

Analysis of Phenolic Compounds in Developing Seeds of *Brassica napus**

Yanlin Shao, Yanan Gao, Yueqin Kong, Jinjin Jiang, Youping Wang[#]

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Jiangsu Yangzhou
Email: [#]wangyp@yzu.edu.cn

Received: Apr. 10th, 2013; revised: Apr. 20th, 2013; accepted: May 4th, 2013

Copyright © 2013 Yanlin Shao et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Phenolics are abundant in seeds of *Brassica napus*, mainly including hydroxycinnamic acid derivatives, proanthocyanidins (PAs) and flavonoid derivatives. Different research methods have been reported by researchers. In this research, both chemical analysis and HPLC-ESI/MS² analysis were conducted to compare the different compositions of soluble phenolics in embryo and seed coat of *B. napus*. The extraction parameters were also optimized by comparing single factors like extraction temperature and solvent. And the results showed that room temperature and solvent of 80% acetone yielded the maximum phenolics. Further comparison showed that total phenolics and flavonoids in seed coat were much higher than in embryo of immature seeds. Among the identified phenolics, flavonoid and proanthocyanidin in seed coat were higher than in embryo, whereas derivatives of hydroxyl-cinnamic acid were lower accumulated in seed coat than embryo. Sinapine, as the most abundant phenolics, was mainly existed in embryo. And epicatechin was abundant in seed coat, which was well known as the most abundant flavonoids.

Keywords: *Brassica napus* L.; Phenolics; Extraction Efficiency; HPLC-ESI/MS²; Proanthocyanidins; Flavonoids

甘蓝型油菜未成熟种子多酚的研究*

邵彦林, 高亚楠, 孔月琴, 蒋金金, 王幼平[#]

扬州大学生物科学与技术学院, 扬州
Email: [#]wangyp@yzu.edu.cn

收稿日期: 2013年4月10日; 修回日期: 2013年4月20日; 录用日期: 2013年5月4日

摘要: 甘蓝型油菜种子含有大量的多酚物质, 主要是羟基苯丙烯酸衍生物、原花色素和类黄酮衍生物, 不同研究者对多酚物质的研究方法各异。本文使用化学分析和 HPLC-ESI/MS² 分析, 首先研究了不同溶液在不同温度下对油菜籽多酚物质萃取效率的影响, 发现 80% 的丙酮水溶液在室温条件下对油菜籽多酚的萃取效率最高。进一步对未成熟种子种皮和胚多酚物质进行研究, 发现总酚和总类黄酮含量种皮明显高于胚。多酚物质中, 种皮类黄酮和原花色素的含量要高于胚, 但羟基苯丙烯酸衍生物的含量要低于胚。芥子碱是油菜籽中含量最丰富的多酚物质, 主要存在于胚当中。而表儿茶素是含量最丰富的类黄酮物质, 主要存在于种皮当中。

关键词: 甘蓝型油菜; 多酚物质; 萃取效率; HPLC-ESI/MS²; 原花色素; 类黄酮

*基金项目: 国家自然科学基金(31171581)和高等学校博士学科点专项科研项目(20123250110009)资助。

[#]通讯作者。

1. 引言

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是重要的油料作物,面积仅次于大豆^[1]。油菜饼粕是重要的蛋白质来源,可作为动物饲料,含有大量氨基酸、蛋白质和糖类,但同时也含有大量的多酚物质,多酚物质的存在会导致油菜种皮变黑,油菜饼粕具有苦味和涩味,从而影响油菜饼粕的营养价值^[2]。油菜种子中存在的羟基苯丙烯酸衍生物主要有芥子酸、芥子碱、阿魏酸和咖啡酸等,以及它们形成的糖苷^[3-5]。原花色素是由黄烷醇类物质通过碳-碳键相连聚合而成的低聚体和多聚体,油菜中的原花色素都是由表儿茶素聚合而来^[6],我们实验室 Jiang 等^[7]发现油菜籽中的可溶性原花色素主要是表儿茶素的二聚体和三聚体。类黄酮是一类植物次生代谢产物,一般具有抗氧化活性、抗致癌性和抗诱变作用^[8-10]。油菜籽中常见的类黄酮主要有黄酮醇类和黄烷醇类。黄酮醇类(主要是槲皮素、山萘酚和异鼠李素)主要以糖基化和酰基化的衍生物存在。连接的糖主要是葡萄糖和槐糖,连接的酰基主要是芥子酰、阿魏酰和咖啡酰等^[6,11]。黄烷醇类主要是表儿茶素,它们比较特殊,一般不会形成糖苷,单体分子常常聚合形成种皮中的主要色素相关物质——原花色素^[12]。此外,油菜籽中还含有其它一些多酚物质,如没食子酸、原儿茶酸和羟基苯甲酸等^[13]。

对于植物组织多酚物质的提取,不同植物使用不同的溶剂和温度。如 Jasinski 等^[14]使用 80%甲醇水溶液在室温条件下提取蒺藜苜蓿叶片中的类黄酮, Nie 等^[15]使用 80%的乙醇水溶液在 80℃条件下提取桑树叶片的总类黄酮, Sarina 等^[16]使用 80%丙酮水溶液在室温条件下提取金缕梅叶片的总酚, Augar 等^[6]使用甲醇/丙酮/水的混合溶液在 4℃条件下提取发育过程中油菜种皮的类黄酮物质,而刘秦等^[5]使用甲醇水溶液在室温条件下提取成熟油菜籽多酚物质。不同的萃取溶液和萃取温度都会影响多酚物质的萃取效率,因此寻找合适的萃取溶液和萃取温度对于油菜籽多酚物质的研究十分重要。

为了选育多酚含量低的优质油菜,需要对种子胚和种皮中多酚物质的含量和种类进行分析。目前对于油菜种子胚和种皮多酚的研究大多集中在成熟种子(去皮油菜饼粕和籽壳),但成熟种子多酚物质往往和蛋白、多糖等结合形成不溶性物质^[17],这对成熟种子

多酚物质的萃取和研究带来一定的困难。Auger 等^[6]首次研究了黑籽油菜发育过程中种皮原花色素和类黄酮含量的变化。本文首先通过对油菜籽多酚物质萃取条件进行比较研究,通过化学分析法和 HPLC-ESI/MS² 分析法,研究了未成熟油菜种子胚和种皮多酚物质的组成差异。

2. 材料和方法

2.1. 实验材料

将甘蓝型油菜“扬油 6 号”(黑籽)种植在扬州大学实验田中,授粉 5 周后采集角果(Jiang 等^[7]的研究结果表明授粉 5 周后的油菜籽总酚含量达到最大,并且这一时期种皮与胚的分离较为容易),每株采集 3~5 个角果,手工剥离种子,准确称量 1 g 种子(湿重种子)。

2.2. 化学试剂

甲醇、乙醇、丙酮、碳酸钠、单宁酸、氢氧化钠、亚硝酸钠和六水合氯化铝均为分析纯,购自上海生工生物工程有限公司。Folin-Ciocalteu 试剂、表儿茶素、Procyanidin B₂ 和异鼠李素-3-O-葡萄糖苷购自美国 Sigma 公司。甲酸、乙腈为色谱纯,购自美国 Tedia 公司。水为 Milli-Q 系统纯化的水。

2.3. 实验方法

2.3.1. 样品多酚物质的提取

多酚物质的提取参考 Auger 等^[6]的方法略有改动。取准确称量的 1 g 样品置于研钵中,研磨 5 min 后加入 5 mL 萃取溶液(分别为:80%的甲醇水溶液、80%的乙醇水溶液、80%的丙酮水溶液和甲醇/丙酮/水(40:40:20, v/v/v),在特定温度下(室温和 80℃水浴)超声波裂解 15 min。然后室温离心(19,000 g, 5 min)并收集上清,将沉淀重悬于 5 mL 上述溶液中,放置在摇床上 25℃过夜(200 rpm),然后再次室温离心(19,000 g, 5 min),合并 2 次上清液,氮吹除去有机溶剂,用水定溶至 4 mL(以下称为多酚物质提取液),储存在 -70℃待测。每个样品重复 3 次。为了研究超声裂解温度对萃取效率的影响,不同溶液的超声裂解分别在 2 种不同温度(室温和 80℃水浴)条件下进行。为了研究未成熟种子种皮和胚多酚物质的差异,分别取 1 g 分离的种皮和胚,提取各自的多酚物质。

2.3.2. 可溶性总酚含量的测定

多酚萃取液中总酚含量的测定使用 Folin-Ciocalteu 分析法, 参考 Eynck 等^[18]的方法略有改动。取上述多酚物质提取液 100 μL , 加入 300 μL 的水和 400 μL 的 Folin-Ciocalteu 试剂, 室温反应 3 min 后加入 400 μL (1 mol/L) 的碳酸钠水溶液, 震荡、混匀, 室温放置 45 min, 然后取上述反应溶液 1 mL, 用水稀释 10 倍, 使用 752 型紫外可见分光光度计在 725 nm 下测定吸光度。用单宁酸做标准曲线, 求出每克湿重种子所含可溶性总酚的毫克数, 可溶性总酚的含量用等量的单宁酸表示。

2.3.3. 可溶性总类黄酮含量的测定

可溶性总类黄酮含量的测定参考 Faudale 等^[19]的方法。取 1 mL 的多酚物质提取液加入 5 mL 的水和 0.3 mL 5% 的亚硝酸钠水溶液, 室温反应 6 min, 然后加入 0.6 mL 10% 的六水氯化铝水溶液, 室温反应 5 min, 最后加入 2 mL (1 mol·L⁻¹) 的氢氧化钠水溶液, 用水定容至 10 mL, 用 752 型紫外可见分光光度计在 510 nm 下立即测定吸光度。用表儿茶素标准品做标准曲线, 求出每克湿重种子所含可溶性总类黄酮的毫克数, 可溶性总类黄酮的含量用等量的表儿茶素表示。

2.3.4. HPLC-ESI/MS² 分析

在 HPLC-ESI/MS² 分析前先将提取液用聚四氟乙烯滤膜(0.45 μm)过滤。高效液相色谱仪为 Agilent 1200, 色谱仪包括在线脱气装置(G1322A)、级联泵(G1311A)、自动进样器(G1329A)和 DAD 检测装置(G1315D)。10 μL 样品通过 C18 保护柱(2.0 \times 4 mm, 3.5 μm ; Phenomenex)在 XB-C18 色谱柱(2.1 \times 150 mm, 3.5 μm ; Welch, Ultimate)中进行分离。流速为 0.3 mL·min⁻¹, 柱温箱为 30 $^{\circ}\text{C}$, DAD 检测波段为 190~800 nm。流动相 A 为 0.1% 的甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 的甲酸乙腈溶液。洗脱梯度见表 1。

质谱分析仪使用 Agilent 6460 三重串联四级杆质谱仪, 离子源为电喷雾离子源(ESI), 在正负离子模式下检测。仪器参数如下: 干燥气温度为 300 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流量为 10 L·min⁻¹, 雾化器压力为 15 psi, 鞘气(使用 N₂ 作为鞘气)流速为 7 L·min⁻¹, 鞘气温度为 250 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压为 4000 V, 喷雾电压为 500 V, 全扫描质荷比(m/z)在 90~2000 范围, 扫描时间为 500 ms。可溶

Table 1. The chromatographic elution gradient
表 1. 色谱洗脱梯度

| 时间(min) T(min) | 流动相 A(%) Mobile phase A(%) | 流动相 B(%) Mobile phase B(%) |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 | 94 | 4 |
| 40 | 80 | 20 |
| 60 | 65 | 35 |
| 61 | 0 | 100 |
| 76 | 0 | 100 |
| 77 | 94 | 4 |
| 86 | 96 | 4 |

性多酚物质首先在全扫描模式下检测, 为了进一步确定化合物的结构, 挑选特定质荷比的离子进行二级质谱分析, 碰撞气为氮气, 根据分子大小设置碰撞电压在 15~40 V 之间。仪器控制软件为 Agilent Masshunter Workstation Data Acquisition, 数据分析软件为 Agilent Masshunter Qualitative Analysis。化合物分子离子峰([M-H]⁻和[M+H]⁺)提取离子色谱图(EIC)的峰面积被用作定量分析。为了比较种皮多酚物质和胚多酚物质含量的差异, 求出每克湿重种皮所含多酚和胚多酚的微克数。

3. 结果与分析

3.1. 不同溶剂和不同温度对油菜种子多酚物质萃取效率的影响

本实验设计了 2 个不同温度, 即室温和 80 $^{\circ}\text{C}$, 在每个温度段都进行了 4 种溶液萃取效率的比较。从图 1 可以看出, 在室温条件下, 丙酮水溶液对油菜种子多酚物质的萃取效率要明显高于甲醇和乙醇的水溶液, 萃取效率略低于混合溶液。而在 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 丙酮水溶液的萃取效率明显高于其它 3 种溶液。而对于种子类黄酮的萃取, 无论是在室温条件还是在 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件, 丙酮水溶液的萃取效率都明显高于其它 3 种溶液的萃取效率(图 1(b))。在高温(80 $^{\circ}\text{C}$)条件下, 丙酮水溶液对总酚和总类黄酮的萃取效率都有所增加, 但甲醇、乙醇和混合溶液的萃取效率反而降低。太高的温度有可能会引起类黄酮等多酚物质的氧化, 反而会降低萃取效率; 同时, 高温条件下有机溶剂的挥发也是一个不能忽略的问题。

在室温条件下, 丙酮水溶液的萃取效率明显高于

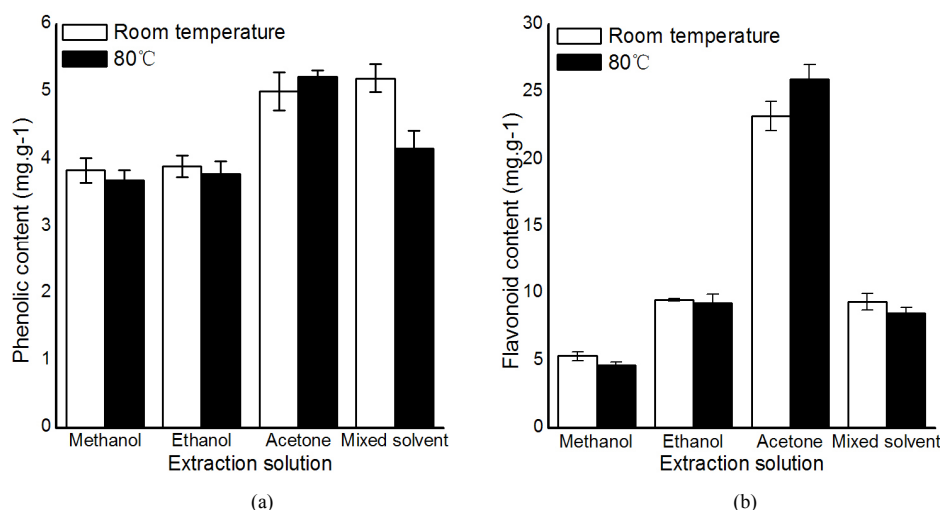


Figure 1. Variation of phenolic contents extracted by different solvents at room temperature and 80°C: (a) Total phenolics extracted by four solvents at room temperature and 80°C; (b) Total flavonoids extracted by four solvents at room temperature and 80°C
图 1. 不同温度下 4 种溶液萃取多酚物质含量的比较: (a) 不同温度下 4 种溶液萃取总酚的含量; (b) 不同温度下 4 种溶液萃取总类黄酮的含量

甲醇和乙醇, 略低于混合溶液。在高温条件下, 丙酮水溶液的萃取效率均高于其它 3 种溶液。同时, 丙酮相对于甲醇具有较低的毒性, 使用更为安全。因此我们选择 80%丙酮水溶液进行油菜种子多酚物质的萃取。在多酚萃取的超声波裂解过程中, 超声波与溶液作用会使溶液温度升高, 但温度不会升高至 80°C, 适当的高温可以提高溶液的萃取效率, 同时又不会造成大量多酚物质的氧化。所以, 我们选择在室温条件下用 80%丙酮水溶液进行多酚的萃取, 超声裂解时不需要控制温度, 这样既简化了操作步骤, 又保持了较高的萃取效率。

3.2. 油菜种子种皮和胚多酚物质的分析

为了比较未成熟种子种皮和胚多酚物质含量和种类的差异, 首先需要确定种子中主要的多酚物质种类。表 2 列出了油菜种子中主要多酚物质的色谱峰、色谱保留时间, 紫外最大吸收波长, 去质子化/质子化 ($[M-H]^-/[M+H]^+$) 分子离子的质荷比(m/z)和各分子离子裂解产生的子离子质荷比。确认了主要的 4 种羟基苯丙烯酸衍生物, 5 种原花青素低聚体和 6 种类黄酮化合物。发现种子主要含有大量芥子碱、黄烷-3-醇单体和黄烷-3-醇的低聚体, 同时含有大量的黄酮醇类化合物, 包括山萘酚和异鼠李素的糖基化和酰基化产物。

分离种皮和胚, 使用化学分析法和 HPLC-ESI/

MS²法研究种皮和胚多酚物质含量的差异。首先通过化学分析法测定萃取液所含总酚和总类黄酮的含量, 从图 2 可以看到, 未成熟种子种皮中的总酚和总类黄酮含量明显高于胚。将胚和种皮的萃取溶液进行 HPLC-ESI/MS² 分析, 通过与种子萃取物色谱质谱结果对比, 确定主要色谱峰代表的物质, 然后使用提取离子色谱图(EIC)进行定量, 使用各种标准品确定主要多酚物质的含量(见表 3)。结果可以看出, 油菜种子胚和种皮中可溶性多酚物质种类组成基本一致, 但各种多酚物质的含量差异较大。种子胚中羟基苯丙烯酸衍生物的含量要远远高于种皮, 芥子碱是种子胚中含量最多的一种多酚物质, 也是种子中含量最多的一种多酚物质。对于其它的多酚物质, 如构成原花色素的前体表儿茶素、表儿茶素低聚体和类黄酮的含量种皮明显高于胚。发现种皮中含量最多的类黄酮物质是构成原花色素的前体物质表儿茶素。而其他含量较多的类黄酮物质, 如异鼠李素和山萘酚等主要以糖基化和酰基化的形式存在。

比较种皮和胚中几种主要类黄酮物质的含量, 可以发现种皮类黄酮含量是胚类黄酮含量的几十倍到上百倍。但某些含量较少的类黄酮物质却是种皮低于胚。通过种皮和胚萃取物的紫外吸收图谱(图 3)可以看出, 胚中类黄酮类物质很少。种皮中明显存在的吸收峰 2、3、4 和 5 对应的是表儿茶素二聚体(PB2)、表儿茶素单体、表儿茶素三聚体和表儿茶素四聚体, 在胚

甘蓝型油菜未成熟种子多酚的研究

Table 2. Main phenolic compounds identified by HPLC-ESI/MS² analysis in seeds of *B. napus*
表 2. HPLC-ESI/MS² 分析油菜种子萃取物确定的主要多酚物质

| 紫外峰 Peak | 化合物名称 Compound names | 保留时间 (min) Rt(min) | 最大紫外 吸收波长(nm) UV(nm) | 分子离子质荷比 (m/z) Mass spectrum (m/z) | | 子离子质荷比(m/z) MS ² [M-H] ⁻ (m/z) | 子离子质荷比(m/z) MS ² [M+H] ⁺ (m/z) |
|-------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------|---|---|
| | | | | [M-H] ⁻ | [M+H] ⁺ | | |
| 1 | 芥子碱 | 21.601 | 240, 330 | | 310.2 | - | 119,175, 207,251 |
| 2 | Procyanidin B ₂ | 23.405 | 202, 280 | 577 | | 407, 289, 425, 451, 125 | - |
| 3 | 表儿茶素 | 25.772 | 204, 217, 280 | 289 | | 203, 109, 245, 205, 125, 151 | - |
| 4 | 表儿茶素三聚体 | 29.602 | 202, 281 | 865.3 | | 577, 695, 424, 287, 451, 739 | - |
| 5 | 表儿茶素四聚体 | 31.405 | 202, 281 | 1153.4 | | 287, 414, 125, 577, 983 | - |
| - | 顺是芥子酸 | 33.126 | - | 223 | | 149, 193, 121, 164, 207 | - |
| 8 | 异鼠李素二己糖苷 | 34.144 | 202, 269, 350 | 639.2 | | 315, 477 | - |
| - | 山奈酚二己糖苷 | 35.643 | - | 609 | | 319, 429, 284 | - |
| - | 反式芥子酸 | 36.001 | - | 223 | | 149, 193, 121, 164, 207 | - |
| - | 山奈酚芥子 酰三己糖苷 | 37.164 | - | 977 | | 653, 285, 477, 191, 353, 815 | - |
| - | 异鼠李素芥子 酰三己糖苷 | 37.773 | - | 1007 | | 477, 315, 683, 353, 845 | - |
| 15 | Procyanidin B ₅ | 39.294 | 202, 281 | 577 | | 407, 424, 289, 451 | - |
| 17 | 表儿茶素三聚体 | 40.120 | 202, 281 | 865.3 | | 587, 287, 695, 407, 451, 739 | - |
| - | 异鼠李素己 糖苷硫酸酯 | 40.772 | - | 557 | | 477, 315 | - |
| - | 1,2-二芥子酰葡萄糖 | 51.595 | - | 591.2 | | 223, 367, 205 | - |

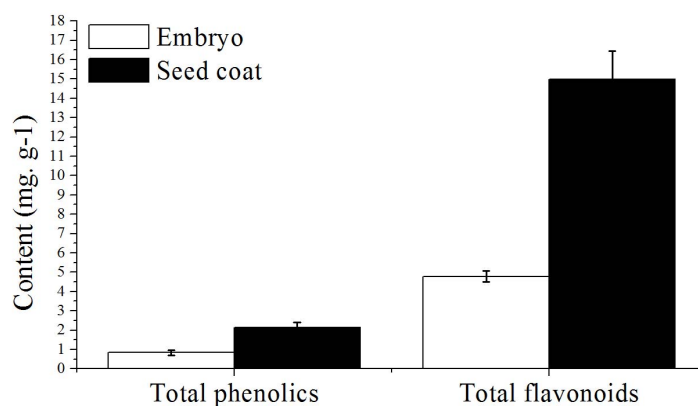


Figure 2. Content of total phenolics and total flavonoids in seed coat and embryo
图 2. 种皮和胚中总酚与总类黄酮的含量

Table 3. The content of phenolic compounds in embryo and seed coat of *Brassica napus*
表 3. 多酚物质在胚和种皮中的含量

| 酚类化合物 Phenolic compounds | 种皮中含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) Seed coat content($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) | 胚中含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) Embryo content($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) |
|-----------------------------|--|--|
| 芥子碱 | 427.56 ± 221.37 | 3368.64 ± 204.96 |
| 顺式芥子酸 | 1.47 ± 0.12 | 1.59 ± 0.51 |
| 反式芥子酸 | 8.34 ± 2.37 | 21.03 ± 3.93 |
| 1,2-二芥子酰葡萄糖 | 2.13 ± 0.24 | 10.98 ± 0.66 |
| 表儿茶素 | 1448.85 ± 100.62 | 83.97 ± 12.57 |
| 表儿茶素二聚体(PB2) | 414.21 ± 4.23 | 4.53 ± 1.23 |
| 表儿茶素三聚体(保留时间短) | 325.95 ± 16.02 | 10.29 ± 4.77 |
| 表儿茶素四聚体 | 107.04 ± 16.86 | 3.9 ± 0.75 |
| 表儿茶素三聚体(保留时间长) | 62.16 ± 13.83 | 3.51 ± 1.83 |
| 表儿茶素二聚体(PB5) | 91.47 ± 1.71 | 4.98 ± 2.97 |
| 异鼠李素二己糖苷 | 58.77 ± 9.75 | 4.62 ± 0.69 |
| 山奈酚芥子酰三己糖苷 | 3.48 ± 0.24 | 11.43 ± 0.81 |
| 异鼠李素芥子酰三己糖苷 | 6.57 ± 1.65 | 1.29 ± 1.11 |
| 山奈酚二己糖苷 | 1.71 ± 0.3 | 59.73 ± 2.97 |
| 异鼠李素己糖硫酸酯 | 55.47 ± 14.25 | 1.59 ± 0.36 |

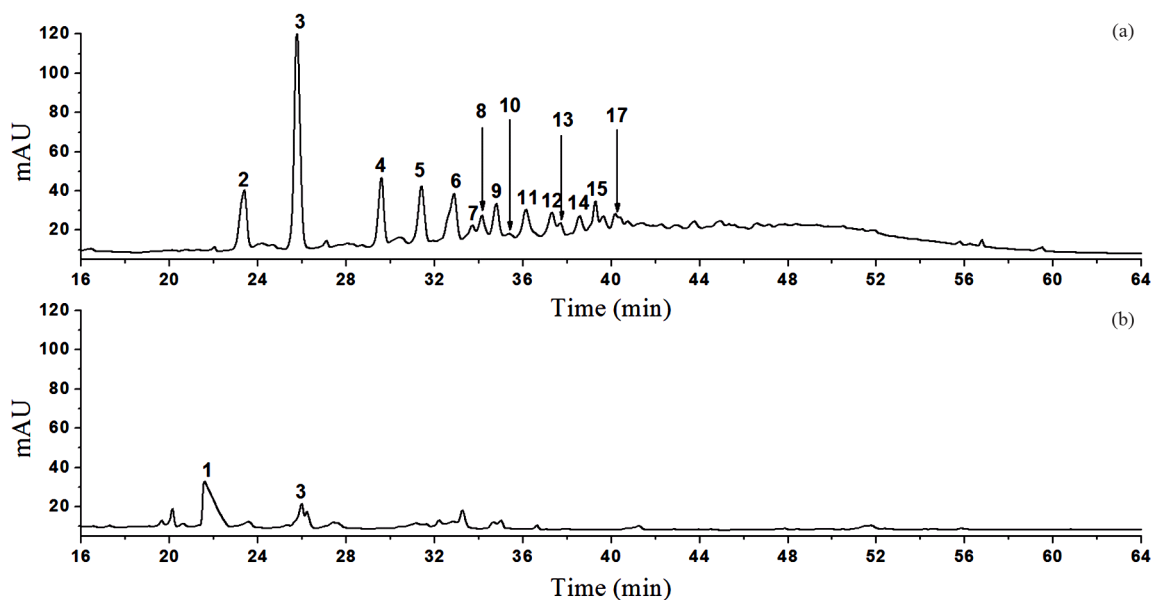


Figure 3. UV chromatogram of soluble phenolics in seed coat and embryo: (a) UV chromatogram of soluble phenolics in seed coat; (b) UV chromatogram of soluble phenolics in embryo

图 3. 种皮和胚可溶性多酚物质的紫外吸收图谱: (a) 种皮可溶性多酚物质的紫外吸收图谱; (b) 胚可溶性多酚物质的紫外吸收图谱

中几乎没有这几种物质的紫外吸收,说明这几种物质在胚中的含量很少。一些未知的色谱峰(6、7、9),通过 DAD 检测、二级质谱分析,初步确定为类黄酮的衍生物,例如 6、7 和 9 三个峰都有典型的原花色素

紫外吸收特性(图 4),它们在 202 nm 和 280 nm 处都有强的紫外吸收峰。这些物质在种皮中大量存在,但在胚中含量很少。胚中大量存在的芥子碱对应紫外吸收峰 1,可以看到种皮中相应保留时间的吸收峰很小。

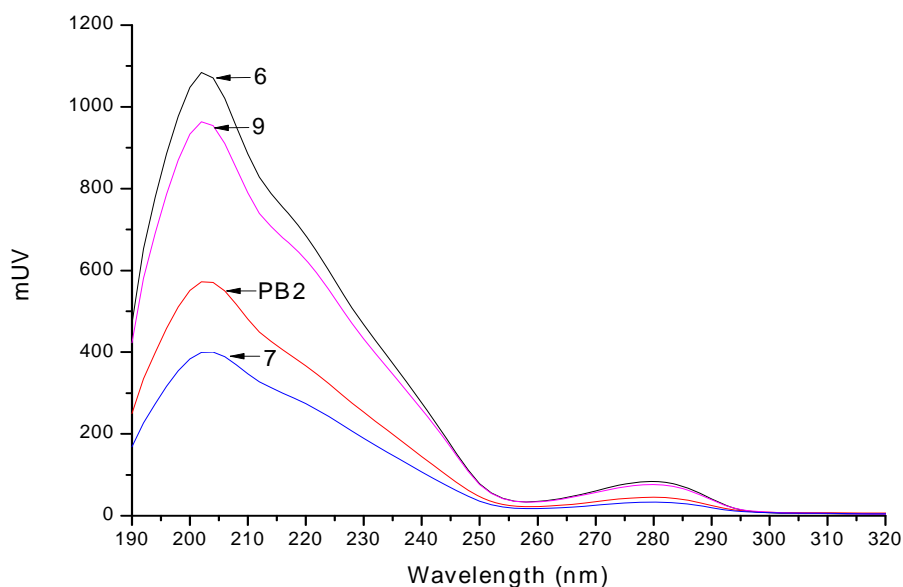


Figure 4. UV absorption characteristics of chromatograms of chemical 6, 7, 9 and Procyanidin B₂ (PB2)
图 4. 色谱峰 6、7、9 及标准品 Procyanidin B₂(PB2)的紫外吸收特性

以上实验结果表明, 授粉5周后的油菜种子总酚含量和总类黄酮种皮明显高于胚, 未成熟种子中不同的多酚物质在种皮和胚中的分布存在很大差异。种皮中存在的主要是类黄酮和原花色素, 并且含量远远高于胚中的含量, 其中含量最高的是表儿茶素。胚中主要存在的是羟基苯丙烯酸衍生物, 其中含量最多的芥子碱也是种子中含量最多的多酚物质。因此, 我们在分析发育过程中油菜种子色素合成相关物质(类黄酮和原花色素)的含量与种类变化时, 没必要进行种皮与胚的剥离, 这样不仅避免了类黄酮物质氧化和流失, 也能缩短实验流程。但在测定种子多酚物质总含量和芥子碱含量时, 不能忽略种皮多酚物质和芥子碱的存在, 因为它们在种皮中也有一定的存在。

4. 结论

通过不同溶剂和不同温度对甘蓝型油菜未成熟种子萃取效率进行比较, 获得了 80%丙酮水溶液在室温条件下超声裂解萃取多酚物质为最优萃取条件。通过获得的最优萃取条件, 研究了油菜种子发育过程中种皮和胚多酚物质的差异。发现发育过程中的油菜种皮总酚和总类黄酮含量高于胚。通过色谱分离的优化, 使用 HPLC-ESI/MS² 分析, 得出类黄酮和原花色素的含量种皮高于胚, 但羟基苯丙烯酸衍生物的含量低于胚。

参考文献 (References)

- [1] R. Scarth, J. Tang. Modification of *Brassica* oil using conventional and transgenic approaches. *Crop Science*, 2006, 46(3): 1225-1236.
- [2] F. Shahidi, M. Naczk. An overview of the phenolics of canola and rapeseed: Chemical, sensory and nutritional implications. *Journal of American Oil Chemists Society*, 1992, 69: 917-924.
- [3] 何兰, 姜志宏. 天然产物资源化学[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 340-372.
- [4] U. Thiyam, P. Claudia, U. Jan and B. Alfred. De-oiled rapeseed and a protein isolate: Characterization of sinapic acid derivatives by HPLC-DAD and LC-MS. *European Food Research and Technology*, 2009, 229(5): 825-831.
- [5] Q. Liu, L. Wu, H. M. Pu, C. Y. Li and Q. H. Hu. Profile and distribution of soluble and insoluble phenolics in Chinese rapeseed (*Brassica napus* L.). *Food Chemistry*, 2012, 135(2): 616-622.
- [6] B. Auger, N. Marnet, V. Gautier, A. Maia-Grondard, F. Leprince, M. Renard, S. Guyot, N. Nesi and R. Jean-Marc. A detailed survey of seed coat flavonoids in developing seeds of *Brassica napus* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, 58(10): 6246-6256.
- [7] J. J. Jiang, Y. L. Shao, A. M. Li, C. L. Lu, Y. T. Zhang and Y. P. Wang. Flavonoid profiling and gene expression in developing seeds of yellow- and black-seeded *Brassica napus*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, 55(6): 537-551.
- [8] N. P. Gullett, A. R. Ruhul, S. Bayraktar, J. M. Pezzuto, D. M. Shin, F. R. Khuri, B. B. Aggarwal, Y. J. Surh and O. Kucuk. Cancer prevention with natural compounds. *Seminars in Oncology*, 2010, 37(3): 258-281.
- [9] F. Ferreres, C. Sousa, P. Valentao, R. M. Seabra, J. A. Pereira and P. B. Andrade. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) seeds: Phytochemical characterization and antioxidant potential. *Food Chemistry*, 2007, 101(2): 549-558.
- [10] C. A. Williams, R. J. Grayer. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 2004, 21(4): 539-573.
- [11] L. C. Olsson, M. Veit, G. Weissenbock and J. F. Bornman. Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry*, 1998, 49(4): 1021-1028.
- [12] F. Sosulski. Organoleptic and nutritional effects of phenolics. *Journal of American Oil Chemists Society*, 1979, 56(8): 711-715.

- [13] A. Frolov, A. Henning and C. Bottcher. An UPLC-MS/MS method for simultaneous identification and quantitation of cell wall phenolics in *Brassica napus* seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2013, 61(6): 1219-1227.
- [14] M. Jasinski, P. Kachlicki, P. Rodziewicz, M. Figlerowicz and M. Stobiecki. Changes in the profile of flavonoid accumulation in *Medicago truncatula* leaves during infection with fungal pathogen *Phoma medicaginis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(9): 847-853.
- [15] K. Nie, Z. H. Tang, X. Wu, X. N. Xu, Y. Z. Liang, H. Li and L. Q. Rao. Optimization of total flavonoids extraction from mulberry leaf using an ethanol-based solvent system. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012, 6(12): 2373-2380.
- [16] M. D. Sarina, C. S. Florian. Investigation on the phenolic constituents in *Hamamelis virginiana* leaves by HPLC-DAD and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401(2): 677-688.
- [17] M. Naczki, R. Amarowicz, D. Pink and F. Shahidi. Insoluble tannins of canola/rapeseed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, 48(5): 1758-1762.
- [18] C. Eynck, B. Koopmann P. P. Karlovsky and A. V. Tiedemann. Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology*, 2009, 99(7): 802-811.
- [19] M. Faudale, F. Viladomat, J. Bastida, F. Poli and C. Codina. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different mediterranean countries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008, 56(6): 1912-1920.