关注的是黑米中容易释放、易被人体吸收的游离态和可溶性糖苷型化合物^[16],这部分化合物在人体内利用率高,对营养健康贡献更大。这种研究策略的优点是可快捷、直观地比较不同地域的酚酸类化合物差异,缺点是忽略了潜在的酚酸类衍生物差异。其中,本研究未能检测到绿原酸,这可能与绿原酸的性质和含量有关。绿原酸是咖啡酸和奎宁酸的衍生物,在结构上存在热不稳定性,电离时容易发生源内裂解;此外,绿原酸的含量极低,且化学性质不稳定,易水解成咖啡酸和奎宁酸,这也可能是未被检测到的原因^[17]。

参考文献 References

- [1] 张启发. 保障粮食安全,促进营养健康:黑米主食化未来可期[J]. 华中农业大学学报,2021,40(3):1-2. ZHANG Q F. Ensuring food security and promoting nutrition and health: the staple food of black rice can be expected in the future[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(3): 1-2(in Chinese with English abstract).
- [2] ZUO Y, PENG C, LIANG Y, et al. Black rice extract extends the lifespan of fruit fly[J]. Food Funct, 2012, 3: 1271-1279.
- [3] CROZIER A, JAGANATH I, CLIFFORD M. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health[J/OL]. Nat Prod Rep, 2009, 26: 1001 [2022-05-11]. <https://doi.org/10.1039/B802662A>.
- [4] PANG Y, AHMED S, XU Y, et al. Bound phenolic compounds and antioxidant properties of whole grain and bran of white, red and black rice[J]. Food Chem, 2018, 240: 212-221.
- [5] SCAZZOCCHIO B, VARI R, FILESI C, et al. Cyanidin-3-O-beta-glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPAR gamma activity in human omental adipocytes[J]. Diabetes, 2011, 60: 2234-2244.
- [6] TANAKA T, TANAKA T, TANAKA M. Potential cancer chemopreventive activity of protocatechuic acid[J]. J Exp Med, 2011, 3: 27-33.
- [7] ZERAIK M, PETRONIO M, COELHO D, et al. Improvement of pro-oxidant capacity of protocatechuic acid by esterification[J/OL]. PLoS One, 2014, 9: e110277 [2022-05-11]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110277>.
- [8] HEUBERGER A, LEWIS M, CHEN M, et al. Metabolomic and functional genomic analyses reveal varietal differences in bioactive compounds of cooked rice[J/OL]. PLoS One, 2010, 5: e12915 [2022-05-11]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012915>.
- [9] OIKAWA T, MAEDA H, OGUCHI T, et al. The birth of a black rice gene and its local spread by introgression[J]. Plant cell, 2015, 27: 2401-2414.
- [10] CHEN W, GAO Y, XIE W, et al. Genome-wide association analyses provide genetic and biochemical insights into natural variation in rice metabolism[J]. Nat Genet, 2014, 46: 714-721.
- [11] PEDRO A, GRANATO D, ROSSO N. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability[J]. Food Chem, 2016, 191: 12-20.
- [12] ZHENG J, WU H, ZHU H, et al. Determining factors, regulation system, and domestication of anthocyanin biosynthesis in rice leaves[J]. New Phytol, 2019, 223: 705-721.
- [13] ZHANG L, LI Y, LIANG Y, et al. Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China[J]. Food Chem, 2019, 276: 538-546.
- [14] ROBBINS R J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(10): 2866-2887.

- [15] AYAZ F, HAYIRLIOGLU-AYAZ S, GRUZ J, et al. Separation, characterization, and quantitation of phenolic acids in a little-known blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) fruit by HPLC-MS[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 8116-8122.
- [16] MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, et al. Polyphenols: food sources and bioavailability [J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79: 727-747.
- [17] AZUMA K, IPPOUSHI K, NAKAYAM M, et al. Adsorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 5496-5500.

Determining contents of anthocyanin and phenolic acid compounds in black rice variety ‘Huamoxiang 5’ grown in different locations with HPLC-MS

YANG Zenan^{1,2}, ZHANG Qinglu², LI Kaikai¹, CHEN Hao²

1. *Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract ‘Huamoxiang 5’ is an excellent black rice variety developed by Huazhong Agricultural University. We planted ‘Huamoxiang 5’ in 14 locations including Wuhan, Xi’an, Lingshui, and Ningbo etc to study the effects of planting locations on the contents of anthocyanins and phenolic acid compounds. The rice flour samples of ‘Huamoxiang 5’ were extracted and analyzed by High Pressure Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS), and the data were quantitatively determined with the external standard method. The results showed that the contents of anthocyanins and phenolic acid compounds in ‘Huamoxiang 5’ varied significantly among samples collected from different planting locations. Among them, the contents of anthocyanins and phenolic acid compounds in the sample planted in Xi’an was the highest, with the content of cyanidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside and protocatechuic acid up to 2.855 mg/g, 0.491 mg/g and 0.088 mg/g, respectively. The contents of anthocyanins and phenolic acid compounds in the sample in Huangshi was the lowest, with the content of cyanidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside and protocatechuic acid of 0.865 mg/g, 0.162 mg/g, and 0.048 mg/g, respectively. It is indicated that the contents of anthocyanins and phenolic acid compounds in black rice are significantly affected by the planting environment. Thus, selecting suitable planting locations for specific black rice varieties is important to produce the black rice with high nutritional value.

Keywords black rice variety ‘Huamoxiang 5’; anthocyanins; phenolic acid compounds; regional difference; plant environment

(责任编辑:张志钰)