

# 植物花青苷液质联用方法的分析鉴定

张洁<sup>1\*</sup>, 李崇晖<sup>2</sup>, 王亮生<sup>3</sup>, 陈峰<sup>1</sup>

(1. 北京大学工学院食品与生物资源工程研究所, 北京 100871; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 儋州 571737; 3. 中国科学院植物研究所北京植物园, 北京 100093)

**摘要:** 花青苷(anthocyanins)是植物中广泛存在的水溶性色素, 在食品加工业中具有重要的地位。花青苷与人体健康密切相关, 具有较强的抗氧化、抗炎症、抗微生物、抑制血小板凝聚和抗肿瘤等功效, 已作为重要的功能因子而受到广泛的关注。花青苷成分的分析鉴定是花青苷生物活性研究的基础。然而, 花青苷种类繁多, 结构修饰多样, 同时易受环境条件的影响, 难以分离鉴定。高压液相色谱-二极管阵列检测-质谱联用技术(HPLC-DAD-MS)是花青苷分析最常规的手段。本文综述了如何利用 HPLC-DAD-MS 快速有效分离花青苷以及结构解析的一般规律及经验, 以期高附加值资源筛选以及花青苷构效关系的进一步揭示提供重要的化学基础。

**关键词:** 花青苷; 高压液相色谱-二极管阵列检测-质谱分析; 鉴定

## Golden rules of separation and characterization of plant anthocyanins by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Jie<sup>1\*</sup>, LI Chong-Hui<sup>2</sup>, WANG Liang-Sheng<sup>3</sup>, CHEN Feng<sup>1</sup>

(1. Institute for Food & Bioresource Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; 2. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China; 3. Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**ABSTRACT:** Anthocyanins are important water-soluble pigments, which have significant influence in food processing industry. Anthocyanins have anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-antimicrobial, inhibition of platelet aggregation and anticancer activity, and have been the focus as important functional ingredients. Separation and identification of anthocyanins are the base for studying their bioactive effects. However, the complexity and variety of anthocyanins make it difficult to characterize the composition of anthocyanins. High pressure liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometry has become the standard and most powerful method for routine anthocyanin analysis. This paper reviewed the golden rules for separation and identification of anthocyanins by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-DAD-MS), which might provide the chemical evidence for clarification of structure-activity relationship and screening for high value-added resources.

**KEY WORDS:** anthocyanins; high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry; identification

随着人们对食品安全问题的关注, 天然食用色素越来越受到人们的重视。天然食用色素是指从植

物、微生物、动物材料中提纯而得到的天然着色物质。与化学合成色素相比, 它具有安全性高、毒副作用低

\*通讯作者: 张洁, 讲师, 主要研究方向为微藻功能成分及其生物学效应。E-mail: zhangmaoni@yeah.net

\*Corresponding author: ZHANG Jie, Lecturer, Institute for Food & Bioresource Engineering, Peking University, No.5, Yiheyuan Road, Haidian District, Beijing 100871, China. E-mail: zhangmaoni@yeah.net

的优势。近十几年来国内外研究表明,许多天然色素除具有基本的着色效应外,还具有一定的生理活性功能,如提高机体免疫力、抗炎、抑癌、抗心血管疾病等<sup>[1,2]</sup>,天然色素已成为一类重要的功能因子而受到广泛关注。

花青苷(anthocyanins)是植物中一类重要的水溶性色素,普遍存在于果实、蔬菜以及花瓣中,赋予自然界从粉、红、紫到蓝色色调。被子植物如按科划分,

大约88%的花色由花青苷参与形成<sup>[3]</sup>。花青苷属于类黄酮化合物,苷元花青素(anthocyanidins)以3,5,7-三羟基-2-苯基苯(并)吡喃鎓盐为母核,随着B环上甲基和羟基数目及位置的变化形成不同类型(表1)。自然条件下游离花青素极少见,常与一个或多个糖通过糖苷键形成花青苷,或进一步与芳香酸或脂肪酸形成酰化结构(表2)。羟基化、甲基化、糖苷化以及酰基化修饰形成结构复杂、类型多样的花青苷。

表1 自然界常见6种花青素结构  
Table 1 Structures of common anthocyanidins

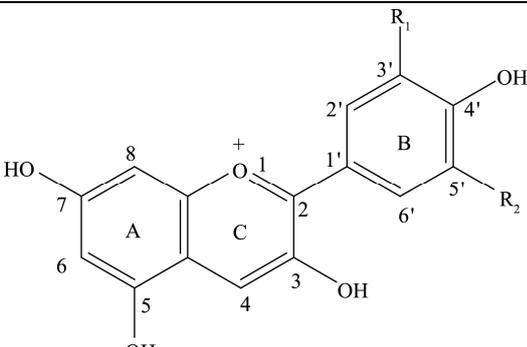
结构	类型	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Mw
	天竺葵素 (Pg)	H	H	271
	矢车菊素 (Cy)	OH	H	287
	飞燕草素 (Dp)	OH	OH	303
	芍药花素 (Pn)	OCH <sub>3</sub>	H	301
	矮牵牛素 (Pt)	OCH <sub>3</sub>	OH	317
	锦葵素 (Mv)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	331

表2 常见花青苷中糖及酸的组成及分子量  
Table 2 Compositions and molecular weight of common sugars and acylated groups of anthocyanins

化合物	分子量	分子量 - H <sub>2</sub> O
单糖		
葡萄糖	180	162
半乳糖	180	162
阿拉伯糖	150	132
木糖	150	132
鼠李糖	164	146
双糖		
芸香糖	326	308
槐糖	342	324
新橙皮糖	326	308
龙胆双糖	342	324
昆布双糖	342	324
脂肪族有机酸		
乙酸	60	42
丙二酸	104	86
琥珀酸	118	100
苹果酸	134	116
芳香族有机酸		
咖啡酸	180	162
<i>p</i> -肉桂酸	138	120
<i>p</i> -香豆酸	164	146
阿魏酸	194	162
桂皮酸	148	130

花青苷是植物形态建成过程中或响应多种逆境信号而产生的一类重要的次生代谢物质,可保护植物细胞及组织避免强光过氧化,吸引动物授粉和种子传播,对植物的生长繁衍具有重要意义<sup>[4]</sup>。同时,花青苷具有极强的抗氧化活性,表现出抗炎症、抗微生物、抑制血小板凝聚和抗肿瘤等作用<sup>[1,5-8]</sup>。研究证明花青素 B 环上邻二羟基结构(ortho-dihydroxy-phenyl)是抑制肿瘤细胞转录的关键<sup>[1]</sup>。

花青苷分析及其结构解析是其生物活性研究的基础,然而,花青苷种类繁多,结构修饰多样,易受环境 pH 值、光照、温度等条件的影响而发生降解<sup>[9]</sup>,此化学特性限制了花青苷标准品的获得。因此,花青苷的分析鉴定并不容易。高压液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)技术已成为天然产物分析鉴定的重要手段。特别是与二极管阵列检测(DAD)技术的结合,在一定程度上解决了天然产物缺乏标准品难以定性的问题。HPLC-DAD-MS 是花青苷分析最常规的技术手段,已广泛应用于多种蔬菜、花瓣以及果实中花青苷的分析鉴定。本文就如何优化 HPLC 色谱条件,以及如何利用色谱、光谱以及质谱数据解析花青苷结构的规律及相关经验进行综述,以期在花青苷功能研究和高附加值资源筛选提供方法借鉴。

## 1 样品制备

花青苷具有热不稳定性,因此,新鲜样品采集后应迅速放在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,待用。新鲜花瓣液氮速冻后再储存在冰箱中。如果较长时间储存,可考虑更低温度。花青苷在酸性水溶液中( $\text{pH}<3$ )以稳定的带正电荷的鎓盐离子存在。随着溶液 pH 值的增加,结构发生转变。因此,花青苷提取及分离过程中都需要加入一定比例的酸维持结构的稳定性<sup>[9]</sup>。含酸的水溶液可以提高花青苷的抽提效率。尽管针对不同样品材料,很难一概而论地说花青苷提取溶剂哪种最适用,但典型的花青苷提取溶剂体系选用甲醇/水/甲酸体系,如甲醇/水/甲酸(85:15:0.5, v/v/v)及(60:37:3, v/v/v)适用于多种食品特别是浆果中的花青苷成分的提取<sup>[10,11]</sup>。此外,甲醇:水:甲酸:三氟醋酸(TFA)(70:27:2:1, v/v/v)和甲醇:水:乙酸(85:15:0.5, v/v/v)也应用于果实、蔬菜以及植物花瓣中花青苷的提取<sup>[12-14]</sup>。然而,需要注意的是,盐酸水溶液有水解酰化花青苷的可能,所以通常不建议使用。

## 2 高压液相色谱分离

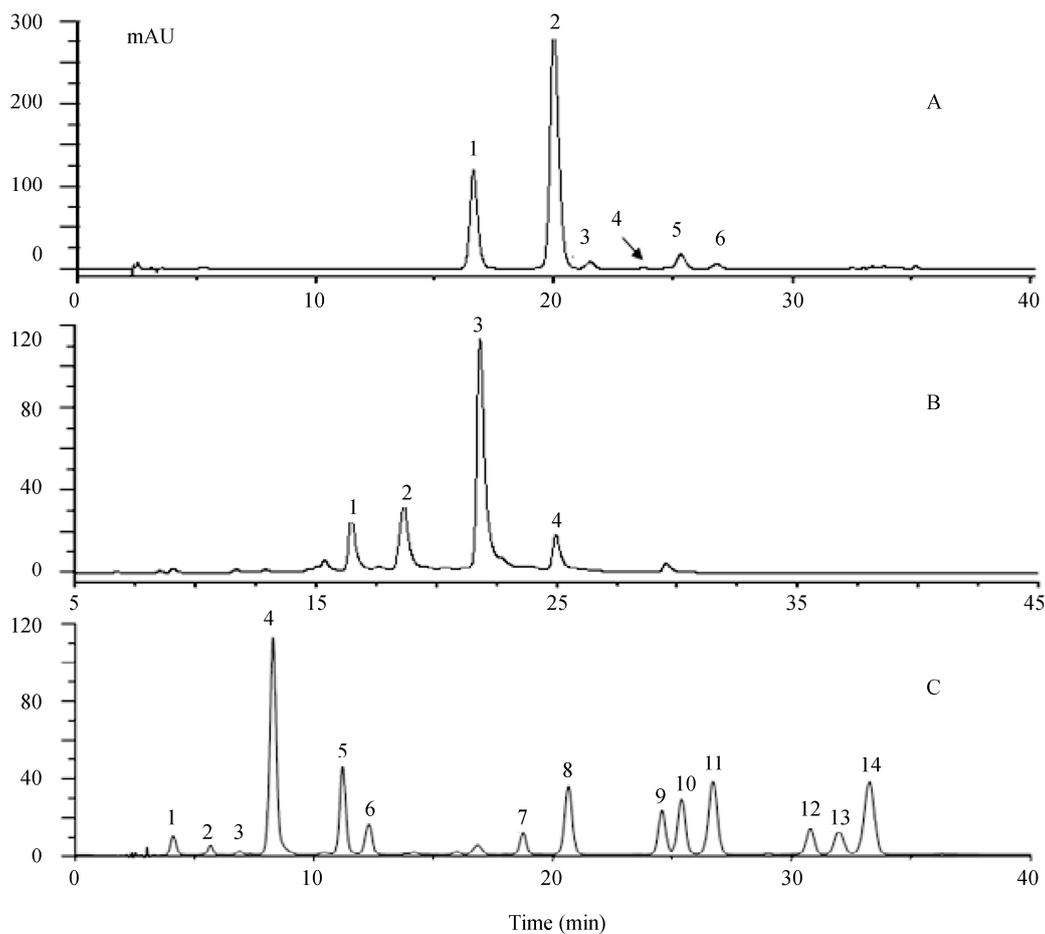
不同结构修饰的花青苷极性差异较大,色谱条件的选择直接决定化合物的分离效果。影响高压液相色谱分离的因素有流动相组成、洗脱形式、温度以及流速。其中流动相的选择是花青苷分离的关键。色谱条件的筛选遵循“同类优先,相似借鉴”的原则,即相同分类地位的植物具有相似的代谢途径。因此,参考待测植物同种、同属、甚至同科植物已报道的花青苷或类黄酮化合物的分离条件,或者选择结构相似的花青苷的色谱条件,在此基础上逐步调整,多种参数共同优化以达到花青苷快速有效分离的目的。

### 2.1 流动相组成

花青苷极性较大,通常选用反相  $\text{C}_{18}$  柱分离。花青苷分离的流动相由有机相(甲醇或乙腈)及水相(含酸的水溶液)两相组成。花青苷结构不同,流动相的组成及比例也会发生变化,需要根据结构特征,如苷元类型,单糖、多糖糖苷化,是否酰化等来选择流动相。图 1 列举出三种典型的花青苷分离流动相及其色谱图。需要注意的是,花青苷的流动相组成不仅仅局限于此,溶剂的比例及洗脱方式都需要根据具体的分离成分调整。

SI 体系由甲酸,水,乙腈和甲醇构成,其中有机相可用 100%的甲醇或乙腈替代。相同色谱条件下,相同比例的甲醇比乙腈产生的柱压要高,但乙腈成本高,洗脱出的色谱峰峰型较好,一定比例的甲醇和乙腈结合可达到较为理想的分离效果。Yang 等<sup>[15]</sup>采用 HPLC 分析花青苷,发现甲酸的分离效果优于三氟醋酸(TFA)和乙酸的分离,并且在随后的质谱分析中可促进电离。SI 应用于多种花青素的单糖、多糖或简单酰化结构的有效分离<sup>[16,17]</sup>。磷酸对于流动相 pH 值的调节具有重要作用,SI 对同一苷元不同糖苷化以及高度酰化的花青苷均能达到满意分离<sup>[18-20]</sup>。但磷酸缓冲盐容易造成色谱柱的堵塞,不适于质谱分析,因此,常用于标准品定性或单独的定量分析体系<sup>[21]</sup>。

有机相中水的组成对于花青苷的分离具有重要作用。通过提高有机相中水的比例,降低有机相洗脱能力,紫花地丁(*V. yedoensis*)中花青苷分离效果得到显著提高(图 2),SIII 可同时分离多种花青素结构修饰衍生物,其中包括 *p*-香豆酸酰化引起的 *cis*-及 *trans*-同分异构体<sup>[12,16]</sup>。



编号	流动相(v/v)	梯度(B%)	色谱图
SI	A, 甲酸:水(10:90)	0 min, 5%; 26 min, 10%;	A <sup>[24]</sup>
	B, 乙腈:甲醇(85:15)	35 min, 28%; 45 min, 5%	
SII	A, 磷酸:水(1.5:98.5)	0 min, 40%;	B <sup>[20]</sup>
	B, 磷酸:甲酸:乙腈:TFA (1.5:20.0:25.0:53.5)	40 min, 85%; 50 min, 40%;	
SIII	A, 甲酸:水(10:90);	0 min, 20%; 10 min, 30%;	C <sup>[12]</sup>
	B, 甲酸:乙腈:水(10:40:50)	35 min, 45%; 40 min, 20%;	

图1 贴梗海棠(A), 圆叶牵牛(B), 紫花地丁和早开堇菜(C)花青苷分离色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of anthocyanins from *Chaenomeles speciosa* (A), *Ipomoea purpurea* (B), *Viola yedoensis* and *V. prionantha* (C)

## 2.2 洗脱方式

高压液相色谱有等度洗脱和梯度洗脱两种洗脱方式。当待分离组分为简单时可选用等度洗脱方式,即有机相和水相比比例在分离时间内保持不变。然而,由于植物材料中的花青苷类型较多,极性差异小,难以分开,故多选用梯度洗脱。梯度洗

脱可显著提高样品的分离度,缩短分析周期,同时改善色谱峰峰型。梯度洗脱程序中,有机相的比例由低到高逐渐升高,在一定的时间内达到最高。花青苷成分是否完全洗脱取决于有机相的最高比例。有机相升高的幅度以及分离时间则取决于具体花青苷成分的复杂性。梯度洗脱的调整对于花青苷分

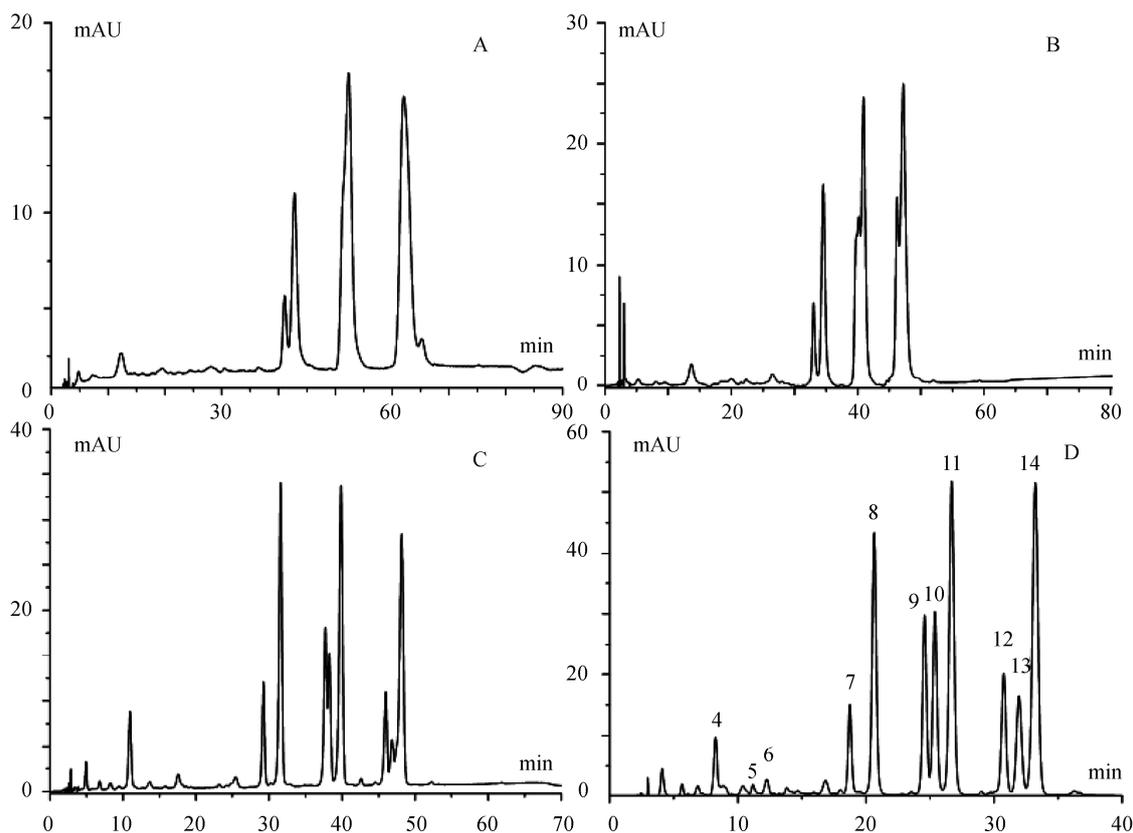


图2 紫花地丁中花青苷成分的HPLC优化<sup>[12]</sup>

Fig. 2 HPLC chromatograms of anthocyanins from *V. yedoensis*<sup>[12]</sup>

溶剂体系 A, E-I; B, E-II, C, E-III, D, E-IV

E-I: A, 0.1% TFA 水溶液; B, 乙腈;

G-I: 0 min, 10% B; 50 min, 16% B; 80 min, 18% B; 90 min, 10% B.

E-II: A, 5% 甲酸水溶液, B, 乙腈;

G-II: 0 min, 7% B; 60 min, 20% B; 80 min, 50% B; 85 min, 7% B.

E-III: A, 10% 甲酸水溶液, B, 甲酸: 乙腈: 水(10:45:45, v/v/v);

G-III: 0 min, 15% B; 60 min, 40% B; 65 min, 45% B; 70 min, 15% B.

E-IV: A, 10% 甲酸水溶液; B, 甲酸: 乙腈: 水(10:40:50, v/v/v);

G-IV: 0 min, 20% B; 10 min, 30% B; 35 min, 45% B; 40 min, 20% B.

离体系的优化具有重要意义, 通过多样的梯度调整, 同一种流动相体系可应用于多种样品中花青苷的分离<sup>[13,14]</sup>。然而, 由于梯度洗脱容易引起基线漂移, 样品与样品之间分析通常需要设置一定的时间使有机相的比例恢复到初始比例, 以达到平衡再检测的目的。

### 2.3 温度和流速

温度和流速也是影响花青苷分离的重要因素。花青苷分析温度以 25~35 °C 较为常见。随着温度升高, 柱压降低。不同温度对不同结构的花青苷影响不同, 没有固定的规律, 可通过设置不同参数比较分离效

果来确定<sup>[12,15]</sup>。流速越大, 出峰越快, 分离时间会越短, 但同时也会以分离度降低为代价。设置不同流速如 0.6、0.8、1.0 mL/min, 最终选择较短的分离时间内得到理想的分离度的分析条件。多种色谱参数共同优化以快速有效分离花青苷。需要注意的是, 以上优化条件都需要结合色谱柱参数的耐受范围设计, 如柱压、pH 值、温度等。

### 3 结构鉴定

质谱是物质结构鉴定的重要方法, 快速、高灵敏度, 可同时提供样品的分子量、分子式和同位素等重

要信息。质谱、色谱信息结合紫外-可见吸收光谱特征多方面数据为花青苷的结构鉴定提供了重要依据。

### 3.1 苷元确定

花青苷通常在正离子模式下进行质谱电离<sup>[13,14]</sup>。特征质荷比可快速进行花青苷类型的判断(表3)。碎片离子峰  $m/z$  303、317、287、331、301和271分别对应飞燕草素(Dp)、矮牵牛素(Pt)、矢车菊素(Cy)、锦葵素(Mv)、芍药花素(Pn)和天竺葵色素(Pg)的衍生物。

紫外-可见吸收光谱特征提供辅助证据。花青苷具有两个明显的吸收峰,位于波长较长一侧称为带I,较短一侧称为带II。带I反映了B环的取代情况。随着B环上羟基及甲基化数目的增加,带I有向短波长方向移动的趋势<sup>[22]</sup>。因此,可通过紫外-可见吸收光谱,初步掌握苷元组成的大体类型。

### 3.2 框架确定

自然条件下游离的花青素常以花青苷形式存在。一般情况下,单糖优先结合花青素3位羟基。两个以上的糖可同时结合3位或分别结合3位和5位羟基。因此,应优先判断花青苷5位是否发生取代。花青苷440 nm波长下吸收值与可见光最大吸收波长下吸收值的比值( $A_{440}/A_{vis-max}$ )反映5位是否被糖苷化<sup>[23]</sup>。从表3中可以看出当 $A_{440}/A_{vis-max} > 30\%$ 时,其花青苷为3-O-糖苷类型,5位未被糖苷化,而当 $A_{440}/A_{vis-max} < 20\%$ 时,5位被糖苷化。然而,需要注意的是 $A_{440}/A_{vis-max}$ 数值并不是固定不变的,在同一分析条件下, $A_{440}/A_{vis-max}$ 数值差别较大的花青苷成分,可进行5位糖苷化的判断<sup>[12,24]</sup>。

花青苷还可被有机酸酰化。化合物在290~340 nm波长下肩峰的出现可推定化合物被芳香酸酰化<sup>[25]</sup>。圆叶牵牛中Pg3C5G和Cy3C5G的紫外-可见吸收光谱如图3所示。紫花地丁中酰化花青苷的肩峰紫外波长范围为309~315 nm。

### 3.3 结构解析

根据质谱常见的裂解特征质荷比及丰度信息,初步判断花青苷基本组成。以早开堇菜中色谱峰1(表3)为例,其质谱数据包括分子离子峰  $m/z$  773,碎片离子峰  $m/z$  611,  $m/z$  303和  $m/z$  465(图4)。特征碎片离子峰  $m/z$  303对应花青素苷元Dp,则此化合物为Dp衍生物。通过计算 $A_{440}/A_{vis-max}$ 为16.2,则推定为Dp-3,5-O-双糖苷。根据碎片离子峰  $m/z$  611是分子离子峰  $m/z$  773丢掉162 u所得,对应一分子己糖基。碎片离子峰  $m/z$  465为丢掉308 u(146 + 162)所得。146 u通常为一分子的

-香豆酸酰基或鼠李糖基。由于紫外-可见吸收光谱在290~340 nm未见特征吸收,则可确定为鼠李糖基。因此,初步判定此化合物为Dp-3,5-双糖苷,两分子己糖和一分子的鼠李糖参与此花青苷形成<sup>[12]</sup>。

### 3.4 佐证

根据以上规律,从花青苷的质谱、光谱和色谱数据可初步判断简单花青苷的结构组成<sup>[26]</sup>。然而,多糖及不同酰基化修饰的花青苷,因糖的连接顺序,有机酸酰化的位置不同呈现多样性,因此,需借助其他的证据确定。

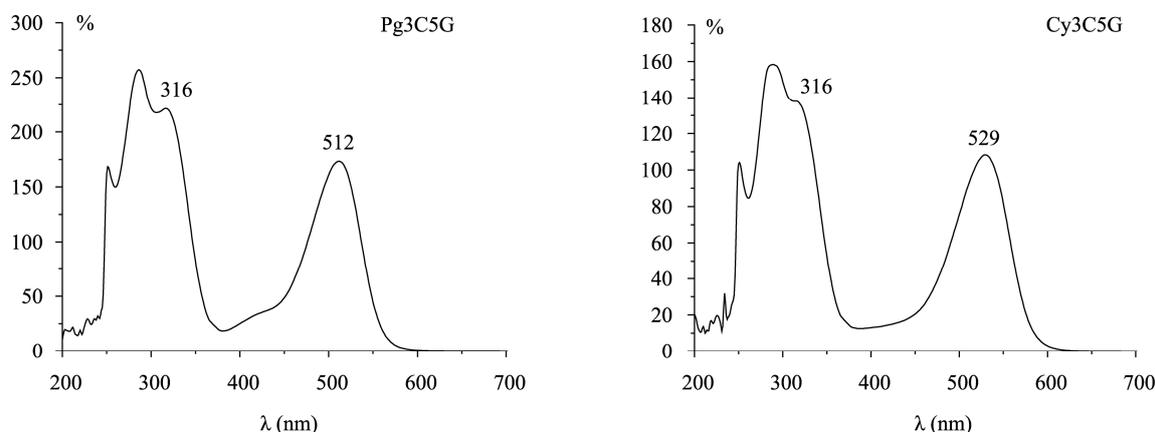


图3 Pg3C5G和Cy3C5G的紫外-可见吸收光谱

Fig. 3 UV-vis spectra of Pg3C5G and Cy3C5G

表3 植物中天然花青苷成分鉴定  
Table 3 Chromatographic and spectral data of anthocyanins detected in petals

色谱峰 <sup>a</sup>	$t_R$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	$A_{440}/A_{vis-max}$	分子离子 ( $m/z$ )	碎片离子 ( $m/z$ )	化合物结构
贴梗海棠( <i>Chaenomeles speciosa</i> ) <sup>[24]</sup>						
1	16.6	516	32	611	287	Cy3 (Ga-G)
2	20.0	516	32	449	287	Cy3Ga
3	21.5	501	43	595	271	Pg3 (Ga-G)
4	23.8	514	n. a.	449	287	Cy3G
5	25.3	501	43	433	271	Pg3Ga
6	26.8	513	32	519	287	Cy3SucAra
圆叶牵牛( <i>Ipomoea purpurea</i> ) <sup>[20]</sup>						
1	16.4	284/323/509	15.8	1243	271/433/919/1081	Pg2C4G
2	18.6	286/316/515	18.0	1081	271/433/919	Pg2C3G
3	21.8	287/317/512	20.8	1568	271/433/919/1081/1243/1405	Pg3C5G
4	24.9	288/324/511	24.1	1405	271/433/919/1081/1243	Pg3C4G
早开堇菜( <i>V. prionantha</i> )及紫花地丁( <i>V. yedoensis</i> ) <sup>[12]</sup>						
1	4.5	523	16.2	773	611, 465, 303	Dp3Ru5G
2	5.9	515	17.7	757	595, 449, 287	Cy3Ru5G
3	7.1	527	13.2	787	625, 479, 317	Pt3Ru5G
4	8.4	526	14.9	815	653, 465, 303	Dp3acRu5G
5	11.3	517	16.4	799	637, 449, 287	Cy3acRu5G
6	12.4	528	13.6	829	667, 479, 317	Pt3acRu5G
7	18.9	529, 312 $sh$	14.2	919	757, 465, 303	Dp3 $cisp$ CRu5G
8	20.8	529, 313 $sh$	14.8	919	757, 465, 303	Dp3 $transp$ CRu5G
9	24.7	528, 310 $sh$	13.6	933	771, 479, 317	Pt3 $cisp$ CRu5G
10	25.5	520, 315 $sh$	16.1	903	741, 449, 287	Cy3 $p$ CRu5G
11	26.7	531, 309 $sh$	13.3	933	771, 479, 317	Pt3 $transp$ CRu5G
12	30.8	535, 311 $sh$	12.1	947	785, 493, 331	Mv3 $cisp$ CRu5G
13	31.9	520, 311 $sh$	15.3	917	755, 463, 301	Pn3 $p$ CRu5G
14	33.2	533, 312 $sh$	12.6	947	785, 493, 331	Mv3 $transp$ CRu5G

<sup>a</sup> 色谱峰见图1

注: Cy: 矢车菊素; G: 葡萄糖苷; Ca: 半乳糖苷; Pg: 天竺葵素; Ara: 阿拉伯糖苷; Suc: 琥珀酰; C: 咖啡酰; Dp: 飞燕草素; Ru: 芸香糖酰; Pt: 矮牵牛素; Mv: 锦葵素; Pn: 芍药花素; ac: 乙酰;  $pC$ : 香豆酰;

<sup>a</sup> Chromatographic peaks in Fig. 1

Note: Cy: cyanidin; G: glucoside; Ca: galactose; Pg: pelargonidin; Ara: arabinoside; Suc: succinyl; C: caffeyl; Dp: delphinidin; Ru: rutinoside; Pt: Petunidin; Mv: malvidin; Pn: peonidin; ac: acetyl;  $pC$ :  $p$ -coumaroyl

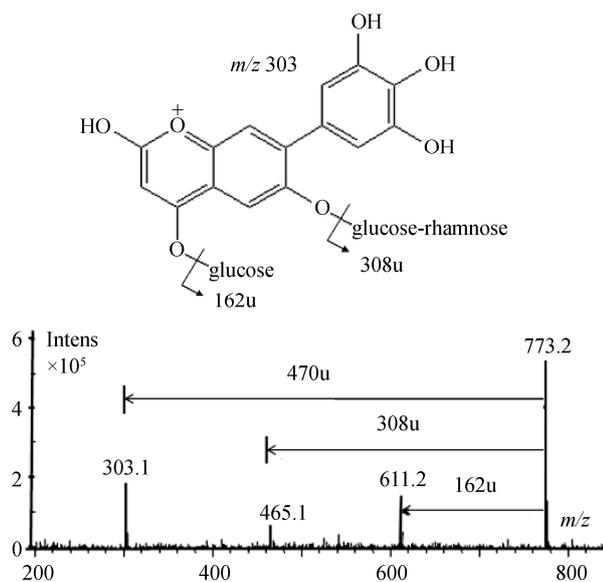


图 4 早开堇菜中 Dp3Ru5G 化学结构及质谱图<sup>[12]</sup>

Fig. 4 MS spectra and chemical structure of Dp3Ru5G from *V. prionantha*<sup>[12]</sup>

#### 3.4.1 洗脱顺序

化合物的极性决定 HPLC 出峰时间。化合物洗脱顺序可作为结构解析验证的依据。花青苷经反相 C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 其极性越大, 出峰时间越早。常见 6 种花青素出峰顺序依次是 Dp、Cy、Pt、Pg、Pn 和 Mv<sup>[13]</sup>。糖苷化修饰会使花青苷极性增加, 洗脱顺序提前, 保留时间减少; 芳香酸酰化会使花青苷的极性降低, 洗脱顺序推后, 保留时间增加(表 3)。

不同的碎片离子可得到相同质荷比, 且花青苷光谱特征相似。常见的需要甄别的有两种: 1) 葡萄糖和半乳糖是花青苷常见己糖组分, 其裂解质荷比均为  $m/z$  162; 2) 花青苷有机酸的酰化可形成 *trans*-及 *cis*-的同分异构体。花青苷光谱特征为以上两种情况的鉴别提供依据。研究表明, 花青素-3-*O*-半乳糖苷的洗脱时间小于花青素-3-*O*-葡萄糖苷<sup>[27]</sup>, *cis*-花青苷在反相色谱中优先于 *trans*-花青苷被洗脱<sup>[28]</sup>。根据此规律, 贴梗海棠中 Cy3Ga 和 Cy3G 以及紫花地丁中 Dp3*cisp*CRu5G, Dp3*transp*CRu5G, Pt3*cisp*CRu5G, Pt3*transp*CRu5G 和 Mv3*cisp*CRu5G 和 Mv3*transp*CRu5G 被辨别<sup>[12, 24]</sup>。

#### 3.4.2 可信对照品共洗脱实验

花青苷结构复杂, 且不稳定, 市场上可以购买的花青苷标准品极为有限。一些已经查明花青苷组成的植物材料可作为对照品而应用。根据相同化合物 HPLC 分离后只出现一个色谱峰的共洗脱特性, 将对

照品材料与待测样品混合, 如果在待测组分保留时间上出现唯一的色谱峰, 同时峰高或峰面积随着对照品的加入而极大的增加, 并且紫外-可见吸收光谱一致, 可推定为一种成分<sup>[24]</sup>。同时, 由于大量样品的 HPLC 分析可能出现同一种化合物在不同时间和不同批次分析时保留时间发生漂移难以定性的情况, 也可通过共洗脱实验判断。

#### 3.4.3 相似或相同的化学背景

同种、同属或同科植物具有相似的代谢途径, 参照其已经鉴定出的花青苷或其他类黄酮化合物结构特点, 对于待测样品的结构确定提供依据<sup>[24]</sup>。如早开堇菜色谱峰 1 初步判断为己糖和鼠李糖形成的 Dp-3,5-双糖苷。根据同属植物三色堇 (*Viola × wittrockiana* Gams), Dp-3-*O*-rhamnosylglucoside(Dp3Ru) 和 Dp-3-*O*-(*p*-coumaroyl)-rhamnosylglucoside-5-*O*-glucoside(Dp3pCRu5G) 已被鉴定<sup>[12, 29]</sup>, 则结合多方面证据推定色谱峰 1 为 Dp3Ru5G(图 4)。

## 4 结 论

本文综述了如何利用液质联用方法对植物花青苷分离以及结构鉴定的一般规律及经验。需要注意的是花青苷的分离鉴定是基于质谱、紫外-可见吸收光谱以及色谱信息, 结合待测样品的化学背景等多种数据相互佐证共同判断的。然而, 对于新化合物只能通过传统的色谱技术纯化分离结合核磁共振及光谱数据进行确定。

## 参考文献

- [1] Hou DX, Kai K, Li JJ. Anthocyanidins inhibit activator protein1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25: 29-36.
- [2] Yuan JP, Peng J, Yin K *et al.* Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55: 150-165.
- [3] Weiss MR. Floral color change: A widespread functional convergence [J]. *Am J Bot*, 1995, 82: 167-185.
- [4] 陈静. 花青苷对番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)幼苗叶片光合机构的保护作用及番茄花青苷结构特性的研究 [D]. 西北农林科技大学, 2005.  
Chen J. Study on protective effect of anthocyanin in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling leaves on photosynthetic apparatus and analysis of anthocyanin structure [D]. Northwest A&F University, 2005.
- [5] Bomser J, Madhavi DL, Singletary K, *et al.* In Vitro Anticancer

- Activity of Fruit Extracts from *Vaccinium* Species [J]. *Planta Med*, 1996, 62(3): 212–216.
- [6] Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance [J]. *Nutr Rev*, 1998, 56: 317–333.
- [7] Juranić Z, Žižak Ž. Biological activities of berries: From anti-oxidant capacity to anti-cancer effects [D]. *BioFactors*, 2005, 23: 207–211.
- [8] Stone SZ, Yasmin T, Bagchi M *et al*. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51: 675–683.
- [9] Gould K, Davies K, Winefeld C. Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications [M]. Springer, 2009, 287.
- [10] Wu XL, Beecher GR, Holden JM, *et al*. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption [J]. *J Agr Food Chem*, 2006, 54(11): 4069–4075.
- [11] Hager TJ, Howard LR, Prior RL. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products [J]. *J Agr Food Chem*, 2008, 56: 689–695.
- [12] Zhang J, Wang LS, Gao JM, *et al*. Rapid separation and identification of anthocyanins from flowers of *Viola yedoensis* and *V. prionantha* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection- electrospray ionisation mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23: 16–22.
- [13] Wu XL, Prior RL. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53: 2589–2599.
- [14] Wu XL, Prior RL. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53: 3101–3113.
- [15] Yang RZ, Wei XL, Gao FF, *et al*. Simultaneous analysis of anthocyanins and flavonols in petals of Lotus (*Nelumbo*) cultivars by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 106–112.
- [16] 李崇晖. 牡丹花瓣类黄酮成分分析及其对花色的影响 [D]. 中国科学院, 2010.
- Li CH. The flavonoid composition in tree peony petal and their effects on the coloration [D]. Chinese Academy of Science, 2010.
- [17] Buchert J, Koponen JM, Suutarinen M, *et al*. Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices [J]. *J Sci Food Agr*, 2005, 85: 2548–2556.
- [18] Wang LS, Shiraiishi A, Hashimoto F, *et al*. Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan(Chinese)and Daikon Island(Japanese) tree peony cultivars [J]. *J Plant Res*, 2001, 114 (1113): 33–43.
- [19] Zhang JJ, Wang LS, Shu QY, *et al*. Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of Xibei tree peony [J]. *Sci Hortic (Amsterdam)*, 2007, 114: 104–111.
- [20] Lu YQ, Du J, Tang JY, *et al*. Environmental regulation of floral anthocyanin synthesis in *Ipomoea purpurea* [J]. *Mol Ecol*, 2009, 18: 3857–3871.
- [21] Jia N, Shu QY, Wang LS, *et al*. Analysis of petal anthocyanins to investigate coloration mechanism in herbaceous peony cultivars [J]. *Sci Hortic (Amsterdam)*, 2008, 117: 167–173.
- [22] 戴思兰. 园林植物遗传学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2004.
- Dai SL. Garden Plants and Breeding [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2004.
- [23] Harborne JB. Spectral methods of characterizing anthocyanins [J]. *Biochem J*, 1958, 70: 22–28.
- [24] 张洁, 王亮生, 高锦明, 等. 贴梗海棠花青苷组成及其与花色的关系 [J]. *园艺学报*. 2011, 38(3): 527–534.
- Zhang J, Wang LS, Gao JM, *et al*. Identification of Anthocyanins Involving in Petal Coloration in *Chaenomeles speciosa* Cultivars [J]. *Acta Hort Sin*, 2011, 38 (3): 527–534.
- [25] Fossen T, Andersen M. Cyanidin 3-O-(6'-succinyl-glucopyranoside) and other anthocyanins from *Phragmites australis* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49: 1065–1068.
- [26] Zhang J, Wang LS, Gao JM. Determination of anthocyanins and exploration of relationship between their composition and petal coloration in crape myrtle (*Lagerstroemia* hybrid) [J]. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50: 581–588
- [27] Lopes-da-Silva F, Escribano-Bailón MT, Pérez-Alonso JJ, *et al*. Anthocyanin pigments in strawberry [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2007, 40: 374–382.
- [28] Downey MO, Rochfort S. Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1201: 43–47.
- [29] Hase N, Matsuura S, Yamaguchi M. HPLC evaluation of anthocyanins and flavonols in relation to the flower color of pansies (*Viola × wittrockiana* Gams) [J]. *Hort Res (Japan)*, 2005, 4: 125–129.

(责任编辑: 赵静)

## 作者简介



张洁, 讲师, 主要研究方向为微藻功能成分及其生物学效应。

E-mail: zhangmaoni@yeah.net