

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.016228

引用格式:赵珊,席清清,李曦,等.超高效液相色谱法测定有色稻米中花色苷的含量[J].食品与发酵工业,2018,44(11):301-306.

ZHAO Shan, XI Qing-qing, LI Xi, et al. Determination of anthocyanins in colored rice by ultra-high performance liquid chromatography[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(11):301-306.

超高效液相色谱法测定有色稻米中花色苷的含量

赵珊,席清清,李曦,雷欣宇,仲伶俐,黄世群,罗玲,郭灵安,周虹*

(四川省农业科学院分析测试中心,农业部农产品质量安全风险评估试验室(成都),四川 成都,610066)

摘 要 采用盐酸甲醇溶液超声提取有色稻米花色苷,以超高效液相色谱-紫外检测器对有色稻米中主要花色苷矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷进行定量检测。结果表明,在 0.5 ~ 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好, $R^2 > 0.999$; 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷回收率在 93.0% ~ 98.5%, RSD 在 0.33% ~ 3.50%; 芍药素-3-O-葡萄糖苷回收率在 96.0% ~ 111.7%, RSD 在 0.42% ~ 2.18%。对四川重庆地区的 4 个黑米样品、1 个紫米样品和 5 个红米样品的糙米和米糠中主要花色苷的测定结果表明,黑米、黑米糠、紫米和紫米糠中花色苷总量分别为 0 ~ 1 051.27 mg/kg, 74.06 ~ 206.82 mg/kg, 296.18 mg/kg 和 116.15 mg/kg; 红米中未检出矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷,部分红米糠中检出矢车菊素-3-O-葡萄糖苷,含量为 0 ~ 50.94 mg/kg。

关键词 超高效液相色谱;有色稻米;花色苷;花青素

有色稻米是色素沉积在水稻种子的果皮、种皮或糊粉层内形成的一种重要的特异水稻种质资源,常见的有黑米、红米和紫米。花青素属于黄酮类物质,它是一种广泛存在于自然界植物中的水溶性天然色素,在自然状态下常与各种单糖形成糖苷,成为花色苷^[1]。花色苷具有抗氧化活性^[2-4]、抗突变活性^[5]、抗癌活性^[6]、抗炎活性^[7-9]、保护视力^[10]、抗辐射^[11]等功能,在食品、医药、化妆品等行业都具有巨大的应用潜力。有色稻米中含有丰富的花色苷,使得有色稻米的市场需求越来越大。此外,有色稻糠中也富含花色苷,通过了解其花色苷的含量有助于对资源进行更充分的发掘利用。

有色稻米中的花色苷主要有矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷^[12-13]。目前测定花色苷的检测方法主要有可见分光光度法^[14]、高效液相色谱法^[15]和高效液相色谱-串联质谱法^[14, 16]等。高效液相色谱-串联质谱法,其测定准确,检出限低,适合进行低含量样品的测定和鉴定未知结构的花色苷,对于像黑米这类含量较高的样品来说会超过其线性范围。普通高效液相色谱法是目前测定花青素、花色苷较多的方法之一,而超高效液相色谱能够在较宽的线性范围内保持柱效恒定,大幅度改善液相色谱的分

析速度、分离度和灵敏度,显著提高工作效率。

本文以黑米、紫米和红米为材料,建立花色苷的超高效液相色谱检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑米稻谷、红米稻谷、紫米稻谷均购于生产基地;矢车菊素-3-O-葡萄糖苷($\geq 98\%$)、芍药素-3-O-葡萄糖苷($\geq 98\%$),武汉天植生物技术有限公司;浓盐酸(优级纯),西陇化工;乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯),Fisher Scientific;甲酸(色谱纯),CNW;实验用水均为去离子水。

1.2 仪器与设备

1290 型超高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司(配紫外检测器,用于花色苷测定);1100 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司(配二极管阵列检测器,用于花色苷光谱扫描);KQ5200DE 型超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;AUY220 型电子天平,日本岛津公司;UPH-1-20L 型实验室超纯水仪,四川优普超纯科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

将稻谷过砻谷机进行脱壳,分别将脱壳后的糙米和谷壳米糠磨粉机磨成粉并过筛,糙米过 80 目筛,谷壳米糠过 40 目筛。-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

有色稻米和米糠花色苷的提取:称取 1.0 g(精

第一作者:硕士研究生(周虹研究员为通讯作者, E-mail: zhouhong610531@163.com)。

基金项目:国家农产品质量安全评估项目(GJFP201701502);四川省财政创新工程(2017QNJJ-021)

收稿日期:2017-11-08,改回日期:2018-02-01

确到 0.000 1 g)糙米粉或米糠样品于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 提取液 $V(\text{甲醇}):V(1.0\text{ mol/L HCl 水溶液})=85:15$,混匀后避光超声提取 30 min,300 0 r/min离心 5 min,取上清液,重复提取 1 次,合并上清液混匀后过 0.22 μm 尼龙膜,装入棕色样品瓶中待测。

有色稻米和米糠中花青素的提取:称取 1.0 ~ 3.0 g(精确到 0.000 1g)糙米粉或米糠样品于 250 mL 具塞三角瓶中,加入 50 mL 提取液 $V(\text{无水乙醇}):V(\text{水}):V(\text{浓盐酸})=2:1:1$,混匀后避光超声提取 30 min,然后于沸水浴中回流 1 h,取出冷却后,用提取液 $V(\text{无水乙醇}):V(\text{水}):V(\text{浓盐酸})=2:1:1$ 定容至 50 mL 后取上清液过 0.22 μm 水相滤膜,装入棕色样品瓶中待测。具体步骤参照标准 NY/T 2640—2014 植物源性食品中花青素的测定高效液相色谱法。

1.3.2 色谱条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm \times 100 mm,1.7 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:520 nm;流动相 A:1% 甲酸/水溶液(体积比),过 0.2 μm 水系微孔过滤膜;流动相 B:1% 甲酸/乙腈溶液(体积比);流速:0.2 mL/min;进样量:2.0 μL ;梯度洗脱程序:0 ~ 1 min,7% ~ 8% B;1 ~ 3 min,8% ~ 18% B;3 ~ 4.5 min,18% ~ 30% B;4.5 ~ 7 min,30% ~ 40% B;7 ~ 8 min,40% B;8 ~ 9 min,40% ~ 7% B;后运行 2.5 min。

1.3.3 标准溶液的配制

标准储备液的配制:分别称取矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、芍药素-3-O-葡萄糖苷标准品各 5.0 mg(精确

到 0.01 mg),用 85% 甲醇盐酸溶液 $V(\text{甲醇}):V(1\text{ mol/L HCl 水溶液})=85:15$ 溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,即为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的单标储备液,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下,贮存于密闭的棕色玻璃瓶中。

混合标准使用液的配制:将单标储备液混合,并用 85% 甲醇盐酸溶液 $V(\text{甲醇}):V(1\text{ mol/L HCl 水溶液})=85:15$ 逐级稀释成 0.5、1.0、5.0、10.0、25.0 和 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的花色苷混合标准使用液。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件优化

通常花色苷不太稳定,在中性和碱性条件下容易发生分解,但在偏酸性条件下能较稳定地存在。为了解加热酸水解对花青素含量测定的影响,通过比较直接提取测定稻米中花色苷含量和将其沸水浴酸水解后测定花青素含量,结果见表 1,发现在沸水浴酸水解过程中花青素有明显的降解。在黑稻和紫稻样品中,矢车菊素测定含量为理论值的 57.3% ~ 74.5%,芍药素测定含量为理论值的 40.0% ~ 60.4%。因此,选择直接提取稻米中的花色苷后进行矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷的测定。采用超声提取法对样品中花色苷进行提取(提取溶剂: $V(\text{甲醇}):V(1\text{mol/L HCl 水溶液})=85:15$;料液比 = 1:10;提取温度:常温),将稻米和米糠样品进行超声避光提取,每次 30 min,重复 2 次。前处理过程迅速、简便。样品处理完后装于棕色的样品瓶中并尽快完成测定。

表 1 酸水解对花青素含量测定的影响

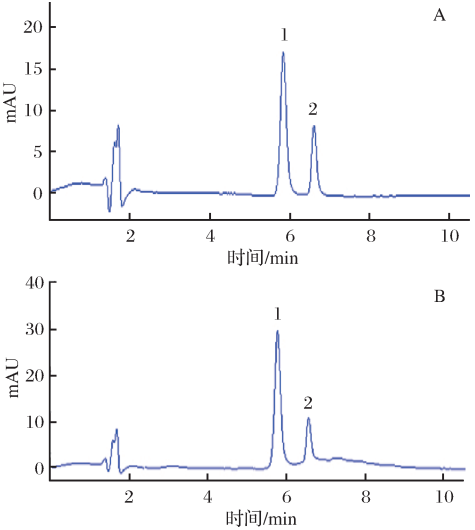
Table1 The influence of acid hydrolysis on anthocyanins content determination

测定种类	测定项目	分子式	相对分子质量	样品	测定含量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	换算成理论花青素 含量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	测定值占理论值 百分比/%
花色苷	矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClO}_{11}$	484.84	黑米	675.5	449.6	74.5
				黑米糠	134.7	89.7	57.3
				紫米	202.7	134.9	63.8
				紫米糠	78.2	52.1	73.7
	芍药素-3-O-葡萄糖苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClO}_{11}$	498.86	黑米	302.6	204.3	60.4
				黑米糠	72.1	48.7	40.0
				紫米	75.6	51.0	43.9
				紫米糠	38.0	25.6	48.8
花青素	矢车菊素	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}_6$	322.7	黑米米	335.0	—	—
				黑米糠	51.4	—	—
				紫米	86.0	—	—
				紫米糠	38.4	—	—
	芍药素	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClO}_6$	336.72	黑米	123.4	—	—
				黑米糠	18.0	—	—
				紫米	22.4	—	—
				紫米糠	12.5	—	—

注:“—”表示无数据。

2.2 液相条件的确定

由于花青素需要在低 pH 值的条件分离,结合文献^[17-18]和前期条件摸索,流动相选择酸性较强的 1% 甲酸水溶液和 1% 甲酸乙腈溶液。色谱柱选择在低 pH 条件下稳定性好的 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱。考虑到峰形和分离效果,将出峰时间控制在 5 ~ 7 min,经过反复优化,采用梯度洗脱程序。图 1 为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷的色谱图,A 为标准品,B 为稻米样品。



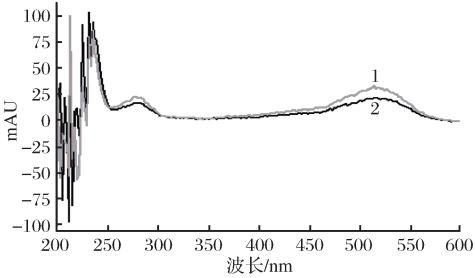
A-标准品;B-稻米样品;峰 1-矢车菊素-3-O-葡萄糖苷;
峰 2-芍药素-3-O-葡萄糖苷

图 1 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷色谱图

Fig. 1 The chromatograms of cyanidin-3-O-glucoside chloride and peonidin-3-O-glucoside chloride

2.3 检测波长的确定

本实验采用二极管阵列检测器对花色苷标准品进行最大吸收波长分析,设置扫描范围 200 ~ 600 nm。提取矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷的紫外可见吸收光谱图(图 2),得到矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷分别在 275 nm 和 520 nm 左右有较强的吸收峰,其中两者在 520 nm 处吸收强度更强。另外,结合前人的研究结果^[16, 19-20],这里选择 520 nm 为检测波长。



1-矢车菊素-3-O-葡萄糖苷;2-芍药素-3-O-葡萄糖苷
图 2 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷紫外可见吸收光谱图

Fig. 2 The UV-Vis absorption spectrum of cyanidin-3-O-glucoside chloride and peonidin-3-O-glucoside chloride

2.4 方法的线性、检出限和定量限

将混合标准储备液逐级稀释得到 0.5、1.0、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/mL 浓度的花色苷混合标准使用液,依次进超高效液相色谱仪进行分析,结果表明,在 0.5 ~ 50.0 μg/mL 线性关系良好。仪器的检出限和定量限分别对应仪器 3 和 10 倍信噪比,方法检测线和定量限以称样量为 1.00 g,定容体积为 20 mL 进行计算得出。线性关系、相关系数、仪器和方法检出限、定量限见表 2。

表 2 花色苷的线性关系、检出限和定量限

Table 2 Liner equations, correlation, LOD and LOQ of anthocyanins

花色苷	线性关系	相关系数 (R ²)	仪器检出限/ (μg · mL ⁻¹)	仪器定量限/ (μg · mL ⁻¹)	方法检出限/ (mg · kg ⁻¹)	方法定量限/ (mg · kg ⁻¹)
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	y = 21.361 43x - 1.712 10	0.999 98	0.026	0.087	0.52	1.74
芍药素-3-O-葡萄糖苷	y = 8.718 17x - 1.158 99	0.999 88	0.050	0.166	1.00	3.32

2.5 回收率和精密度

以质量浓度为 5.0 μg/mL 的混标溶液连续进样 6 次,根据保留时间和峰面积分别计算精密度,两种花色苷的保留时间 RSD 分别为 0.06% 和 0.12%,峰面积 RSD 分别为 0.48% 和 1.27%,表明仪器精密度良好,结果见表 3。

为了评价方法的可靠性,选择黑稻米、黑稻糠、紫

稻米、紫稻糠、红稻米和红稻糠样品为加标基质进行添加回收实验。结果如表 4 所示,每个添加水平重复 6 次。矢车菊素-3-O-葡萄糖苷回收率在 93.0% ~ 98.5%,RSD 在 0.33% ~ 3.50%;芍药素-3-O-葡萄糖苷回收率在 96.0% ~ 111.7%,RSD 在 0.42% ~ 2.18%。结果表明,该方法的准确性与稳定性良好,适用于有色稻中花色苷的检测分析。

表 3 精密度实验 (n = 6)

Table 3 Result of precision experiments (n = 6)					
花色苷	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	保留时间/ min	峰面积/ mAU	保留时间 RSD/%	峰面积 RSD/%
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	5.0	5.786	102.63	0.06	0.48
		5.793	101.83		
		5.788	101.42		
		5.793	102.11		
		5.79	101.41		
		5.784	102.27		
		6.579	39.96		
		6.565	40.28		
芍药素-3-O-葡萄糖苷	5.0	6.566	41.19	0.12	1.27
		6.568	40.89		
		6.566	41.28		
		6.583	40.79		

表 4 回收率实验 (n = 6)

Table4 Results of recovery test (n = 6)					
花色苷	样品	样品含量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	加标量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/ %	RSD/ %
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	黑米	506.8	500	98.5	0.70
	黑米糠	43.8	50	93.0	0.99
	紫米	206.7	200	96.0	0.33
	紫米糠	78.6	100	96.7	0.61
	红米	0	5	93.9	1.84
	红米糠	8.1	10	97.4	3.50
芍药素-3-O-葡萄糖苷	黑米	223.9	200	98.0	0.42
	黑米糠	22.5	40	96.1	0.94
	紫米	81.1	100	111.7	1.06
	紫米糠	39.9	40	96.0	0.52
	红米	0	5	100.9	0.89
	红米糠	0	5	103.6	2.18

表 5 黑米、紫米和红米中花色苷的含量 (n = 3)

Table 5 The content of anthocyanins in black rice, purple rice and red rice					
样品名称	产地	花色苷含量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)			
		矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	芍药素-3-O-葡萄糖苷	总量	矢车菊素-3-O-葡萄糖苷总量/%
黑米 1-米	四川广汉	ND	ND	ND	-
黑米 1-糠	四川广汉	68.61 \pm 0.14	15.10 \pm 0.01	83.71	82.0
黑米 2-米	四川广汉	675.46 \pm 4.71	302.62 \pm 3.53	978.08	69.1
黑米 2-糠	四川广汉	134.74 \pm 0.87	72.08 \pm 1.83	206.82	65.1
黑米 3-米	四川广汉	492.42 \pm 4.47	208.08 \pm 1.83	700.50	70.3
黑米 3-糠	四川广汉	46.90 \pm 0.69	27.16 \pm 0.22	74.06	63.3
黑米 4-米	四川广汉	726.64 \pm 2.25	324.63 \pm 3.20	1 051.27	69.1
黑米 4-糠	四川广汉	58.62 \pm 0.49	40.21 \pm 0.20	98.83	59.3
紫米-米	四川大英	220.00 \pm 3.48	76.18 \pm 0.62	296.18	74.3
紫米-糠	四川大英	78.20 \pm 0.40	37.95 \pm 0.45	116.15	67.3
红米 1-米	四川普格	ND	ND	ND	-
红米 1-糠	四川普格	11.56 \pm 0.14	ND	11.56	-
红米 2-米	四川普格	ND	ND	ND	-
红米 2-糠	四川普格	6.21 \pm 0.11	ND	6.21	-

2.6 样品的测定

本实验对四川重庆地区的 4 个黑米样品、1 个紫米样品和 5 个红米样品的糙米和米糠进行花色苷的测定,测定结果见表 5。由结果可知,黑米中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量为 0 ~ 726.64 mg/kg,芍药素-3-O-葡萄糖苷的含量为 0 ~ 324.63 mg/kg,总量为 0 ~ 1 051.27 mg/kg;黑米糠中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量为 46.90 ~ 134.74 mg/kg,芍药素-3-O-葡萄糖苷的含量为 15.10 ~ 72.08 mg/kg,总量为 74.06 ~ 206.82 mg/kg。紫米中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量为 220.00 mg/kg,芍药素-3-O-葡萄糖苷的含量为 76.18 mg/kg,总量为 296.18 mg/kg;紫米糠中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量为 78.20 mg/kg,芍药素-3-O-葡萄糖苷的含量为 37.95 mg/kg,总量为 116.15 mg/kg。红米中均未检出矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素素-3-O-葡萄糖苷,红米糠中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量为 0 ~ 59.94 mg/kg,未检出芍药素-3-O-葡萄糖苷。研究表明^[21-22],黑米花色苷分布从米粒表面至内部呈急剧递减,精碾后的精米近乎白米,其花色苷含量极低。陈廷文^[23]发现,水稻花色苷含量与谷粒颜色之间有一定的相关关系,颖壳色深褐而糙米色深黑,花色苷含量高。黑米 1-米样品未检出矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素素-3-O-葡萄糖苷,可能是由于样品的颜色呈淡黄色,和其他几个黑米样品深黑色差异较大。另外,花色苷类物质在稻米加工过程中,随着米皮去除会有部分损失,因此加工过程越少抗氧化成分保留越多。

续表 5

样品名称	产地	花色苷含量/(mg·kg ⁻¹)			
		矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	芍药素-3-O-葡萄糖苷	总量	矢车菊素-3-O-葡萄糖苷总量/%
红米 3-米	四川普格	ND	ND	ND	-
红米 3-糠	四川普格	50.94 ± 0.34	ND	50.94	-
红米 4-米	四川广汉	ND	ND	ND	-
红米 4-糠	四川广汉	ND	ND	ND	-
红米 5-米	重庆合川	ND	ND	ND	-
红米 5-糠	重庆合川	ND	ND	ND	-

注:ND 为未检出。

不同的黑米种质其花色苷组成和含量都有较大的差异。RYU 等^[24]从 10 个不同黑米样品中检测到矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷两种花色苷,其总花色苷含量(以全谷计)为 0 ~ 490 mg/100g。本研究中黑米样品花色苷总量为 0 ~ 1 051.27 mg/kg,黑米糠样品中花色苷总量为 74.06 ~ 206.82 mg/kg。本研究发现黑米、黑米糠、紫米和紫米糠中花色苷主要组成是矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷,其中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷占总量的 59.3% ~ 82.0%,这与 YAWADIO 等^[25]和孔令瑶等^[26]的研究一致。由不同颜色的水稻样品进行比较得知,黑米的花色苷含量最高,黑米 1 样品除外,其次是紫米,红米中未检测到花色苷,只有部分红米糠中检测到花色苷。由糙米和米糠样品进行比较得知,大部分黑米和紫米中花色苷的含量大于黑米糠和紫米糠。

3 结论

建立了有色稻米中花色苷的超高效液相色谱检测方法,使用盐酸甲醇溶液超声提取有色稻米花色苷能有效避免花色苷水解等过程发生降解,采用超高效液相色谱—紫外可见检测器对有色稻米和米糠中主要花色苷矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷进行定量检测。方法验证结果表明,该方法能快速、准确地对有色稻中糙米和米糠的花色苷进行定性定量测定,方法稳定、可靠。

对四川重庆地区的 4 个黑米、1 个紫米和 5 个红米的糙米和米糠进行花色苷的测定,结果表明:黑米、黑米糠、紫米和紫米糠样品中花色苷主要组成是矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷,其中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷占总量的 59.3% ~ 82.0%。黑米花色苷总量为 0 ~ 1 051.27 mg/kg,黑米糠花色苷总量为 74.06 ~ 206.82 mg/kg;紫米花色苷总量为

296.18 mg/kg,紫米糠花色苷总量为 116.15 mg/kg;红米中未检出矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷,部分红米糠检出矢车菊素-3-O-葡萄糖苷,含量为 0 ~ 50.94 mg/kg。

参 考 文 献

[1] HERTO G M, HOLLMAN P C, KATAN M B, et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the netherlands [J]. Nutrition & Cancer, 1993, 20(1): 21 - 29.

[2] WANG H, CAO G, PRIOR R L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(2): 304 - 309.

[3] PROTEGGENTE A R, PANNALA A S, PAGANGA G, et al. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition [J]. Free Radical Research, 2002, 36(2): 217 - 233.

[4] SEERAM N P, MOMIN R A, NAIR M G, et al. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries [J]. Phytomedicine, 2001, 8(5): 362 - 369.

[5] YOSHIMOTO M, OKUNO S, KUMAGAI T, et al. Distribution of antimutagenic components in colored sweetpotatoes [J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 1999, 33(3): 143 - 148.

[6] HAGIWARA A, MIYASHITA K, NAKANISHI T, et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1, 2-dimethylhydrazine [J]. Cancer Letters, 2001, 171(1): 17 - 25.

[7] AUGER C, CAPORICCIO B, LANDRAULT N, et al. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden syrian hamsters (Mesocricetus auratus) [J]. The Journal of Nutrition, 2002, 132(6): 1 207 - 1 213.

[8] JANKOWSKI A, JANKOWSKA B, NIEDWOROK J. The

- effect of anthocyanin dye from grapes on experimental diabetes[J]. *Folia Medica Cracoviensia*, 1999, 41(3/4): 5–15.
- [9] WANG H, NAIR M G, STRASBURG G M, et al. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries[J]. *Journal of natural products*, 1999, 62(2): 294–296.
- [10] MATSUMOTO H, INABA H, KISHI M, et al. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(3): 1 546–1 551.
- [11] TAKAHASHI A, TAKEDA K, OHNISHI T. Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1991, 32(4): 541–547.
- [12] 郭红辉, 王庆, 秦玉, 等. 液质联用分析黑米皮提取物中花色苷化合物[J]. 韶关学院学报, 2007, 28(9): 77–80.
- [13] 梁征, 熊思慧, 郭莹, 等. 紫米蛋白-多酚复合物的结构组成及分子形貌[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 85–90.
- [14] 闫亚美, 代彦满, 冉林武, 等. 黑果枸杞与 5 种果蔬中花色苷组成及体外抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技, 2014, 35(16): 133–136.
- [15] 应龙彬, 俞桑桑, 刘催萍, 等. 高效液相色谱法对黑米中花色苷成分的测定[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2012, 11(1): 28–32.
- [16] 郭红辉, 王庆, 秦玉, 等. 液质联用分析黑米皮提取物中花色苷化合物[J]. 韶关学院学报, 2007, 28(9): 77–80.
- [17] 张晓芳, 高伟, 邓慧颖, 等. 红米红中矢车菊-3-葡萄糖苷含量与色价的相关性分析[J]. 食品科学, 2013, 34(20): 135–138.
- [18] 胡莉, 仲伶俐, 毛建霏, 等. 高效液相色谱测定粮食、蔬菜和水果中的花青素[J]. 分析试验室, 2012, 31(12): 43–47.
- [19] 夏效东, 凌文华, 郑琳, 等. HPLC 法测定黑米皮提取物中花色苷成分及含量[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 206–208.
- [20] 林丽, 李进, 丁成丽, 等. 高效液相色谱法测定黑果枸杞果实中花色苷的含量[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 164–166.
- [21] 赵则胜. 中国特种稻[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 34–36.
- [22] 张名位. 特种稻米及其加工技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 34–89.
- [23] 陈廷文. 稻谷黑米种皮的遗传特性研究[J]. 四川农业大学学报, 1995(4): 498–505.
- [24] RYU S N, PARK S Z, HO C T. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice[J]. *Journal of food and Drug Analysis*, 1998, 6(4): 729–736.
- [25] YAWADIO R, TANIMORI S, MORITA N. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(4): 1 616–1 625.
- [26] 孔令瑶, 汪云, 曹玉华, 等. 黑米色素的组成与结构分析[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(2): 25–29.

Determination of anthocyanins in colored rice by ultra-high performance liquid chromatography

ZHAO Shan, XI Qing-qing, LI Xi, LEI Xin-yu, ZHONG Ling-li,
HUANG Shi-qun, LUO Ling, GUO Ling-an, ZHOU Hong*

(Analysis and Testing Center of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Security Risk Assessment Laboratory of Ministry of Agriculture (Chengdu), Chengdu 610066, China)

ABSTRACT Anthocyanins from colored rice were extracted with hydrochloric acid-methanol solutions under ultrasonic wave extraction. The detection of cyanidin-3-O-glucoside chloride and peonidin-3-O-glucoside chloride in brown rice and rice bran were carried out by UHPLC-UV visible detector. The samples were four black rice, one purple rice and five red rice collected in Sichuan and Chongqing provinces. The results showed that the method was well linearly correlated in the concentration range of 0.5 to 50 $\mu\text{g/mL}$ for anthocyanins ($R^2 > 0.999$); the recoveries of cyanidin-3-O-glucoside chloride were 93.0%–98.5% with relative standard deviations (RSD) of 0.33%–3.50%; the recoveries of peonidin-3-O-glucoside chloride were 96.0%–111.7% with RSD of 0.42%–2.18%. The total amount of anthocyanins in black rice, black rice bran, purple rice and purple rice bran was 0–1 051.27, 74.06–206.82, 296.18 and 116.15 mg/kg respectively. Cyanidin-3-O-glucoside chloride and peonidin-3-O-glucoside chloride were not detected in red rice, but cyanidin-3-O-glucoside chloride was detected in some red rice bran samples, and the content was from 0 to 50.94 mg/kg.

Key words ultra-high performance liquid chromatography; colored rice; anthocyanins; anthocyanidin