

糙米结合酚的分离纯化、结构表征及体外抗氧化活性

冯芝英^{1,2}, 张名位², 张瑞芬², 刘磊², 池建伟², 董丽红², 贾栩超²

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 本研究以糙米为材料, 通过碱解得到结合态酚粗提物, 采用多种色谱手段分离纯化得到4种单体物质, 通过高效液相色谱-质谱(LC-MS)、核磁共振(NMR)等波谱学方法鉴定其化学结构。4个单体化合物分别为6-羟基-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-羧酸甲酯(1)、4-羧甲氧基-6-羟基-2-喹诺酮(2)、4-羧基-6-羟基-2-喹诺酮(3)和2-(5-羟基-2-氧代吲哚-3-基)乙酸甲酯(4)。其中化合物1为新天然产物, 化合物2为首次从糙米中分离报道的。采用高效液相色谱(HPLC)对糙米结合酚提取物中4个单体成分的含量进行了测定, 其中化合物1含量最高, 为0.90 mg/g DW。同时以1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、铁离子还原能力(ferric reducing ability of plasma, FRAP)和氧自由基吸收能力(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)为指标评价4个单体的抗氧化活性。DPPH自由基清除能力最好的是化合物4, 其IC₅₀值为72.19 μM; FRAP法还原能力最强的是化合物2, FRAP值为249.60 mmol FeE/mol; ORAC法显示化合物3和4抗氧化能力最强, 分别为2.87和2.69 μmol TE/μmol。研究结果有助于推进对糙米结合酚的认知, 为糙米功效物质开发利用提供科学依据。

关键词: 糙米; 结合酚; 分离纯化; 结构鉴定; 生物碱; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2021)07-83-89

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.7.0040

Isolation, Structural Characterization and Antioxidant Activity of Brown Rice Bound Phenolics

FENG Zhi-ying^{1,2}, ZHANG Ming-wei², ZHANG Rui-fen², LIU Lie², CHI Jian-wei², DONG Li-hong², JIA Xu-chao²

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: Brown rice bound phenolics were extracted by alkaline hydrolysis and separated by multiple chromatographic methods. Four monomers were obtained and their structures were identified by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). The isolated compounds were elucidated as 6-hydroxy-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-4-carboxylic acid methyl ester (1), 4-carboxymethoxy-6-hydroxy-2-quinolone (2), 4-carboxyl-6-hydroxy-2-quinolone(3) and 2-(5-hydroxy-2-oxoindole-3-yl) acetate methyl ester (4). Compound 1 was a new natural product and compound 2 was reported from brown rice for the first time. The contents of four monomers were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and the content of compound 1 was the highest (0.9

引文格式:

冯芝英,张名位,张瑞芬,等.糙米结合酚的分离纯化、结构表征及体外抗氧化活性[J].现代食品科技,2021,37(7):83-89

FENG Zhi-ying, ZHANG Ming-wei, ZHANG Rui-fen, et al. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of brown rice bound phenolics [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 83-89

收稿日期: 2021-01-11

基金项目: 广东省重点研发计划项目(2020B020225004); 国家自然科学基金项目(31871798; 31972082); 广东特支计划本土创新创业团队项目(2019BT02N112); 广东省自然科学基金(2016A030312001); 科技创新战略专项资金-高水平农科院建设(R2017YJ-YB2006; R2018QD-081; R2018PY-JC002); 广东省农业科学院创新基金项目(202112)

作者简介: 冯芝英(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然活性物质

通讯作者: 贾栩超(1989-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然活性物质开发与利用

mg/g DW)。Antioxidant activity of four compounds was evaluated using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assays and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) methods, respectively. The strongest DPPH radical scavenging activity was compound 4, with the IC_{50} value being 72.19 μ M. Compound 2 exhibited the highest FRAP reducing activity, which was 249.60 mmol FeE/mol. ORAC method showed that compounds 3 and 4 had the best antioxidant capacity, which were 2.87 and 2.69 μ mol TE/ μ mol, respectively. These results will promote the cognition of brown rice bound phenolics. It can also provide scientific basis for the development and utilization of functional substances in brown rice.

Key words: brown rice; bound phenolics; separation and purification; structural identification; alkaloid; antioxidative activity

全谷物是指完整、碾成粉状、碎块状或压成片状的谷物颖果，其胚乳、胚芽和糠麸的比例与在完整颖果中的比例基本相同^[1]。流行病学研究表明，摄入全谷物食品具有预防多种慢性疾病的生理功效，如降低心血管疾病、肥胖症、2型糖尿病和结肠癌等风险^[2,3]。

糙米是稻谷仅经脱壳处理，保留米糠层和胚芽的大米，是一种典型的全谷物食品^[4]。糙米中除含有丰富的膳食纤维外，还含有生育酚、生育三烯酚、植物甾醇、 γ -谷维素和酚类物质等活性成分，其中酚类物质是糙米发挥健康效应的重要活性物质^[5,6]。糙米中的酚类物质主要以游离态、可溶酯化态和不溶结合态三种形式存在^[7]。蔬菜水果中只有24%的酚酸物质以结合态形式存在，而在糙米中这一比例高达88%^[8,9]。结合态酚由于其与膳食纤维共价结合，较难直接被释放出来，绝大多数关于酚酸的研究都集中在游离形式上，不溶性酚类物质常被忽视。相关研究已表明结合态酚具有很强的生物活性，包括抗氧化、益生菌、抗癌、抗炎、减肥、降糖等，对中枢神经系统疾病也有一定的治疗作用^[10,11]。课题组在前期研究中也发现，结合态酚类物质膳食干预可激活骨骼肌中IRS1/AKT/GLUT4胰岛素信号通路并改变肠道微生物群，从而导致糖尿病db/db小鼠的血糖水平降低^[12]。然而关于糙米结合态酚化学组成的研究，目前主要采用高效液相色谱和液相色谱-质谱分析等手段进行结构表征，已鉴定出的化合物包括阿魏酸、对香豆酸、香草酸、丁香酸、对羟基苯甲酸等单体酚酸和8-8'阿魏酸脱氢二聚体(8-8' diferulic acid, DFA)、5-5' DFA、8-O-4' DFA、8-5' DFA、8-8'芥子酸二聚体以及索马榆脂二酸等^[13-15]。也有研究对米糠结合酚进行分离纯化并鉴定了10个化合物，化合物的结构类型主要包括酚酸和甾醇类^[16]。糙米中结合酚类物质的化学组成仍有待进一步研究探索。

本研究通过碱水解法提取全谷物糙米结合酚，采用多种柱层析色谱分离手段对糙米结合酚提取物进行分离纯化，并借助高分辨质谱、核磁共振等波谱手段对分离得到的单体化合物进行结构表征；以分离得到的单体化合物为标准物质，通过高效液相色谱对米糠

结合酚提取物中的色谱峰进行指认和含量测定；并采用DPPH自由基清除法，FRAP和ORAC三种体外抗氧化方法来评价分离得到单体化合物的抗氧化活性，研究结果将有助于明确糙米结合酚化学物质构成，为糙米功效物质阐明和开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

本实验的糙米购自黑龙江金都米业有限公司，新鲜的糙米经粉碎、过80目筛，制得糙米粉，用塑料自封袋密封保存4℃冷库储藏备用。

1.1.2 试剂

实验中所用试剂二氯甲烷、甲醇、乙酸乙酯、盐酸、氢氧化钠等为天津江天化工有限公司生产，均为分析纯；HPLC级甲醇、乙酸和乙腈购自上海安谱公司；氘代甲醇、二甲基亚砜为美国剑桥公司生产；没食子酸为上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产；Trolox试剂、荧光素，DPPH(2,2-二苯基-1-苦基肼)，2,2'-偶氮(2-甲基丙脒)盐酸盐(AAPH)购自于美国Sigma公司。FRAP试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。柱层析硅胶(100~200目)为青岛海洋化工厂生产；反相硅胶Develosil ODS(粒径75 μ m)为日本富士化学公司产品；凝胶Sephadex LH-20为瑞典Amersham Biosciences公司生产。

1.1.3 仪器与设备

Waters515中压纯化系统(MPLC)，美国沃特斯公司；DPE-1250旋转蒸发器，日本东京理化公司；Tecan GENios酶标仪，瑞士Tecan有限公司；P3000半制备系统，北京创新通恒科技有限公司；LC2030 PLUS液相色谱仪，日本岛津公司；Cosmosil 5-C18 MS-II(4.6 \times 250 mm, 5 μ m)色谱柱，赛默飞世尔科技有限公司；YMC-Pack ODS-A(20 \times 250 mm, 5 μ m)色谱柱，日本YMC股份有限公司；MDS SCIEX APCI 2000 LC-MS-MS，美国Applied Biosystem/MDS Sciex公司；BSZ-100自动部份收集器，上海沪西分析仪器

公司; BrukerAVANCE HD 500 型超导核磁共振仪, 德国布鲁克公司; Bruker Bio TOF IIIQ MS, 德国布鲁克公司。

1.2 实验方法

1.2.1 全谷物糙米结合态酚粗提物提取

将 110 kg 糙米粉用 95%乙醇浸泡 (3 次, 每次 48 h) 去除游离酚, 再通过碱解提取结合酚, 即在去除游离态酚类物质后的沉淀物中加入 2 mol/L NaOH 溶液 (料液比 1:40), 充满氮气密封, 水浴振荡提取 2 h, 所得提取液用 6 mol/L HCl 溶液调节 pH 至 1, 然后用乙酸乙酯 (1:2) 萃取 5 次, 收集合并乙酸乙酯萃取相, 经旋转蒸发仪在 45 °C 条件下减压浓缩, 最终得结合态酚类物质提取物 52.1717 g。

1.2.2 全谷物糙米结合态酚粗提物的分离纯化

52.1717 g 粗提物经正相硅胶柱层析分离, 二氯甲烷/甲醇 (10:0~6:4) 梯度洗脱, 收集流份, 薄层色谱检查, 合并后得到组分 F2~16。F2 (16.1699 g) 经 MPLC 分离, 流速 10 mL/min, 甲醇/水 (4:6~10:0) 梯度洗脱, 流份经薄层色谱检查, 合并为 F2-1~14。F2-2 (0.7811 g) 经葡聚糖凝胶柱层析分离, 甲醇洗脱, 流份经薄层色谱检查, 合并为 F2-2-1~5, F2-2-4 (25.9 mg) 经 HPLC 纯化, 甲醇/水 (11:89) 为流动相, 流速 6 mL/min, 得到化合物 1 (t_R 75 min, 3.7 mg) 和化合物 4 (t_R 92 min, 4.2 mg)。F5-5 (0.5892 g) 经葡聚糖凝胶柱分离, 甲醇洗脱, 流份经薄层色谱检查, 合并得 F5-5-1~3, F5-5-3 (85 mg) 经 HPLC 纯化, 甲醇/水 (23:77) 为流动相, 流速 6 mL/min, 得到化合物 2 (t_R 102 min, 5.3 mg)。F6 (7.8679 g) 经 MPLC 分离, 流速 10 mL/min, 甲醇/水 (2:8→10:0) 梯度洗脱, 流份经薄层色谱检查, 合并为 F6-1~8。F6-3 (0.3925 g) 经葡聚糖凝胶柱分离, 甲醇洗脱, 流份经薄层色谱检查, 合并为 F6-3-1~2, F6-3-2 (14.8 mg) 经 HPLC 纯化, 甲醇/水 (28:72) 为流动相, 流速 6 mL/min, 得到化合物 3 (t_R 25 min, 7.2 mg)。

1.2.3 高效液相色谱条件

Agilent 1260 HPLC 系统 (配备 DAD 检测器) 和 Zorbax SB-C18 柱 (250×4.6 mm 内径, 5 μm, USA); 柱温为 40 °C, 流速为 1.0 mL/min, 其进样体积为 10 μL, 流动相包括溶剂 A (0.1%乙酸, V/V) 和溶剂 B (甲醇), 洗脱梯度为: 溶剂 B: 0~20 min, 10%~50%; 检测波长为 280 nm。将每个单体化合物作为标准物质, 分别配置成 6 个不同浓度 (100~3.125 μg/mL) 的标准溶液, 将标准溶液和样品溶液 (浓度为 0.5 mg/mL) 分别进样, 以标准溶液的浓度为横坐标, 相应

的峰面积为纵坐标绘制 4 个化合物的标准曲线, 然后根据峰面积外标法定量。

1.2.4 抗氧化活性测定

1.2.4.1 DPPH 自由基清除率测定

参考 PÍO-LEÓN 等^[17]的方法并稍作修改, 称取 4.00 mg DPPH 溶解于 100 mL 95%乙醇中, 即为 0.1 mmol/L 的 DPPH 工作液。将 4 个单体化合物进行梯度稀释, 得到不同浓度的样品溶液。取 50 μL 不同浓度的样品溶液与 150 μL DPPH 工作液充分混合, 室温避光反应 30 min, 在 517 nm 波长下测定吸光度 A_1 , 同时测定 50 μL 不同浓度的样品溶液与 150 μL 95%乙醇的吸光度 A_2 和 50 μL 95%乙醇与 150 μL DPPH 工作液的吸光度 A_0 , 以维生素 C 做阳性对照, 每个样品每个浓度重复 3 次。按下列公式计算 DPPH 自由基清除率, 同时求得清除率为 50% 时所需样品的浓度, 即 IC_{50} 值:

$$\text{清除率}/\% = \left[1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right] \times 100\%$$

其中: A_0 为 150 μL DPPH 工作液+50 μL 95%乙醇的吸光度; A_1 为 150 μL DPPH 工作液+50 μL 不同浓度的样品溶液; A_2 为 150 μL 95%乙醇+50 μL 不同浓度的样品溶液。

1.2.4.2 FRAP 总抗氧化能力测定

参照董丽红等^[18]的方法, 样品检测孔内加入 5 μL 待测样品溶液, 空白孔加入 5 μL 蒸馏水, 标准曲线检测孔加入 5 μL 不同浓度的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 标准溶液, 再向所有检测孔中加入现配的 FRAP 工作液 180 μL; 混匀, 37 °C 孵育 5 min 后, 于 593 nm 波长下测定吸光值, 根据标准曲线计算出样品的 FRAP 值。以 Trolox 为阳性对照, FRAP 结果以每 mol 化合物中所含的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 当量表示, 即 mmol $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ /mol。

1.2.4.3 ORAC 抗氧化能力测定

参考张名位等^[19]的方法, 先分别向空白孔加入 20 μL 75 mmol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液, 其余孔分别加入 20 μL 样品溶液、不同浓度的 Trolox 标准溶液 (6.25~50 μmol/L) 以及 17.5 μmol/L 的阳性对照没食子酸溶液; 孵育 10 min 后, 向所有孔加入 200 μL 0.96 μmol/L 荧光素钠工作液; 继续孵育 20 min 后, 除对照孔外, 每个孔加入 20 μL 119 mmol/L AAPH 溶液。最后将 96 孔板放入酶标仪中, 在激发波长 485 nm, 发射波长 520 nm 下测定各个孔的荧光值, 每 4.5 min 一次, 共循环 35 次。根据 Trolox 标准曲线计算样品的 ORAC 值, ORAC 值以每 μmol 样品中所含的 μmol Trolox 当量表示, 即 μmol TE/μmol。

1.2.5 数据分析

每组实验均重复 3 次, 实验结果以均数±标准差

表示。利用 SPSS 24 进行统计分析, 检验差异显著性 ($p < 0.05$ 表示差异显著)。

2 结果与讨论

2.1 化合物结构鉴定

2.1.1 化合物结构解析

运用 NMR、MS 波谱学方法并结合文献中的核磁数据对照, 鉴定出化合物 1~4 为生物碱类化合物, 结构如图 1 所示。

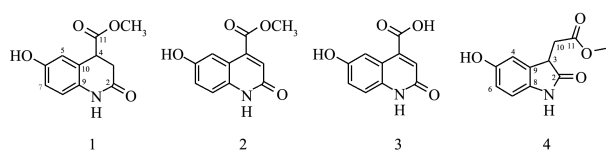


图 1 化合物 1~4 的化学结构

Fig.1 Chemical structures of compounds 1~4

化合物 1: 根据 HR-ESI-MS m/z 222.0757 $[M+H]^+$ (计算值 222.0761) 准分子离子峰确定分子量为 221, 分子式为 $C_{11}H_{11}NO_4$, 不饱和度为 7。核磁共振氢谱(表 1) 显示有 1 个芳环的 ABX 耦合信号 $\delta 6.76$ (1H, d, $J=2.6$ Hz, H-5)、6.73 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-8)、6.67 (1H, dd, $J=8.5, 2.6$ Hz, H-7); 1 个次甲基信号 $\delta 3.92$ (1H, dd, $J=6.6, 3.5$ Hz, H-4), 1 个亚甲基信号 $\delta 2.80$ (1H, dd, $J=16.4, 3.5$ Hz, H₂-3a) 和 2.73 (1H, dd,

$J=16.4, 6.6$ Hz, H₂-3b), 以及 1 个甲氧基信号 $\delta 3.68$ (3H, s, OCH₃)。核磁共振碳谱显示(表 1) 有 6 个芳环信号 ($\delta 154.6\sim 116.5$), 1 个亚甲基碳信号 $\delta 33.6$ (C-3), 1 个次甲基碳信号 $\delta 43.5$ (C-4), 2 个羰基碳信号 $\delta 173.8$ (C-11)、171.6 (C-2) 和 1 个甲氧基信号 $\delta 52.9$, 结合分子式中存在一个氮原子, 推断结构中存在于一个 2-喹诺酮母核^[20]。根据氢氢相关谱 ($^1H-^1H$ COSY) 和异核单量子相关谱 (HSQC) 谱将碳氢信号进行归属(图 2)。在异核多键相关谱 (HMBC) 谱中(图 1), H₂-3 与 $\delta 43.5$ (C-4)、122.9 (C-10)、171.6 (C-2) 和 173.8 (C-11) 相关, H₂-4 与 $\delta 33.6$ (C-3)、116.8 (C-5)、122.9 (C-10)、131.0 (C-10)、171.6 (C-2) 和 173.8 (C-11) 相关, OCH₃ 与 173.8 (C-11) 相关, 基于上述信息, 鉴定化合物 1 为 6-羟基-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-羧酸甲酯, 结构如图 1 所示, 该化合物为 1 个新天然产物。

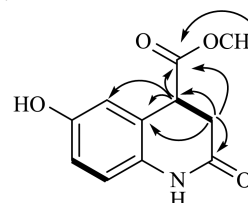


图 2 化合物 1 的 $^1H-^1H$ COSY (粗线)、HMBC (箭头) 相关信号
Fig.2 $^1H-^1H$ COSY (bold lines) and HMBC correlations (arrows) correlations of compounds 1

表 1 化合物 1~4 的 1H (500 MHz) 和 ^{13}C (125 MHz) NMR 数据

Table 1 1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR data of compounds 1~4

Position	1 ^a		2 ^b		3 ^b		4 ^a	
	δ_H mult (J in Hz)	δ_C	δ_H mult (J in Hz)	δ_C	δ_H mult (J in Hz)	δ_C	δ_H mult (J in Hz)	δ_C
2		171.6		160.1		160.5		181.1
3	2.73 dd (16.4, 6.6)	33.6	6.88 s	124.2	6.81 s	123.4	3.71 dd (7.7, 4.8)	43.8
	2.80 dd (16.4, 3.5)							
4	3.92 dd (6.6, 3.5)	43.5		116.2		116.7	6.72 d (8.3)	111.3
5	6.76 d (2.1)	116.8	7.49 d (2.1)	109.5	7.58 d (2.0)	110.0		154.3
6		154.6		152.4		152.4	6.64 dd (8.3, 2.5)	115.3
7	6.67 dd (8.5, 2.1)	116.5	7.08 dd (8.6, 2.1)	120.6	7.05 dd (8.5, 2.0)	120.4	6.74 d (2.5)	113.0
8	6.73 d (8.5)	117.9	7.24 d (8.6)	116.8	7.22 d (8.5)	116.8		135.9
9		131.0		138.9		140.8		131.6
10		122.9		132.8		132.9	2.79 dd (16.8, 7.7)	35.2
							3.01 dd (16.8, 4.8)	
11		173.8		165.9		167.1		173.1
OCH ₃	3.68 s	52.9	3.92 s	52.7			3.66 s	52.4

注: δ : chemical shift in ppm; J : coupling constant; s: singlet; d: doublet; dd: doublet of doublet; a: recorded in CD₃OD; b: recorded in DMSO-*d*₆。

化合物 2: 根据 HR-ESI-MS m/z 218.0463 [M-H]⁻ 准分子离子峰确定分子量为 219, 分子式为 C₁₁H₉NO₄, 不饱和度为 8。分子式与化合物 1 相比, 结构中少了两个氢原子。核磁共振氢谱和碳谱显示化合物 2 中有 1 个 1,3,4-三取代的苯环、1 个双键、两个羰基和 1 个甲氧基, 表现出了与化合物 1 类似的核磁共振信号, 进一步仔细比对两个化合物的核磁数据发现 (表 1), 化合物 2 中氮杂环的 2,3 位脱氢形成了双键, 化合物的分子式进一步佐证这一推断。与文献^[20]报道的数据进行比对, 最终确定化合物 2 为 4-羧甲氧基-6-羟基-2-喹诺酮, 结构如图 1 所示。该化合物之前从黑米中分离报道, 这是首次从糙米中分离报道该化合物。

化合物 3: 根据 HR-ESI-MS m/z 204.0303 [M-H]⁻ 和 m/z 205.0594 [M+H]⁺ 准分子离子峰确定分子量为 205, 分子式为 C₁₀H₇NO₄, 不饱和度为 8。分子式与化合物 2 相比, 结构中少了一个 CH₂。核磁共振氢谱和碳谱显示化合物 3 中同样有 1 个 1,3,4-三取代的苯环、1 个双键、两个羰基, 表现出了与化合物 1 类似的核磁共振信号 (表 1), 不同之处是化合物 3 中少了一个甲氧基的信号, 推测该化合物中 11 位是一个羧酸基团, 没有发生甲酯化取代。通过异核单量子相关谱 (HSQC) 和异核多键相关谱 (HMBC) 对化合物的数据进行归属。与文献^[21]报道的数据进行比对, 最终确定化合物 3 为 4-羧基-6-羟基-2-喹诺酮, 结构如图 1 所示, 这是首次报道该化合物在氘代二甲基亚砷中的核磁数据。

化合物 4: 根据 HR-ESI-MS m/z 220.0589 [M-H]⁻ 准分子离子峰确定分子量为 221, 结合核磁共振氢谱和碳谱推断该化合物的分子式为 C₁₁H₁₁NO₄, 不饱和度为 7。分子式与化合物 1 相同。核磁共振氢谱、碳谱结合异核单量子相关谱 (HSQC) 显示化合物 4 中有 1 个 1,3,4-三取代的苯环、1 个亚甲基、1 个次甲基、2 个羰基和 1 个甲氧基, 表现出了与化合物 1 类似的核磁共振信号 (表 1), 与文献^[21]报道的数据进行比对, 确定化合物 4 为 2-(5-羟基-2-氧代吡啶-3-基)乙酸甲酯, 结构如图 1 所示。

2.1.2 化合物的波谱数据

生物碱类是自然界中广泛存在的一大类活性天然产物, 结构类型丰富多样。本研究从全谷物糙米中分离得到的主要包括喹诺酮类 (1-3) 和吡啶类 (4)。化合物 1 为新天然产物, 未有相关研究报道其化学结构和核磁数据。Chung 等^[20]从黑米的糊粉层提取物中分离得到了化合物 3, 这是首次从糙米中报告该化合物。前人从米糠提取物中分离报道过化合物 2 和 4, 并推断这两个化合物是植物内源生长素 3-吡啶乙酸的代谢

产物^[21]。4 个化合物的波谱数据如表 1 所示。

2.2 单体化合物的定性定量分析

以分离得到的单体化合物 1~4 为标准物质, 通过 HPLC 对糙米结合酚提取物中的主要色谱峰进行指认, 结果如图 3 所示, 化合物 1~4 的保留时间分别为 13.02, 18.6, 8.6, 14.5 min。通过外标法对 4 个化合物的含量进行测定, 结果表明化合物 1~4 的含量分别为 0.19, 0.14, 0.17, 0.13 mg/g DW, 其中新天然产物化合物 1 含量最高。

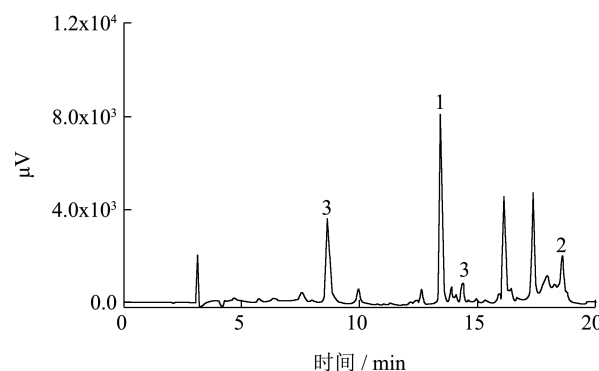


图 3 全谷物糙米结合态酚提取物的 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC chromatography of bound phenolics extract from whole grain brown rice

2.3 体外抗氧化活性评价

2.3.1 DPPH 自由基清除能力

表 2 各单体化合物的 DPPH 自由基清除率 IC₅₀ 值

Table 2 The IC₅₀ value of DPPH free radical scavenging rate of compounds 1~4

化合物	DPPH (IC ₅₀ μM)
1	>1200
2	805.67±9.5 ^c
3	>2000
4	72.19±3.45 ^b
Ascorbic acid	34.04±0.17 ^a

注: 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。下表同。

DPPH 可从抗氧化物中吸取质子失去发色基团, 其在 517 nm 波长处有较强的吸收, 通过吸光度的变化反映样品对自由基的清除能力, 从而推测其抗氧化性^[22]。IC₅₀ 值是对自由基清除率达 50% 时所需的样品有效剂量, IC₅₀ 值越小, 则自由基清除能力越强, 抗氧化性越好。如表 2 所示, 化合物 4 的 IC₅₀ 值最小, 表明其 DPPH 自由基清除能力显著高于其他 3 个化合物, 但比阳性对照 Vc 弱; 本研究中化合物 2 也表现出 DPPH 自由基清除活性, 这与 Chung 等报道的结果一致^[20]。然而化合物 1 和 3 未表现出 DPPH 自由基清除

活性, IC_{50} 均大于 1 mM。

2.3.2 FRAP 总抗氧化能力

表 3 各单体化合物的铁离子还原能力

化合物	FRAP (mmol FeE/mol)
1	17.69±0.5 ^a
2	249.60±3.19 ^d
3	211.01±1.74 ^c
4	109.83±3.34 ^b
Trolox	244.15±26.12 ^d

采用总抗氧化能力检测试剂盒 (FRAP 法) 对分离得到的 4 个单体化合物进行抗氧化活性测试, 结果表明化合物 1~4 具有一定的抗氧化活性, 其中, 化合物 2 的还原能力最强, 还原能力高达 249.60 mmol FeE/mol, 与阳性对照 Trolox 相当; 其它 3 个化合物活性均弱于阳性对照 ($p < 0.05$), 4 个单体的还原能力由大到小为: 化合物 2>3>4>1。FRAP 法重现性好, 操作简单且快速, 测定的是样品对高价态离子的还原能力, 测定过程中不包含活性氧, 因此, 并不能完全反映打破自由基链式反应或抗氧化剂阻断的抗氧化能力^[23]。

2.3.3 ORAC 抗氧化能力

ORAC 抗氧化属于经典的氢原子转移 (HAT) 机制, 是目前国际上常用的一种评价食品抗氧化能力的方法, 较一般的自由基清除法更准确灵敏^[24]。如表 4 所示, ORAC 氧自由基吸收能力测定结果表明化合物 2,3,4 有较强的抗氧化能力, 其活性均比阳性对照没食子酸强 ($p < 0.05$)。而化合物 1 ORAC 抗氧化能力最差 ($0.18 \pm 0.02 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$), 此结果与 DPPH 及 FRAP 结果一致, 表明化合物 1 是 4 个化合物中抗氧化活性最差的。

表 4 各单体化合物的 ORAC 值

化合物	ORAC/ $(\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol})$
1	0.18±0.02 ^a
2	2.32±0.15 ^c
3	2.87±0.18 ^d
4	2.69±0.15 ^d
Gallic acid	1.59±0.11 ^b

对比 3 种体外抗氧化活性结果, DPPH 自由基清除能力最好的是化合物 4, 其 IC_{50} 值为 $72.19 \pm 3.45 \mu\text{M}$; FRAP 抗氧化能力最强的是化合物 2, FRAP 值为 $249.60 \pm 3.19 \text{ mmol FeE/mol}$; ORAC 测定结果表明化合物 3 和 4 抗氧化能力最强。三种抗氧化方法的测定结果存在差异, 其可能的原因是不同抗氧化方法所采用

的自由基种类及测定原理不同。DPPH 和 FRAP 法是基于电子转移, 涉及还原有色氧化剂, 颜色变化的程度与样品的抗氧化剂浓度相关; ORAC 法基于氢原子转移, 涉及到抗氧化剂和底物竞争热产生的过氧自由基。FRAP 测定法与其他两种方法不同, 因为其不涉及自由基, 而是将三价铁 (Fe^{3+}) 还原为二价铁 (Fe^{2+}) 的过程; ORAC 方法中的自由基来源为 AAPH, 可产生出的过氧化自由基是人体内普遍存在的一种自由基, 是目前国际上常用的一种评价食品抗氧化能力的方法^[24,25]。因此, 为了科学评价化合物的抗氧化活性, 应该至少采用两种以上的抗氧化方法进行评价。

3 结论

通过多种柱层析手段结合波谱学方法共分离鉴定了 4 个化合物, 分别为 6-羟基-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-羧酸甲酯 (1), 4-羧甲氧基-6-羟基-2-喹诺酮 (2), 4-羧基-6-羟基-2-喹诺酮 (3) 和 2-(5-羟基-2-氧代吡啶-3-基)乙酸甲酯 (4), 其中化合物 1 为新天然产物, 化合物 2 为首次从糙米中分离报道。4 个单体化合物中化合物 1 含量最高, 为 0.19 mg/g DW 。分离得到的 4 个单体化合物均表现出了一定的抗氧化活性。糙米结合酚提取物中除了已报道的酚酸类、黄酮类和甾醇类之外, 还含有生物碱类活性物质。

参考文献

- [1] 谭斌,汪丽萍,刘明,等.用全谷物大思路推动我国杂粮加工业的发展(上)[J].粮食与食品工业, 2011,18(3):1-3
TAN Bin, WANG Li-ping, LIU Ming, et al. Promoting special grain development with whole grain concept [J]. Cereal and Food Industry, 2011, 18(3): 1-3
- [2] Călinoiu L F, Vodnar D C. Whole grains and phenolic acids: a review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability [J]. Nutrients, 2018, 10: 1-31
- [3] Reynolds A, Mann J, Cummings J, et al. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses [J]. The Lancet, 2019, 393(10170): 434-445
- [4] 杨冰,王德华,郑艳萍.发芽糙米制备工艺及发芽设备的研究现状[J].食品工业,2017,38(6):232-234
YANG Bing, WANG De-hua, ZHENG Yan-ping. Research status of preparation technology and sprout equipment of germinated brown rice [J]. The Food Industry, 2017, 38(6): 232-234
- [5] YE Ling-xu, ZHOU Su-mei, LIU Li-ya, et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of brown rice in China [J]. International Journal of Food Engineering, 2016, 12(6):

- 537-546
- [6] Ravichanthiran Y, Ma Z F, Zhang H, et al. Phytochemical profile of brown rice and its nutrigenomic implications [J]. *Antioxidants*, 2018, 7(71): 1-16
- [7] YU Li-lei, LI Guang-lei, LI Mei, et al. Genotypic variation in phenolic acids, vitamin E and fatty acids in whole grain rice [J]. *Food Chemistry*, 2016, 197: 776-782
- [8] Zhou Z K, Robards K, Helliwell S, et al. The distribution of phenolic acids in rice [J]. *Food Chemistry*, 2004, 87: 401-406
- [9] Acosta-Estrada B A, Gutiérrez-Urbe J A, Serna-Saldívar SO. Bound phenolics in foods, a review [J]. *Food Chemistry*, 2014, 152: 46-55
- [10] WANG Zhen-yu, LI Shi-yang, GE Sheng-han, et al. Review of distribution, extraction methods, and health benefits of bound phenolics in food plants [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68: 3330-3343
- [11] SHI Jiang-ying, SHAN Shu-hua, LI Han-qing, et al. Anti-inflammatory effects of millet bran derived-bound polyphenols in LPS-induced HT-29 cell via ROS/miR-149/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 74582
- [12] ZHANG Xin-wen, DONG Li-hong, JIA Xu-chao, et al. Bound phenolics ensure the antihyperglycemic effect of rice bran dietary fiber in *db/db* mice via activating the insulin signaling pathway in skeletal muscle and altering gut microbiota [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(15): 4387-4398
- [13] DING Chao, LIU Qiang, LI Peng, et al. Distribution and quantitative analysis of phenolic compounds in fractions of Japonica and Indica rice [J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 384-391
- [14] ZHANG Hong-cheng, SHAO Ya-fang, BAO Jin-song, et al. Phenolic compounds and antioxidant properties of breeding lines between the white and black rice [J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 630-639
- [15] QIU Yang, LIU Qin, Beta T. Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121: 140-147
- [16] WANG Wei, GUO Jia, ZHANG Jun-nan, et al. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran [J]. *Food Chemistry*, 2015, 171: 40-49
- [17] Pío-león J F, Montes-Avila J, Lopez-Angulo G, et al. Melanins of *Vitex mollis* fruit with differences in water-solubility show high inhibition of carbohydrate digestive enzymes and antioxidant activity [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2018, 42(3): 1-10
- [18] 董丽红,张瑞芬,肖娟,等.荔枝果肉不同酚类成分群的分离及其抗氧化活性[J].*中国农业科学*,2016,49(20):4004-4015
DONG Li-hong, ZHANG Rui-fen, XIAO Juan, et al. Separation and antioxidant activity of different phenolic compound fractions from litchi pulp [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(20): 4004-4015
- [19] ZHANG Ming-wei, ZHANG Rui-fen, ZHANG Fang-xuan, et al. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58: 7580-7587
- [20] Chung H S, Woo W S. A quinolone alkaloid with antioxidant activity from the aleuronelayer of anthocyanin-pigmented rice (*Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo*) [J]. *Journal of Natural Products*, 2001, 64: 1579-1580
- [21] Kinashi H, Suzuki Y, Takeuchi S, et al. Possible metabolic intermediates from IAA to β -acid in rice bran [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1976, 40(12): 2465-2470
- [22] 彭长连,陈少薇,林植芳,等.用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力[J].*生物化学与生物物理进展*,2000,6: 658-661
PENG Chang-lian, CHEN Shao-wei, LIN Zhi-fang, et al. Detection of antioxidative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2000, 6: 658-661
- [23] 郑必胜,李会娜.金银花叶有效成分的抗氧化活性研究[J].*现代食品科技*,2013,29(12):2870-2876
ZHENG Bi-sheng, LI Hui-na. Antioxidant activity constituents of *Lonicera japonica* leaves [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(12): 2870-2876
- [24] Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57: 1768-1774
- [25] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19: 669-675