

doi:10.3969/j.issn.1673-9833.2015.05.020

3种显色反应对稻米籽粒中原花色素含量的检测分析

刘丽莉^{1, 2}, 白宁宁¹, 谢 婧¹, 严明理^{1, 2}

(1. 湖南科技大学 生命科学学院, 湖南 湘潭 411201;

2. 湖南科技大学 重金属污染土壤生态修复与安全利用湖南省高校重点实验室, 湖南 湘潭 411201)

摘 要: 利用二甲基乙酰胺二甲基缩醛 (DMACA) 染色法、铁铵矾染色法和香草醛染色法, 测定了不同品种稻米籽粒中原花色素的含量。用 DMACA 染色法测得谭农 s/制 21、R288、凡-14、12 庚 351、秦稻 2 号籽粒中原花色素的质量分数依次为 0.136, 0.183, 0.085, 4.115, 24.736 mg/g; 用铁铵矾染色法测得的质量分数依次为 0.292, 0.094, 1.940×10^{-4} , 1.220, 8.080 mg/g; 用香草醛染色法测得的质量分数依次为 1.349, 1.363, 1.093, 3.733, 15.153 mg/g。检测结果表明: 5 种稻米品种中, 秦稻 2 号的原花色素含量最高, 是 12 庚 351 的 4.1~6.6 倍, 凡-14 中的含量最低; 黑米品种 (秦稻 2 号和 12 庚 351) 比白米品种 (R288、谭农 s/制 21 和 凡-14) 中原花色素的含量明显要高。吸光度相对标准偏差 (RSD) 值表明, 3 种染色法测定原花色素含量的精密度由高到低依次为: 香草醛染色法、DMACA 染色法、铁铵矾染色法。

关键词: 稻米; 原花色素; 显色反应; DMACA 染色法; 铁铵矾染色法; 香草醛染色法

中图分类号: Q819

文献标志码: A

文章编号: 1673-9833(2015)05-0096-06

Determination and Analysis of the Proanthocyanidins Content in Rice Grain Based on Three Color Reaction

Liu Lili^{1,2}, Bai Ningning¹, Xie Jing¹, Yan Mingli^{1,2}

(1. School of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan Hunan 411201, China; 2. Key Laboratory of Ecological Remediation and Safe Utilization of Heavy Metal-Polluted Soils of Hunan Province Universities, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan Hunan 411201, China)

Abstract : The proanthocyanidins content was determined in rice grain of different colors using dimethylamino-cinnamaldehyde (DMACA) staining, Ferric ammonium alum staining and Vanillin staining. Experimental studies showed that the proanthocyanidins mass fraction of five rice breeds (Tannong s/zhi21, R288, Fan-14, 12Geng351 and Qingdao2) detected by DMACA staining was successively as follows, 0.136, 0.183, 0.085, 4.115 and 24.736 mg/g (dry weight); the result detected by Ferric ammonium alum staining was 0.292, 0.094, 1.940×10^{-4} , 1.220 and 8.080 mg/g; and the result detected by Vanillin-HCl staining was 1.349, 1.363, 1.093, 3.733 and 15.153 mg/g. The proanthocyanidins content of Qingdao2 was the highest, which was about 4.1 to 6.6 times of 12Geng351, and Fan-14 was the lowest in five rice breeds; the proanthocyanidins content of black rice breeds (Qingdao2 and 12Geng351) was higher than that of white rice breeds (Tannong s/zhi21, R288, Fan-14). The relative standard deviation (RSD) of the absorbency showed that the precision level of determining proanthocyanidins content as follow, the first was vanillin staining, the second was DMACA staining and the third was ferric ammonium alum staining.

Keywords : rice; proanthocyanidins; color reaction; DMACA staining; ferric ammonium alum staining; vanillin staining

收稿日期: 2015-08-21

基金项目: 湖南省普通高等学校教学改革基金资助项目 (湘教通[2012]401号), 湖南省教育厅科学研究基金资助项目 (12C0129)

作者简介: 刘丽莉 (1980-), 女, 湖南邵东人, 湖南科技大学讲师, 博士, 主要从事生物学的教学和研究工作,

E-mail: liulili276@126.com

0 引言

原花色素 (proanthocyanidins, PCs) 是一类广泛存在于各种植物中的具有特殊分子结构的生物类黄酮, 由不同数量的儿茶素 (catechin) 或表儿茶素 (epicatechin) 结合而成^[1]。最简单的原花色素是儿茶素和表儿茶素单体两者形成的二聚体, 此外还有三聚体、四聚体等至十聚体。这类物质共同的特点是在酸性介质中加热均可产生花色素, 故被称为原花色素^[2]。原花色素是迄今发现的植物源最高效的抗氧化剂之一, 能有效清除活性氧自由基, 并抑制脂质过氧化。研究表明, 原花色素的抗氧化能力是维生素 E 的 5 倍, 维生素 C 的 2 倍, 并在机体内迅速吸收完全^[3-4]。原花色素在许多植物花和果实的色素形成过程中发挥重要作用^[5-7]。目前对于植物原花色素的测定方法较多, 如可见分光光度法、高效液相色谱法、液-质谱联用法、化学发光法等^[8-9]。植物组织前处理的方法对于样本测定分析十分重要, 原花色素是天然的植物多酚类化合物, 因成分复杂, 不同植物组织其前处理方法也存在差异。正丁醇-盐酸法^[10]对测定的选择性较高, 多受多酚结构的影响; 铁盐催化染色法^[11]对测定原花色素的显色反应特征明显, 操作简便, 但重现性较差; 香草醛法^[12]对多酚缩合单宁的选择性不太理想, 可是对葡萄籽、梗中原花色素的显色反应灵敏度高, 效果较稳定^[13]。

目前, 国内外有关原花色素的研究对象大多集中于葡萄籽、海岸松、山楂、小麦和油菜籽中, 而稻米中原花色素的检测研究则较少报道。本文利用二甲基乙酰胺二甲基缩醛 (DMACA) 染色法、铁铵矾 ($H_4FeNO_8S \cdot 12H_2O$) 染色法、香草醛染色法 3 种显色反应研究不同颜色的稻米籽粒中原花色素测定的前处理方法, 使稻米中原花色素与染色剂反应显色, 通过紫外-可见分光光度法测定其原花色素的吸光值, 并比较分析以白、黑米为代表的稻米籽粒中原花色素的相对含量, 以期为高原花色素含量的水稻品种选育和稻种资源开发提供参考。

1 试验部分

1.1 试验样品、试剂和仪器

1) 试验样品: 谭农 s/制 21、R288、凡-14、12 庚 351 和秦稻 2 号 5 个水稻品种, 均为去壳的稻米籽粒, 研磨成粉末, 干燥通风保存。

2) 试验试剂: 原花色素标准品, 南京替斯艾么中药研究所; 二甲基乙酰胺二甲基缩醛、香草醛, 德国 Sigma 公司; 铁铵矾 ($H_4FeNO_8S \cdot 12H_2O$), 长沙市

迈科为生物科技有限公司; 正丁醇 (BuOH)、盐酸, 均为分析纯, 湖南汇虹试剂有限公司; 无水乙醇, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司。

3) 试验仪器: UV756CRT 紫外-可见分光光度计, 上海佑科仪器仪表有限公司; AU7220 型电子分析天平, 日本岛津公司; 5417R 型台式高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; SC-15C 型数控超级恒温槽, 宁波天恒仪器厂; BCD-254 型冷藏冷冻冰箱, 博西华兼用电器有限公司; 制冰机, 瑞安市康德嘉利机械设备制造厂; DSC-W310 型数码相机, 索尼有限公司。

1.2 显色剂配制

1) DMACA 染色试剂: 25 mL 浓度为 12 mol/L 的 HCl 与 25 mL 蒸馏水混溶后, 加入 0.1 g DMACA 溶解, 再加入 50 mL 95% 的乙醇完全溶解, 置于 4 °C 保存。

2) 铁铵矾染色试剂: 2.5 mL 浓度为 12 mol/L 的 HCl 与 12.5 mL 蒸馏水混溶后, 加入 0.3 g 铁铵矾溶解, 置于 4 °C 保存;

3) 正丁醇-盐酸试剂: 95 mL 正丁醇与 5 mL 浓度为 12 mol/L 的 HCl 混合即可, 4 °C 保存。

4) 香草醛染色试剂: 50 mL 无水乙醇与 50 mL 浓度为 12 mol/L 的 HCl 混合后, 加入 0.3 g 香草醛完全溶解后, 置棕色试剂瓶中于 4 °C 避光保存。

1.3 标准曲线制作和测定方法

标准曲线制作: 称取 20 mg 原花色素标准品, 先用 200 μ L 甲醇充分溶解, 再加蒸馏水定容至 50 mL, 制成质量浓度为 0.4 mg/mL 的标准储备液, 装入棕色瓶中, 4 °C 备用。试验时, 先将配制好的原花色素标准储备液制成质量浓度为 0.04, 0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.40 mg/mL 的溶液, 再与染色剂反应。将最大质量浓度反应液在 300~800 nm 处进行全波长扫描, 确定该染色法的最大吸收波长 λ_{max} 为测定波长; 测定各管在 λ_{max} 处的吸光度, 然后以吸光度变化为横坐标、原花色素含量为纵坐标制作标准曲线图。

1) DMACA 显色法: 称取 0.1 g 稻米粉末样品, 置于试管中, 并加入 1.0 mL DMACA 染色试剂, 30 °C 下水浴 2 h, 再移至 1.5 mL 离心管中, 在 4 500 r/min、4 °C 下离心 1 min 后, 取上清液, 以染色液作空白对照, 测定其在 λ_{max} 处的吸光度。

2) 铁铵矾显色法: 称取 0.1 g 样品, 置于试管中并加入 3.0 mL 正丁醇-盐酸试剂, 再加入 0.10 mL 铁铵矾染色剂, 沸水浴处理 15 min 后 (水浴 8 min 时适当混匀反应液), 冰水浴 15 min, 冷却至室温后移至

1.5 mL离心管中;然后在4 500 r/min、4 ℃下离心1 min,取上清液,以染色液作空白对照,测定其在 λ_{\max} 处的吸光度。

3) 香草醛显色法:称取0.1 g样品,置于试管中,加入3.0 mL香草醛试剂混匀,30 ℃恒温水浴下显色2 h;然后移至1.5 mL离心管中,在4 500 r/min、4 ℃下离心1 min,取上清液,用香草醛染色剂稀释2.5倍后,以染色液作空白对照,测定其在 λ_{\max} 处的吸光度。

1.4 精密度试验

取标准储备液,按1.3中试验方法操作,重复5次,利用SPSS 7.0软件对各数据进行统计整理,并以相对标准偏差(RSD)对测定原花色素含量的3种显

色方法的精密度进行分析。

2 结果与讨论

2.1 显色反应

2.1.1 原花色素标准样品的显色反应

图1是6种不同质量浓度的原花色素标准样品分别与DMACA染色剂、铁铵矾染色剂、香草醛染色剂起显色反应后的颜色变化对比。由图可以看出:原花色素与DMACA染色反应后,颜色依次呈现深紫蓝至浅紫蓝;原花色素与铁铵矾染色反应后,颜色则依次呈浅红至浅黄色;原花色素与香草醛染色反应后,颜色也依次呈紫红色至浅紫色。

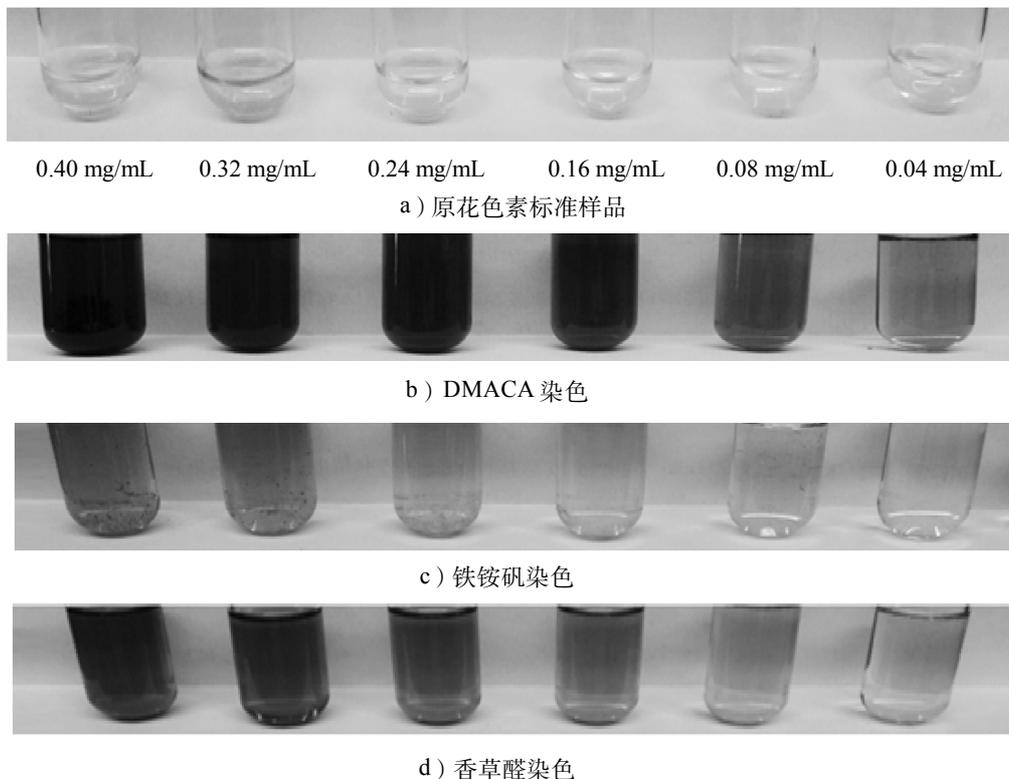


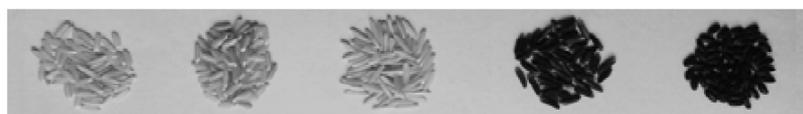
图1 3种方法染色后不同浓度原花色素标准样品的颜色变化

Fig. 1 The standard sample color changes of different concentration proanthocyanidins for three staining methods

2.1.2 稻米籽粒中原花色素的显色反应

将5种稻米样品分别与DMACA、铁铵矾、香草醛染色反应后,观察其提取液颜色的变化,并与空白染色液的颜色对比,结果如图2所示。由图可以看出:经DMACA染色反应后,谭农s/制21、R288、凡-14的提取液呈浅蓝色,而12庚351和秦稻2号的

提取液则呈深紫色;经铁铵矾染色反应后,谭农s/制21、R288、凡-14的提取液为微黄色,而12庚351和秦稻2号的提取液为深浅程度不一的酒红色;经香草醛染色反应后,谭农s/制21、R288、凡-14的提取液略显浅紫黑色,而12庚351和秦稻2号的提取液为酒红色。



a) 稻米籽粒

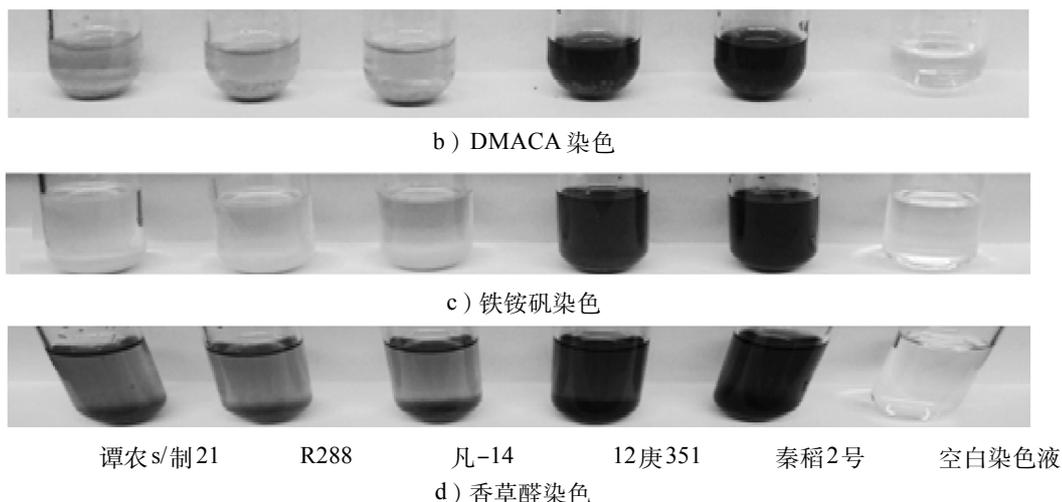


图2 稻米籽粒中原花色素的显色反应结果

Fig. 2 Color reaction result of proanthocyanidins in rice grains

2.2 原花色素含量的测定结果

2.2.1 标准样的全波长扫描结果

利用紫外-可见分光光度计在检测波长为300~800 nm范围内, 对质量浓度为0.4 mg/mL原花色素标样进

行全波长扫描, 发现原花色素标样经DMACA、铁铵矾、香草醛染色剂处理后的最大光吸收峰均分布在550 nm处左右, 如图3所示。故将试验中稻米籽粒反应液中原花色素含量检测的波长确定为550 nm。

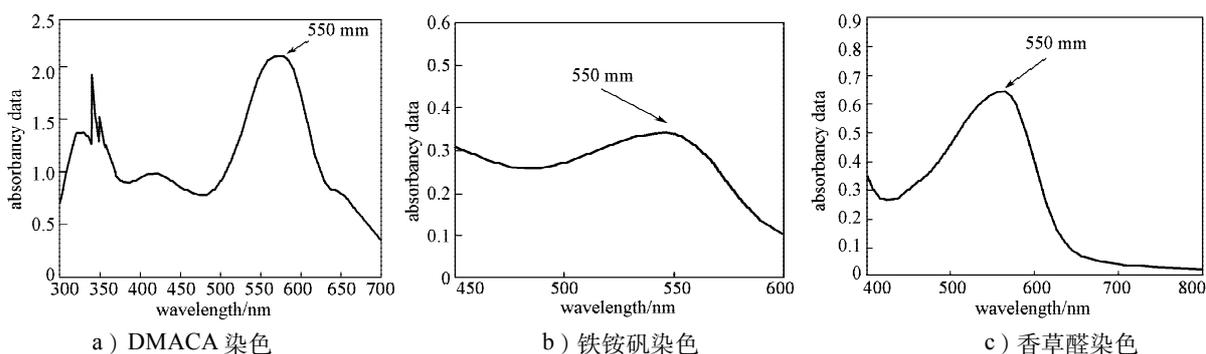


图3 原花色素标准样全波长扫描图

Fig. 3 Full spectrum scanning diagram for standard samples of proanthocyanidins

2.2.2 原花色素含量测定的标准曲线

将标准液经DMACA法、铁铵矾法和香草醛法染色反应后, 得到原花色素的标准曲线, 如图4所示。利用最小二乘法, 将原花色素的含量与吸光度进行线性回归分析, 得到3种方法的回归曲线方程分别为:

$$y=0.1045x-0.0087, R^2=0.9900;$$

$$y=0.6386x-0.0185, R^2=0.9942;$$

$$y=0.3599x-0.0344, R^2=0.9914.$$

由此可知, 这3种染色法测定的原花色素含量与吸光度变化之间均呈良好的线性关系, 故均可作为样品中原花色素含量的测定方法。

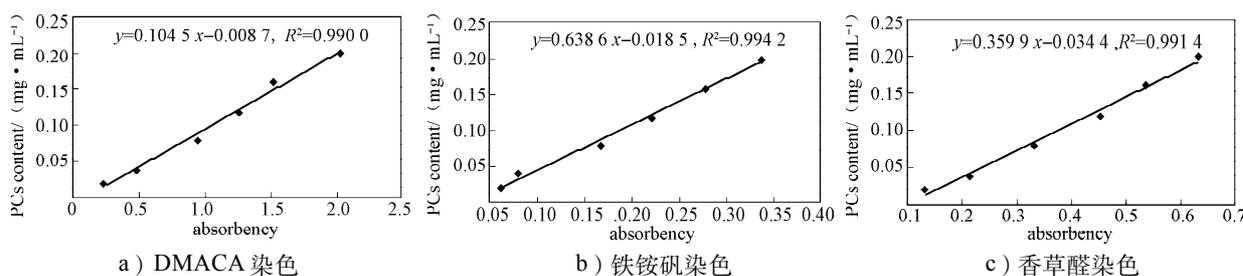


图4 3种染色法测定原花色素的标准曲线

Fig. 4 The standard curves of determining proanthocyanidins by three staining methods

2.2.3 稻米籽粒中原花色素含量的测定

1) DMACA 染色法。试验时, 谭农 s/ 制 21、R288、凡-14 和 12 庚 351 稻米籽粒的提取液均稀释至原来的 5 倍。因秦稻 2 号提取液与 DMACA 染色剂所起的显色反应呈深紫色, 不能进入紫外-可见分光光度计的比色测试区间, 故将其提取液稀

释至原来的 20 倍, 与染色剂反应后再进行检测。通过测定各样本液与 DMACA 染色剂发生反应的 3 个时间点 (15, 30, 45 s) 的吸光度。经计算得 5 种稻米籽粒中原花色素含量, 具体结果见表 1。由表可知, 原花色素含量最高的是秦稻 2 号, 12 庚 351 次之, 最低的是凡-14。

表 1 DMACA 染色法对稻米样品中原花色素含量的测定结果

Table 1 The determining results of proanthocyanidins in rice samples by the DMACA staining

稻米品种	测定时 稀释倍数	不同时间的吸光度				原花色素质量分数/ (mg · g ⁻¹)
		15 s	30 s	45 s	均值	
谭农 s/ 制 21	5	0.043	0.042	0.043	0.043	0.136
R288	5	0.051	0.053	0.051	0.052	0.183
凡-14	5	0.033	0.033	0.033	0.033	0.085
12 庚 351	5	0.805	0.804	0.804	0.804	4.115
秦稻 2 号	20	1.187	1.188	1.188	1.188	24.736

2) 铁铵矾染色法。用铁铵矾染色法测定稻米样品反应液时, 由于 12 庚 351、秦稻 2 号籽粒提取液颜色较深不能进入仪器的比色检测区间, 故先将其分别稀释至原来的 5 倍和 10 倍后再进行试验。铁铵矾

染色剂与 5 种稻米籽粒提取液在 3 个反应时间点的吸光度, 以及经计算得到的原花色素含量结果如表 2 所示。由表可知, 原花色素含量最高的是秦稻 2 号, 其次是 12 庚 351, 凡-14 最低。

表 2 铁铵矾染色法对稻米样品中原花色素含量的测定结果

Table 2 The determining results of proanthocyanidins in rice samples by the Ferric ammonium alum staining

稻米品种	测定时 稀释倍数	不同时间的吸光度				原花色素质量分数/ (mg · g ⁻¹)
		15 s	30 s	45 s	均值	
谭农 s/ 制 21	1	0.075	0.075	0.074	0.075	0.292
R288	1	0.044	0.043	0.044	0.044	0.094
凡-14	1	0.029	0.029	0.029	0.029	1.940 × 10 ⁻⁴
12 庚 351	5	0.389	0.389	0.389	0.389	1.220
秦稻 2 号	10	1.271	1.268	1.266	1.268	8.080

3) 香草醛染色法。用香草醛染色法测定各样本反应液中原花色素含量时, 先将 5 种稻米籽粒提取液均稀释至原来的 2.5 倍再进行试验, 试验和计结果如表 3 所示。由表可知, 原花色素含量最高的是秦稻 2 号, 其次是 12 庚 351, 凡-14 最低。

由表 1~3 中 3 种显色反应的结果表明: 5 种稻米品种中, 秦稻 2 号原花色素的含量最高, 是 12 庚 351 的 4.1~6.6 倍, 凡-14 中原花色素的含量最低; 黑米品种 (秦稻 2 号和 12 庚 351) 比白米品种 (R288 高、谭农 s/ 制 21 和 凡-14) 原花色素的含量明显要高。

表 3 香草醛染色法对稻米样品中原花色素含量的测定结果

Table 3 The determining results of proanthocyanidins in rice samples by the Vanillin staining

稻米品种	测定时 稀释倍数	不同时间的吸光度				原花色素质量分数/ (mg · g ⁻¹)
		15 s	30 s	45 s	均值	
谭农 s/ 制 21	2.5	0.153	0.154	0.154	0.154	1.349
R288	2.5	0.156	0.156	0.154	0.155	1.363
凡-14	2.5	0.125	0.126	0.125	0.125	1.093
12 庚 351	2.5	0.419	0.419	0.418	0.419	3.733
秦稻 2 号	2.5	1.688	1.688	1.688	1.688	15.153

2.3 精密度试验分析

按照 1.3 和 1.4 节中的方法, 对质量浓度为 0.24 mg/mL 的原花色素标准液, 5 次重复测定其吸光度, 且以相对标准偏差 (RSD) 值对试验结果的精密度进行分析, 结果如表 4 所示。由表可知, DMACA 染色法的 RSD 值为 3.279%, 铁铵矾染色法的 RSD 值为 6.143%,

香草醛染色法的 RSD 值为 1.959%。铁铵矾染色法的 RSD 值大于 5%; 香草醛染色法和 DMACA 染色法的 RSD 值均小于 5%, 且香草醛染色法具有较低的相对标准偏差。由此表明, 香草醛染色法用于测定原花色素含量的精密度最高, DMACA 染色法次之, 铁铵矾染色法的精密度较差。

表4 精密度试验结果分析
Table 4 The precision test result analysis

显色方法	吸光度					均值 (Mean \pm SD)	相对标准偏差 (RSD) /%
	1	2	3	4	5		
DMACA法	1.259	1.197	1.223	1.270	1.302	1.250 \pm 0.041	3.279%
铁铵矾法	0.226	0.209	0.212	0.243	0.218	0.222 \pm 0.014	6.143%
香草醛法	0.431	0.435	0.451	0.442	0.449	0.442 \pm 0.009	1.959%

3 结论

1) 由RSD值所反映的3种测定原花色素含量方法的精密由高到低依次是:香草醛染色法、DMACA染色法、铁铵矾染色法,故推荐采用香草醛染色法测定原花色素的含量。采用香草醛染色法检测得谭农s/制21、R288、凡-14、12庚351和秦稻2号稻米籽粒中,原花色素的质量分数分别为1.349,1.363,1.093,3.733,15.153 mg/g;5种稻米籽粒中原花色素的含量比为1.234:1.247:1:3.415:13.864。

2) 用3种显色方法测得5种稻米籽粒中原花色素的含量结果表明:黑米品种(秦稻2号和12庚351)普遍高于白米品种(R288高、谭农s/制21和凡-14),且黑米品种秦稻2号的原花色素含量是12庚351的4.1~6.6倍。

参考文献:

- [1] Sivakumaran S, Rumball W, Lane G A, et al. Variation of Proanthocyanidins in Lotus Species[J]. Journal Chemical Ecology, 2006, 32(8): 1797-1816.
- [2] 石碧,杜晓.植物原花色素研究利用进展与发展趋势[J].四川大学学报:工程科学版,2006,38(5):16-24. Shi Bi, Du Xiao. The Progress on Research and Utilization of Plant Proanthocyanidins[J]. Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition, 2006, 38(5): 16-24.
- [3] 黄梅,赵余庆,吴春福.葡萄中抗氧化物质的作用及其机制研究进展[J].中草药,2003,34(3):285-287. Huang Mei, Zhao Yuqing, Wu Chunfu. Research Progress on the Effect and Mechanism of the Antioxidants in the Grapes[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2003, 34(3): 285-287.
- [4] Zi Shaoxia, Ma Huijun, Li You, et al. Oligomeric Proanthocyanidins from Grape Seeds Effectively Inhibit Ultraviolet-Induced Melanogenesis of Human Melanocytes in Vitro[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2009, 23(2): 197-204.
- [5] Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, et al. Caboche Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids[J]. Annu. Rev. Plant Biol., 2006, 57: 405-430.
- [6] Min B, McClung A, Chen M H. Effects of Hydrothermal Processes on Antioxidants in Brown, Purple and Red Bran Whole Grain Rice (*Oryza Sativa* L.) [J]. Food Chemistry, 2014, 159: 106-115.
- [7] Han K H, Kitano-Okada T, Seo J M, et al. Characterisation of Anthocyanins and Proanthocyanidins of Adzuki Bean Extracts and Their Antioxidant Activity[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 692-701.
- [8] 周秋枝,黄蕾,沈丹华,等.火棘果中原花青素含量测定方法的建立[J].食品工业科技,2013,34(7):314-318. Zhou Qiuzhi, Huang Lei, Shen Danhua, et al. Determination of Proanthocyanidins Content in *Pyracantha Fortuneana* Fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(7): 314-318.
- [9] 刘步明.化学发光法测定原花青素的研究[J].食品科学,2007,28(1):250-252. Liu Buming. Determination of Oligomeric Procyanidins in Grape Seeds with Flow Injection Chemiluminescence Inhibition[J]. Food Science, 2007, 28(1): 250-252.
- [10] Deshpande S S, Cheryan M. Evaluation of Vanillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans[J]. Journal of Food Science, 1985, 50(4): 905-910.
- [11] Madigan D, McMurrough I, Smyth M R. Determination of Proanthocyanidins and Catechins in Beer and Barley by Highperformance Liquid Chromatography with Dual-Electrode Electrochemical Detection[J]. Analyst, 1994, 119(5): 863-868.
- [12] Fuleki T, Racirido da Silva J M. Catechin and Procyanidin Composition of Seeds from Grape Cultivars Grown in Ontario[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(4): 1156-1160.
- [13] 李春阳,许时婴,王璋.香草醛-盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J].食品科学,2004,25(2):157-161. Li Chunyang, Xu Shiyong, Wang Zhang. Vanillin-HCl Assay for the Proanthocyanidins Content of Grape Seed and Stem[J]. Food Science, 2004, 25(2): 157-161.

(责任编辑:邓光辉)