

# HPLC 法测定黑米皮提取物中 花色苷成分及含量

夏效东<sup>1</sup>, 凌文华<sup>1</sup>, 郑琳<sup>1</sup>, 张名位<sup>2</sup>

(1. 中山大学公共卫生学院营养系, 广东 广州 510080

2. 广东省农业科学研究院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 目的: 用高效液相色谱法测定黑米皮提取物中花色苷的成分及含量。方法: 采用 Hypersil BDS C<sub>18</sub> 柱 (250 × 4.6mm, 5μm), 以乙腈—4% 磷酸 (15:85) 为流动相, 流速 0.8ml/min, 检测波长 530nm, 用外标法定量。结果与结论: 黑米皮提取物中主要含两种花色苷: 矢车菊定-3-葡萄糖苷和芍药定-3-葡萄糖苷, 其含量分别为 25.7% 和 1.7%。

**关键词:** 黑米皮; 花色苷; 高效液相色谱法

## Determination of Anthocyanin Component and Content in Black Rice Extract by HPLC

XIA Xiao-dong<sup>1</sup>, LING Wen-hua<sup>1</sup>, ZHENG Lin<sup>1</sup>, ZHANG Ming-wei<sup>2</sup>

(1. Department of Medical Nutriology, Public Health School, ZhongShan University,

Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** Objective: To determine the component and content of anthocyanins in black rice extract. Methods: The HPLC method was used to determine the component and content of anthocyanins in black rice extract. The analysis was carried on Hypersil BDS C<sub>18</sub> column. The mobile phase was acetonitrile-4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (15:85), flow-rate 0.8ml/min and wave-length 530nm. Results and conclusion: There are two major anthocyanins in black rice extract: cyanindin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside, the content of which are 25.7% and 1.7% of the whole extract respectively.

**Key words:** black rice; anthocyanin; HPLC

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0206-03

黑米被认为是稻米中的珍品, 它是近年国际流行的“健康食品”之一。黑米有滋阴补肾、健脾开胃、补中益气、活血化瘀等功效。黑米具有的很多生理功能可能都与其所含的花色苷类色素有关<sup>[1,2]</sup>。花色苷是一种

黄酮类的化合物, 也是黑米呈现黑色的主要原因。黑米中的花色苷类物质除可作为色素广泛使用外, 同时还具有多种生理功能, 包括抗氧化、抗炎以及调节血脂、抗动脉粥样硬化等功能<sup>[3,4]</sup>。目前国内对于花色苷含量的

收稿日期: 2005-04-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371215)

作者简介: 夏效东 (1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向为营养与健康。

- [1] 胡亚芹, 薛长湖, 蔡跃飘. 螺旋藻单半乳糖二酰甘油酯脂肪酸分子组成分析[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(4): 542-548.
- [2] 邓青, 张晓梅. 气相色谱/质谱联用分析螺旋藻脂肪酸组成[J]. 云南民族学院学报, 2003, 12(1): 37-38.
- [3] 陈耀组, 涂亚平. 有机质谱原理及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 145-146.

- [4] 常建华, 董绮功. 波谱原理及解析[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 281-282.
- [5] 孟令芝, 何永炳. 有机波谱分析[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1997. 198, 204-205.
- [6] 赵燕来, 何森泉, 徐长德. 杂环化学导论[M]. 北京: 高等教育出版社, 1992. 219-220.

测定,一般采用比色法计算色价来表示其相对含量<sup>[5,6]</sup>,但这种方法容易受溶剂以及其他多酚类物质的干扰而影响结果的准确性。本文采用高效液相色谱法测定了黑米皮提取物中花色苷的成分及含量,为今后评价花色苷类物质提供一种准确且简便易行的方法。

## 1 仪器与试剂

1.1 主要仪器 Bio-Rad 高效液相色谱仪; Waters Model 1706 泵; Bio-Rad UV/VIS 检测器; 旋转蒸发器; Labconco 冻干机。

1.2 黑米皮 由广东省农业科学研究院提供。

1.3 花色苷对照品 矢车菊定-3-葡萄糖苷(以下简称苷A)和芍药定-3-葡萄糖苷(以下简称苷B)均购自挪威 polyphenols 公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件的选择

色谱柱: Hypersil BDS C<sub>18</sub> 柱(250×4.6mm, 5μm); 流动相: 乙腈-4%磷酸(15:85); 流速: 0.8ml/min; 检测波长 530nm; 柱温 25℃。

### 2.2 标准品溶液的制备及线性关系考察

精确称取苷A和苷B对照品 10mg 溶于 10ml 的 1% 盐酸甲醇溶液, 分别稀释为下列一系列浓度的标准品溶液: 0.50、0.25、0.10、0.05、0.025 以及 0.0125mg/ml。分别吸取不同浓度的标准品溶液 10μl 进样, 每种浓度重复进样三次, 计算三次平均峰面积。将峰面积 Y 与溶液浓度 X 进行直线回归分析。两种对照品在 0.0125~0.5mg/ml 范围内有良好的线性关系, 回归方程分别为: 苷A  $Y_1 = 11760165X_1 + 443637.066$  ( $r=0.9997$ ); 苷B  $Y_2 = 13439987X_2 + 376750.493$  ( $r=0.9998$ )。

### 2.3 样品的制备

称取一定量的黑米皮用含 0.1% 浓 HCl (体积比) 的 60% 的乙醇溶液提取。提取液合并后旋转蒸发至无乙醇, 接着用石油醚除去其中的脂溶性成分。得到的滤液通过 Amberlite XAD-7 大孔吸附树脂柱。吸附饱和后, 先用微酸化的水溶液将糖类、有机酸及一些未吸附的多酚类等杂质洗去, 最后用 80% 的乙醇将吸附的花色苷洗脱下来。收集的洗脱液旋转蒸发至无乙醇后经冷冻干燥后得到固体粉末。

### 2.4 精密度试验

精密吸取两种对照品溶液 10μl, 连续进样 6 次, 测定峰面积。测得苷A的 RSD 为 2.78%, 苷B的 RSD 为 2.36%, 表明进样精密度良好。

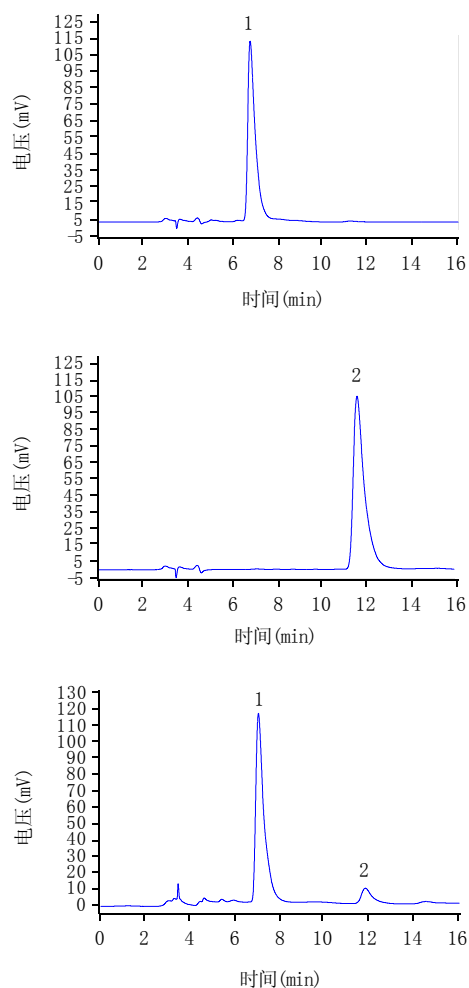
### 2.5 回收率试验

精密吸取苷A、苷B对照品溶液(1.0mg/ml) 40、80、

120μl, 各加入已知浓度样品溶液(0.022mg/ml) 100μl, 用 1% 盐酸甲醇稀释至 1ml, 摇匀。按供试样品处理方法测定。结果显示: 苷A回收率为 98.39%, RSD 为 2.78% ( $n=3$ ); 苷B回收率为 99.02%, RSD 为 2.55% ( $n=3$ )

### 2.6 样品提取物中花色苷成分及含量的测定

准确称取 10mg 提取物溶于 10ml 的 1% 盐酸甲醇中, 过 0.45μm 滤膜后吸取 10μl 进样, 测定峰面积, 并与标准曲线比较。花色苷对照品以及黑米皮提取物样品的色谱图见图 1。



1: 矢车菊定-3-葡萄糖苷 2: 芍药定-3-葡萄糖苷

图1 两种花色苷对照品及黑米皮提取物样品 HPLC 图  
Fig.1 HPLC chromatograms of two standard anthocyanins and anthocyanin rich

## 3 讨论

### 3.1 黑米中花色苷的提取纯化工艺

由于黑米中大部分的花色苷集中在 10% 左右的黑米皮中, 所以我们直接采用黑米皮作为提取黑米花色苷的原料。花色苷只有在偏酸性的条件下才能保持其 2- 苯基-

# 建立一种快速检测坂歧肠杆菌的方法

韩 伟, 顾 鸣, 杨捷琳  
(上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

**摘 要:** 目的: 建立快速检测婴儿配方奶制品(IFM)中坂歧肠杆菌的方法。方法: 选择ATCC 坂歧肠杆菌标准株, 对不同的增菌性培养基、选择性培养基和显色培养基进行研究; 结合VITEK 仪和API20E 细菌鉴定系统, 构建快速检测配方奶制品中坂歧肠杆菌的方法。结果: 建立的快速检测配方奶制品中坂歧肠杆菌的方法, 所需检验流程为72h, 方法灵敏度为2CFU/g, 能有效区别于阴沟杆菌、产气杆菌等肠杆菌科细菌; 方法应用稳定; 操作简单、方法可靠, 适宜规模化检测。结论: 本研究认为, 所建立的快速检测配方奶制品中坂歧肠杆菌的方法适宜检验检疫的工作要求, 能有效地发现配方奶制品中坂歧肠杆菌的污染情况。

**关键词:** 婴儿配方奶粉; 坂歧肠杆菌; 显色培养基

## Rapid Method Detection of Residual *E. sakazakii* in Milk-based Powder Infant Formulae

HAN Wei, GU Ming, YANG Jie-lin  
(Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

**Abstract:** Through using two step enrichment followed with isolation on chromogenic *Enterobacter sakazakii* agarose, a rapid method detection of *Enterobacter sakazakii* in milk-based powder infant formulae has been established in this research. Biochemical

收稿日期: 2005-04-22

作者简介: 韩伟(1974), 女, 工程师, 研究方向为食品微生物检测。

苯并吡喃阳离子结构, 故实验中在溶剂里都添加一定量的盐酸。在经过石油醚萃取和Amberlite 树脂纯化后, 黑米皮提取物中的杂质显著减少, 在样品的色谱图中, 几乎没有杂质峰的出现。黑米皮提取物中花色苷的含量已接近30%, 说明这是一种有效和值得推广的提取纯化黑米中花色苷的工艺。从色谱图中我们可以看出, 黑米皮提取物中的花色苷除了主要的矢车菊定-3-葡萄糖苷外, 还有少量的芍药定-3-葡萄糖苷。

### 3.2 流动相的选择

在实验过程中, 尝试过用不同比例的流动相。结果发现当乙腈比例为20%时, 出峰时间过早, 与溶剂峰太近难以区分, 分离效果不好; 而当乙腈所占的比例为13%时, 虽然分离效果明显, 但出峰时间过长。经多次实验后, 得到前面所述的比较合适的磷酸乙腈的比例, 能有效的起到分离的效果。

### 3.3 如何评价物质中花色苷的含量

由于花色苷的种类繁多, 而且一般都是几种花色苷并存, 所以我们通常用总花色苷含量来评价某物质中花

色苷的多少。由于目前某些花色苷对照品并不易获得, 而且有时我们并不清楚某物质中花色苷的具体成分, 这时我们可以用最常见的矢车菊定-3-葡萄糖苷为对照品得到回归方程, 再根据各峰的总面积求出总花色苷的含量。这为今后科学评价花色苷的含量提供了一种切实可行的方法。

### 参考文献:

- [1] 孙玲, 张名位, 池建伟, 等. 黑米的抗氧化性及其与黄酮和种皮色素的关系[J]. 营养学报, 2000, 22(3): 246-249.
- [2] 肖湘, 卢刚, 张捷, 等. 黑色食品色素清除活性氧功效及抗氧化活性[J]. 药物生物技术, 2000, 7(2): 112-115.
- [3] 唐传核, 彭志英. 天然花色苷类色素的生理功能及应用前景[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2000, (1): 26-28.
- [4] 夏敏, 凌文华, 马静, 等. 黑米皮抗载脂蛋白E基因缺陷小鼠动脉粥样硬化形成及机制[J]. 中国动脉粥样硬化, 2002, 10(5): 414-417.
- [5] 吴三桥, 闵锁田, 李新生, 等. 黑米花青苷色素测定方法的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(4): 44-46.
- [6] 张晴. 黑米色素提取精制工艺的研究[J]. 青岛大学学报, 2000, 15(2): 24-26.