

# 花青素类化合物分析方法研究进展

赵贝塔<sup>1</sup>, 赵 巍<sup>2</sup>, 刘邻渭<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国科学院水利部水土保持研究所 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 花青素类化合物是自然界分布最广泛的水溶性色素,存在于大部分植物的花和果实中。因种类繁多、资源丰富、颜色鲜艳、安全无毒和具有多种保健功能,花青素类化合物的研究和开发利用日益受到国内外科研人员的广泛关注。为进一步明确花青素类化合物分析方法的应用范围和功能,对各种分析方法的原理、技术优缺点、适用范围以及技术联用情况进行了综述,并对其优缺点进行了分析,最后提出了完善花青素类化合物分析方法的研究方向。

**[关键词]** 花青素;结构鉴定;定量分析;分析方法

**[中图分类号]** TS264.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2014)06-0180-09

## Advances in the analytical methods of anthocyanin compounds

ZHAO Bei-ta<sup>1</sup>, ZHAO Wei<sup>2</sup>, LIU Lin-wei<sup>1</sup>

(1 College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau, Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences and Ministry of Water Resources, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Anthocyanin compounds, found in flowers and fruits of most plants, are one of the most widely distributed water soluble pigments in nature. Due to their rich resources, low toxicity and health care function, more and more attention has been paid to investigation and use of anthocyanin compounds worldwide. In order to further clarify the range and functions of anthocyanin compounds, this paper reviews the principles, advantages and disadvantages, applicable scopes, and combination of different analytical methods of anthocyanin compounds, and the future research directions and the main problems to be solved are discussed.

**Key words:** anthocyanin compounds; identification; quantification; analytical method

花青素(Anthocyanin)一词源于 Marguart 在 1853 年对矢车菊花朵中蓝色提取物的命名,是一类物质的总称<sup>[1]</sup>。花青素类物质为重要的水溶性植物色素,属于酚类化合物中的类黄酮,广泛存在于植物的根、茎、叶、花和果实中,为多羟基-2-苯基苯并吡喃烺盐及其糖苷<sup>[2]</sup>。目前,已发现并得到研究的花青素有天竺葵色素(Pelargonidin)、矢车菊素(Cya-

nidin)、芍药色素(Peonidin)、飞燕草色素(Delphinidin)、牵牛花色素(Petunidin)和锦葵色素(Malvidin)等 6 类<sup>[3]</sup>。花青素除可与单糖(如葡萄糖、半乳糖、鼠李糖和阿拉伯糖)相连形成花色苷外,也可与芳香酸或脂肪酸通过酰化而相连。

花青素类物质易溶于水、甲醇、乙醇、稀碱或稀酸等极性溶剂,其颜色随 pH 值而变化<sup>[4]</sup>,是重要的

**[收稿日期]** 2013-05-03

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(41101218)

**[作者简介]** 赵贝塔(1988-),男,重庆人,在读硕士,主要从事植物花青素研究。E-mail:aoc1979@yahoo.com.cn

**[通信作者]** 刘邻渭(1953-),男,河南洛阳人,教授,博士,博士生导师,主要从事食品科学研究。E-mail:linweiliu8@hotmail.com

食品色素;此外,花青素类物质具有多种生物学活性,如抗肿瘤、抗炎、抗衰老、抑制脂质过氧化和血小板凝集、预防糖尿病和保护视力等。但是从植物中分离出的花青素极不稳定,易受酸碱度、温度、自身浓度、光、氧、酶、辅因子、微生物和金属离子等的影响而降解<sup>[5]</sup>,从而使其应用受到一定程度的限制。因此,鉴定分析花青素的结构和组成是对其进行结构改性以增强其稳定性的前提条件,并且可通过认识其结构、理化性质和生理功能,进而指导新资源的开发及生产。

目前已发现的花青素类物质有 500 多种<sup>[6]</sup>,其多样性赋予花青素广泛的生物活性,但同时也增加了其分析鉴定的难度。目前,常用于花青素类物质分析的方法主要有紫外-可见光谱法(UV-Vis spectrum)、高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)、质谱技术(Mass spectrometry, MS)、核磁共振波谱法(Nuclear magnetic

resonance, NMR)、纸层析法(Paper chromatography, PC)、薄层层析法(Thin layer chromatography, TLC)、毛细管区带电泳法(Performance capillary electrophoresis, PCE)、红外吸收光谱法(Infrared spectroscopy, IR)和近红外吸收光谱法(Near infrared spectrum, NIR)等,这些方法均有各自的优势和局限性。本文对花青素类化合物主要分析方法的应用现状进行了评述,以期进一步明确各种分析方法的应用范围和功能,为今后开展花青素类化合物的分析研究提供支持。

## 1 紫外-可见光谱法

### 1.1 紫外-可见光谱法表征花青素类物质的结构

自从 1958 年 Harborne<sup>[7]</sup>将紫外-可见光谱法应用于花青素类物质结构的鉴定以来,至今已形成一系列确定花青素类化合物结构官能团的紫外-可见光谱法(表 1<sup>[8]</sup>)。

表 1 紫外-可见光谱法在花青素类物质结构鉴定中的应用

Table 1 Structural identification of anthocyanin compounds with UV-Vis spectrometry

序号 No.	依据或现象 Basis or phenomenon	花青素类化合物判断 Conclusions
1	花青素在 500~540 nm 和 275 nm 附近的 2 个最大吸收峰 Based on the maximum absorptions at 500—540 and 275 nm	判断被检测物质是否含花青素类色素 To confirm whether the examined matter contains anthocyanin compounds or not
2	向花青素的体积分数 0.01% 盐酸甲醇溶液中加入 3~5 滴 AlCl <sub>3</sub> 甲醇或乙醇溶液,若出现 $\lambda_{\max}$ 蓝移 When 3—5 drops methanol or alcohol solution with AlCl <sub>3</sub> are added into 0.01% hydrochloric acid methanol with anthocyanin, $\lambda_{\max}$ is blue shifted	说明 B 环有邻位酚羟基 To assure that ortho phenolic hydroxyl is present in the B-cycle
3	B 环有邻位羟基确定后,再加入 3~5 滴甲醇钠,若 $\lambda_{\max}$ 红移且吸光度不随时间减小 When 3—5 drops sodium methylate are added into the mixture above, $\lambda_{\max}$ is red shifted and keeping stable with time	表明 C <sub>4</sub> 位上有羟基,且 C <sub>3</sub> 位羟基形成糖苷 To conclude that Hydroxyl is present at C <sub>4</sub> , and hydroxyl at C <sub>3</sub> has transformed to glucoside
4	根据 440 nm 与可见光最大吸收波长 $\lambda_{\max}$ 处的吸光度比值( $A_{440}/A_{\max}$ ) According to the ratio of $A_{440}$ to $A_{\max}$ , where $A_{\max}$ is the maximum absorbance at visible spectrum	判断分子内酰基的个数和糖苷的位置 To decide the number of intramolecular acyl and the position of glucoside
5	根据花青素在 300~330 nm 有无吸收峰 If an adsorption peak occurs within 300—330 nm	若有吸收峰,表明有酰基存在 To show that Acyl occurs
6	根据花青素在 440 nm 处是否有肩峰 If shoulder peak occurs at 440 nm	若有肩峰,说明 C <sub>5</sub> 号位的羟基未被取代 To mean that hydroxyl at C <sub>5</sub> site is not substituted
7	通入 SO <sub>2</sub> 是否褪色 If color fades on SO <sub>2</sub>	若不褪色,表明在 C <sub>4</sub> 位上有苯基或甲氧基 To say that phenyl or methoxyl occurs at C <sub>4</sub> site
8	根据花青素在紫外光下是否有荧光 If fluorescence occurs under UV-light	若有荧光则表明在 C <sub>5</sub> 号位有取代基 To suggest that substituent group is present at C <sub>5</sub> site

花青素类物质结构鉴定最初主要依靠紫外-可见光谱法,但该方法局限性很大。首先,不同的溶剂体系,其紫外-可见光谱也有所不同,无法建立一种普遍适用的方法;其次,该方法对纯物质鉴定效果较好,而花青素的粗提物往往有较多的杂质,很难准确鉴定其结构,常出现误判情况。质谱、核磁共振以及联用技术的发展使得各种复杂花青素的结构鉴定有

了更加可靠和准确的方法。

### 1.2 紫外-可见光谱法测定花青素类化合物的总量

1976 年 Wrolstad 建立了紫外-可见光谱测定花青素总量的方法<sup>[9]</sup>,该法包括单一 pH 法<sup>[10]</sup>、pH 示差法<sup>[11]</sup>和差减法<sup>[12]</sup>,其方法操作简单、成本低,现今仍然被广泛应用。

#### 1.2.1 单一 pH 法 在新鲜的植物提取物中很少

含有与花青素类物质有相同最大吸收光波区的干扰物,因此其总量可基于朗伯-比尔定律选取适当波长来测定,其测定过程需要在一定 pH 值的介质中进行,并确定样品中最具有代表性的花青素类物质在所选吸收波长处的摩尔消光系数  $\epsilon$  或比消光度  $E$ 。我国学者利用该方法测定了玫瑰花<sup>[13]</sup>、黑豆皮<sup>[14]</sup>、茶树芽叶<sup>[15]</sup>、葡萄酒<sup>[16]</sup>、紫色马铃薯<sup>[17]</sup> 等的花青素类物质含量。但综合分析可知,该方法仅适用于干扰物含量低的体系。

1.2.2 pH 示差法 pH 示差法是 2005 年美国官方分析化学家协会(AOAC)指定的花青素总含量测定方法,是目前国内外应用最为普遍的方法<sup>[18]</sup>。该方法的依据是 pH 值的改变可影响花青素的色调和色度,而不影响干扰物质的特征光谱;根据朗伯-比尔定律,试样溶液在 2 个不同 pH 值下的吸光度差值与花青素的总含量成正比<sup>[19]</sup>。该方法可以较好地减小干扰物质的影响,但由于辅色素转化不完全,因此实测含量一般低于理论含量<sup>[20]</sup>。Grisebach<sup>[21]</sup> 选择 1.0 和 4.5 共 2 个 pH 值对花青素进行了定量分析,当溶液 pH 值为 1.0 时,花青素在 510 nm 处有最大吸收;而当溶液 pH 值为 4.5 时,花青素转变为无色查尔酮,在 510 nm 处无吸收,因而可用示差法计算溶液中的花青素总含量,其计算公式为:

$$C = \frac{A_{\text{pH}1.0} - A_{\text{pH}4.5}}{\epsilon} \times M \times 100.$$

式中:  $C$  为花青素的含量(g/L);  $A_{\text{pH}1.0}$ 、 $A_{\text{pH}4.5}$  分别为溶液在 pH 为 1.0 和 4.5 时的吸光度;  $M$  为矢车菊-3-葡萄糖苷的相对分子质量,其值为 449;  $\epsilon$  为矢车菊-3-葡萄糖苷的消光系数,其值为 29 600。

pH 示差法可降低非花青素类物质的干扰,在缺乏标准物质时,可直接利用公式计算。

1.2.3 差减法 差减法是基于一花青素经二氧化硫或亚硫酸盐漂白后,其可见光的光谱特征消失,而干扰物质的吸光度则几乎不受影响的原理建立的方法。毛建霏等<sup>[22]</sup> 采用改进的差减法测定了紫甘薯的花青素含量。由于漂白剂能降低某些干扰组分的吸光度,因此该方法的实测含量高于理论含量;另外,由于漂白剂选择性差,辅色剂、金属离子等对花青素紫外可见光吸收有影响,以及游离花青素在弱酸条件下不稳定等因素,导致该方法的应用受到局限,目前已很少使用。

在测定花青素总含量时,若仅在同种材料之间比较,可选用操作简便的单一 pH 法;若要求得到同种材料的准确含量,多采用 pH 示差法。而测定花

青素单组分成分或不同种材料的花青素含量,紫外-可见光谱法不适宜。

## 2 纸层析法与薄层层析法

纸层析法和薄层层析法始于 20 世纪 40 年代,是花青素类物质分析早期所采用的经典方法,该法根据花青素类物质在不同溶剂中的迁移值( $R_f$ )和颜色对其进行定性。该方法的优点是成本低、分析迅速、设备简单,而且直观性和可比性均较好,可在同一色谱板上根据组分性质选择不同显色剂或检测方法进行定性或定量;即使无标准样品对照,也可通过同一样品在多种不同展开剂中的  $R_f$  值,对花青素类物质进行粗略定性。王本晓等<sup>[23]</sup> 用薄层层析法分析发现,玫瑰花中主要的花青素为矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷。王娜等<sup>[24]</sup> 用纸层析等方法对樟树果的花青素组成进行了初步鉴定。

纸层析和薄层层析是基于与标准物质的对照,从而分离和识别混合物体系,当样品中的化合物较复杂时,该方法很难对其进行准确的分析与鉴定,特别是对于同分异构体,其分辨率低、重现性差的弊端更为明显。随着薄层色谱仪自动化程度的提高,定量测试结果的重现性和准确性也有所改善。

## 3 高效液相色谱法

高效液相色谱法(HPLC)以经典的色谱法为基础,引入了气相色谱法的理论和实验方法,流动相改为高压输送,采用高效固定相及在线检测手段发展而成的一种高效快速分离分析技术。从 20 世纪 70 年代初,研究者开始利用 HPLC 对花青素类化合物进行单组分成分的定性及定量研究。HPLC 可以在 30 min 内检测出 15 种花色苷的单组分成分,分辨能力与速度远远超过纸层析和薄层层析;基于一花色苷的含量与色谱图中的花色苷的峰面积成正比,HPLC 还可用于定量分析。HPLC 法分析时间短、分辨率高、热降解少,现已成为应用最广泛的花青素类物质分析方法之一<sup>[25]</sup>。Kähkönen 等<sup>[26]</sup> 采用 HPLC 法对越橘、黑醋栗、牛莓总花青素含量分别进行了测定。Séverine 等<sup>[27]</sup> 利用 HPLC 检测出欧越橘中含有 15 种花青素组分。岳喜庆等<sup>[28]</sup> 将 HPLC 与分子量校正系数(MWCF)计算方法相结合,采用双标样(C3G 和 P3G)分别对样品中具有对应母环的花青素进行了定量计算,避免了样品分子质量和花青素母环与标样不同而产生的影响,从而获得了更准确的鉴定结果。HPLC 定量法是将混合状态

的成分分离以后,再行定量,因此适用于花青素单组分成分或不同种材料花青素含量的定量。

超高效液相色谱(UPLC)与 HPLC 技术具有相同的分离原理。UPLC 基于 HPLC 原理并结合使用了新型耐压小颗粒填料、全新筛板及色谱柱硬件,其色谱柱的性能较 HPLC 柱有质的飞跃,与 HPLC 相比,分析的通量、灵敏度及色谱峰容量大幅度增加,并且可在保证较高分离度的同时实现快速的分离。

HPLC 和 UPLC 常常与各种光谱、质谱、核磁共振等技术联用,克服了缺少标准品、对复杂基质有局限性等缺陷,提高了鉴定的能力与准确性。

## 4 质谱分析法

质谱是 20 世纪初发展起来的物理分析方法。质谱是将高纯样品离子化,并依据质荷比( $m/z$ )不同的离子在电场或磁场中运动行为不同而对其进行分离,并获得样品的离子质量谱图。质谱分析可得到花色苷的分子离子峰及其相应的糖苷配基碎片峰和糖碎片峰,通过与标准样品质谱的对照或按各类分子的离子化规律解析质谱,判断试样中花青素类物质的结构,其优点是灵敏度高、线性范围宽和稳定性好。因为质谱分析法仅可分析高纯样品,所以其常与其他分离技术联合使用。

最新发展起来的电喷雾离子化(ESI)质谱分析法采用软电离,能直接测定热不稳定的极性化合物,并可控制离子的断裂,从而建立复杂提取物的“多酚指纹”<sup>[29]</sup>;基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术适于精确测定高分子量的分子,已成功应用于原花青素低聚物的研究,在反射模式下可分析到七聚物,在线性模式下可分析至九聚物<sup>[30]</sup>;氦气快原子轰击质谱可获得样品离子化后的分子离子峰等相关数据,该方法适用于极性大分子量化合物;电子轰击质谱(LC-EI-MS)和激光解吸/电离质谱(MALDI-MS)适用于分析极性大、热稳定性差和难挥发花青素类物质;飞行时间串联质谱(TOF-MS/MS)可在宽质量范围内实现高分辨,对复杂体系或混合物中化合物的鉴别非常有效。

## 5 核磁共振光谱法

核磁共振法是 20 世纪 90 年代迅速发展起来的新技术,是鉴别花青素类化合物中未知结构的有利工具。常用的<sup>1</sup>H-NMR 和<sup>13</sup>C-NMR 谱法可鉴定液态或溶液态的花青素类化合物结构,确定和区分物

质的几何构象、光学异构体,对花青素类物质的同分异构体及其糖苷和酰基化位点的分析较质谱分析法更具优势。NMR 技术具有分析快速、准确、分辨率高等优点,可用来研究化合物的三维结构,是鉴别未知物的有利工具。Caridi 等<sup>[31]</sup>使用氘化的二甲基亚砜(DMSO- $d_6$ )作为溶剂获得了洋葱的 NMR 光谱(<sup>1</sup>H 和<sup>2</sup>D 光谱),通过其与氘化溶液中残余的<sup>1</sup>H 信号对比而分类和定量了所含的槲皮素糖苷。Zhang 等<sup>[32]</sup>以氘化的二甲基亚砜(DMSO- $d_6$ )或甲醇( $CD_3OD$ )作为溶剂获得了核桃仁<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>C 的 NMR 光谱,鉴定了其所含的抗氧化物质。

由于核磁共振法所用设备昂贵、比高效液相色谱法检测灵敏度低<sup>[6]</sup>、所需纯样品量大(mg 级)、数据获取时间较长,因此应用受到很大限制。

## 6 毛细管区带电泳法

20 世纪 80 年代 Jorgenson<sup>[33]</sup>及 Shigeru 等<sup>[34]</sup>创立了现代毛细管区带电泳法。毛细管区带电泳是以毛细管为分离通道、高压直流电场为驱动力的新型液相分离技术,该方法基于毛细管两端加上一定的电压后,荷电溶质便朝着与其电荷极性相反的电极方向移动的原理。由于样品组分的淌度不同,其迁移速度也不同,各组分依次到达检测器被检出,最终获得按时间分布的电泳谱图。毛细管区带电泳主要适用于定性和定量高度水溶性的花青素类物质。其优点是灵敏度高、分辨率高、样品消耗少和溶剂需要量少等。Sáenz-López 等<sup>[35]</sup>采用毛细管区带电泳分析了酒龄在 1~14 年的红葡萄酒中的花青素种类。

毛细管区带电泳虽然易分离聚合色素,具有比 HPLC 更短的保留时间、更少的溶剂消耗和更低的成本,但由于毛细管检测池光程过短,且进入毛细管的待测样品体积过小,其灵敏度、分离能力和范围及结果重现性都较 HPLC 差<sup>[5]</sup>。另外,花青素类物质可能会由于毛细管区带电泳的外加电压或离子之间的相互作用而发生降解。

## 7 红外、近红外光谱法

早在 20 世纪 50 年代,国外的科学家就开始应用红外光谱研究花色苷,红外光谱法是根据分子内部原子间的相对振动和分子转动等信息来鉴定化合物并确定其分子结构的分析方法,其优点是特征性高、分析时间短、样品需要量少等。花色苷的红外光谱有苯环、含氧杂环、甲氧基、糖和羟基 4 个主要部

分。曾哲灵等<sup>[36]</sup>采用红外光谱法对玫瑰茄红色素的结构进行初步鉴定,推断玫瑰茄红色素为矢车菊葡萄糖苷类或飞燕草葡萄糖苷类色素。红外光谱法鉴定花青素类物质通常采用比较法,即将样品光谱图与标准图谱进行对比分析,因此需要大量的标准图谱作对照,这是该方法的主要限制因素。

近红外光谱是近年来逐渐发展起来的快速检测方法,该方法利用被测物的含量与近红外区内多个不同波长吸收峰面积的线性关系,可对待测样品进行快速、原位和无损的定性和定量检测。王姗姗<sup>[37]</sup>建立了近红外光谱数学模型,测定了不同品种蓝莓的花青素含量;王晓琴等<sup>[38]</sup>建立了石榴中花色苷定

标模型,分析了我国 5 个主要石榴产区的石榴中花色苷的含量。国外最近报道,采用近红外光谱法并结合多变量校正可较好地分析水果中的花青素<sup>[39]</sup>。近红外光谱分析的不足之处是测定灵敏度较低,相对误差较大,并且要求被测组分的含量应大于 0.1%,建模难度大。

## 8 多种分析技术的联用

表 2 总结了目前常用花青素分析方法的功能和目的,并对其优缺点和应用范围等进行了比较。由表 2 可见,仅采用一种方法很难准确表征花青素的结构,因此多种分析技术联用得到迅速发展。

表 2 花青素类化合物主要分析表征方法及优缺点对比

Table 2 Advantages and disadvantages of the analytical methods of anthocyanin compounds

序号 No.	方法 Method	主要功能 Function	主要优点 Advantage	主要缺点 Disadvantage	应用范围 Application
1	紫外可见光谱 UV-Vis spectrometry	定性识别和总量测定 Qualitative analysis and total amount determination	方法简单、成本低廉 Technically simple and low cost efficient	不能区分花青素类型 Types of anthocyanin can not be distinguished	简单的混合物体系 Simple mixture
2	纸层析和薄层层析 Paper chromatography and thin layer chromatography	定性识别 Qualitative analysis	快速,设备简单,成本低 Rapid analysis, simple equipment and low cost	分辨率和重现性较差,分析范围有限,且缺乏精确性 Low resolution, precision, and reproducibility	简单的混合物体系 Simple mixture
3	高效液相色谱 High performance liquid chromatography	定性识别和单个量测定 Qualitative analysis of single type of anthocyanin	速度快,分辨率高,灵敏度高,热降解少 Rapid analysis, high resolution, high sensitivity, and less thermal degradation	需标样,纯化过程易造成组分损失或降解,对复杂基质有局限性 Standard sample needed, loss or degradation of components	水溶性、非挥发性和热不稳定的花色苷 Anthocyanin with water-solubility, non-volatility, and thermal instability
4	超高效液相色谱 Ultra performance liquid chromatography	定性识别和单个量测定 Qualitative analysis of single type of anthocyanin	速度、灵敏度、分离度分别是 HPLC 的 9, 6, 2 倍 Speed, sensitivity, and separating degree are 9, 6, and 2 times of those of HPLC, respectively	需标样,纯化过程易造成组分损失或降解 Standard sample needed, loss or degradation of components	水溶性、非挥发性和热不稳定的花色苷 Anthocyanin with water-solubility, nonvolatility, and thermal instability
5	质谱 Mass spectrometry	定性识别 Qualitative analysis	灵敏度高,线性范围宽,稳定性好 High sensitivity, wide linear range, and high stability	不能确定未知化合物及同分异构体结构 Unknown compound and structure of isomers can not be determined	高极性、热稳定性差、难挥发的高纯度样品 High purity sample with high polarity, low thermo-stability, and volatility
6	核磁共振光谱 Nuclear magnetic resonance	定性识别未知物 Qualitative analysis for unknown compounds	程序简单,仪器的稳定性好,光谱易解译 Simple procedure, good stability, and easy interpretation	数据获取时间长,灵敏度相对较低 Long data acquisition time and low sensitivity	天然产物中未知花青素,同分异构体及复杂的酰化花青素 Unknown anthocyanin, isomers, and anthocyanin with complex acylation structure
7	红外光谱 Infrared spectrum	定性识别 Qualitative analysis	特征性高,快速,操作简单,不破坏样品,不需样品前处理 High specificity, rapid analysis, simple operation, nondestructive and pretreatment free	需标准图谱,灵敏度较低,相对误差较大,对被测组分的含量要求大于 0.1% Standard spectrum needed, low sensitivity, large relative error, and high content required	含苯环、含氧杂环、糖、羟基和甲氧基的花青素 Anthocyanin compounds with benzene, oxygen heterocyclic, sugar, hydroxyl, and methoxy

续表 2 Continued table 2

序号 No	方法 Method	主要功能 Function	主要优点 Advantage	主要缺点 Disadvantage	应用范围 Application
8	近红外光谱 Near infrared spectrum	定性识别和总量测定 Qualitative analysis and total amount determination	快速,不破坏样品,不需预处理,重现性好,适合于任何环境 Rapid analysis, does not destroy the sample, without pretreatment, good reproducibility and is suitable for any environment	需建立定标模型,相对误差较大,对被测组分的含量要求大于 0.1% Standard spectrum needed, low sensitivity, large relative error, and high content required	较复杂的花青素类混合物 More complex anthocyanin compounds
9	毛细管区带电泳 Performance capillary electrophoresis	定性识别 Qualitative analysis	分辨率高,样品消耗少,溶剂需要量少 High resolution, less sample consumption, and solvent	溶质浓度测定灵敏度低,重现性较差 Low sensitivity and reproducibility	高度水溶性的花青素 High water-solubility anthocyanin compounds

### 8.1 双技术联用

在花青素类物质分析的双技术联用中,常用的有高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)、高效液相色谱-紫外可见光谱(HPLC-UVVis)、毛细管电泳-质谱(CE-MS)、薄层层析-紫外可见光谱(TLC-UVVis)等,其中 HPLC-MS 结合了高效液相色谱的强分离能力与质谱的强鉴定能力,具有分析结果准确、检出限低的特点,克服了花色苷标准品缺少问题,适用于低含量花青素的定性和定量检测,广泛用于结构复杂的花青素,如原矢车菊素、原花青素、原花翠素和单宁等结构的鉴定与分析<sup>[40]</sup>。Yang 等<sup>[41]</sup>利用 HPLC-MS 发现,紫玉米中主要存在 6 种花青素,分别为矢车菊素-3-葡萄糖苷、天竺葵素-3-葡萄糖苷、芍药素-3-葡萄糖苷及与这 3 种花青素相应的丙二酸盐衍生物。不过,由于花青素仅在低 pH 条件下(pH≤3)比较稳定,而低 pH 值将抑制电喷雾质谱的离子化,这影响了质谱分析的效果,导致该联用技术的应用受到限制。此外,毛细管电泳-质谱联用具有高分离效能、强结构分析能力和高灵敏度等优点,弥补了毛细管区带电泳进样量小导致检测灵敏度较低的缺点,已广泛用于食品花青素的检测<sup>[6]</sup>。

石秀花等<sup>[42]</sup>利用纸层析和紫外-可见光谱联用鉴定出野玫瑰中的花青素,表明其花青素分别为芍药素-3-葡萄糖苷和飞燕草花色素-3-葡萄糖鼠李糖苷。毛建霏等<sup>[43]</sup>利用高效液相色谱-紫外光谱联用确定了紫甘薯中花青素的总含量。

### 8.2 多技术联用

联合应用高效液相色谱、红外吸收光谱、质谱、毛细管区带电泳、核磁共振波谱等多种方法和技术能够显著增强花青素类物质的分析能力。Acevedo 等<sup>[44]</sup>联用高效液相色谱、质谱和核磁共振波谱等鉴定了 4 种野葡萄品种(*Vitis vinifera*, *Vitis amurensis*, *Vitis cinerea* 和 *Vitis X champinii*)中的 33 种

花青素类物质,并首先发现了 p-香豆酸顺式异构体的衍生物(矮牵牛配基-,芍药素-和锦葵色素-3-(6-p-香豆酰)5-二糖苷)。Lee 等<sup>[45]</sup>联用高效液相色谱-二极管阵列检测-电喷雾质谱和核磁共振(<sup>1</sup>HNMR 和<sup>13</sup>CNMR)技术,检测出刺五加果实中的花青素主要为矢车菊-3-O-(2''-O-木糖)-葡萄糖苷。李颖畅等<sup>[46]</sup>联用紫外-可见光谱、红外光谱、质谱、薄层色谱和核磁共振(<sup>1</sup>HNMR 和<sup>13</sup>CNMR)技术,鉴定出自圣云蓝莓果中提取出的单体化合物为锦葵色素-3-半乳糖苷。孔令瑶等<sup>[47]</sup>利用液质联用技术(LC-MS)与毛细管电泳电化学检测(CE-ED)技术发现,黑米色素主要含有矢车菊素-3-葡萄糖苷和芍药素-3-葡萄糖苷 2 种花色苷。

高效液相色谱-二极管阵列检测-电喷雾质谱(HPLC-DAD-ESIMS)可直接对花青素类物质的提取液进行定性和定量,根据二级(或多级)质谱既可鉴定花青素苷元的类型,也可推测其糖苷化、酰基化和甲氧基化等结构。如 Garzón 等<sup>[48]</sup>利用 HPLC-DAD-ESIMS 测定了哥伦比亚野生越橘中的花青素和酚类组成;我国学者利用该技术已鉴定出黑树莓<sup>[49]</sup>、紫洋葱<sup>[50]</sup>、紫山药<sup>[51]</sup>、野生桑葚<sup>[52]</sup>、多叶羽扇豆<sup>[53]</sup>等多种植物中花青素的结构。

另外,串联分析也可提高分析能力。如 HPLC-MS/MS、UPLC-MS/MS 可对复杂样品进行实时分析,若 HPLC 无法充分分离其组成成分,则可通过 MS1 及 MS2 对目标化合物进行中性碎片扫描,以显著提高信噪比,从而对其进行鉴定。Goupy 等<sup>[54]</sup>和 Wiczowski 等<sup>[55]</sup>采用 UPLC-DAD-ESI-MS/MS 确定了番红花和紫甘蓝花青素的主要成分;李伟等<sup>[56]</sup>采用 UPLC-ESI-MS/MS 技术从黑粒小麦麸皮中分离并鉴定了 9 种花青素类物质。同为质谱技术,飞行时间串联质谱(TOF-MS/MS)具有分辨率高、质量范围宽、扫描快和灵敏度高等优点,已成为

重要的发展方向<sup>[57]</sup>。Barnes 等<sup>[58]</sup>联用 HPLC-ESI-IT-TOF-MS/MS 技术,从蓝莓中鉴别出了 25 种花青素。常虹等<sup>[59]</sup>用 HPLC-DAD-IT-TOF-MS/MS 联用技术推断了欧李花青素的主要组成。

## 9 结论与展望

花青素类物质鉴定技术已由纸层析、薄层层析等传统技术向超高效液相色谱、质谱、近红外光谱、核磁共振等多手段联用发展,使花青素类物质的定量以及结构复杂或含量较低的花青素类物质的结构鉴定更加准确、可靠和快速,为花青素资源的进一步开发利用奠定了基础。但由于这些先进技术的试验成本较高,普通实验条件下的应用受到限制,故应在以下方面进行深入研究。

(1) 探寻低成本、高效率、简便可行的花青素类物质的提取、分离纯化技术,以便对其进行准确鉴定。

(2) 进一步探索花青素类物质的结构,寻找新的结构特性及表征花青素类物质结构的相应方法。

(3) 研究与花青素类物质共存的有机物种类及其光谱特性,建立消除光谱干扰的新方法。

(4) 总结不同花青素单体的生物活性,寻求新的高选择性分析花青素的特性指标。

### [参考文献]

- [1] Renand S, Zorgeil M. Wine alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease [J]. *Lancet*, 1992, 339 (8808): 1523-1526.
- [2] Brouillard R. Anthocyanins as food colors [M]. New York: Academic Press, 1982: 1-40.
- [3] Escribano-Bailón M T, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J C. Anthocyanins in cereals [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1054(1/2): 129-141.
- [4] 刘邻渭. 食品化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 250-254. Liu L W. Food chemistry [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 250-254. (in Chinese)
- [5] Ignat I, Volf I, Popa V I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(4): 1821-1835.
- [6] Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M D L, Páez-Hernández M E, et al. Chemical studies of anthocyanins: A review [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(4): 859-871.
- [7] Harborne J B. The chromatographic identification of anthocyanin pigments [J]. *Journal of Chromatography A*, 1958, 1: 473-488.
- [8] Harborne J B. Spectral methods of characterizing anthocyanins [J]. *Biochem*, 1958, 70: 22-28.
- [9] 刘仁道, 张 猛, 李新贤. 草莓和蓝莓果实花青素提取及定量方

法的比较 [J]. *园艺学报*, 2008, 35(5): 655-660.

Liu R D, Zhang M, Li X X. Comparisons of extraction solvents and quantitative methods for analysis of anthocyanins in strawberry and blueberry fruits [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(5): 655-660. (in Chinese)

- [10] Fuleki T, Francis F J. Quantitative methods for anthocyanins extraction and determination of total anthocyanin in cranberries [J]. *Journal of Food Science*, 1968, 33(1): 72-77.
- [11] Harbourne N, Jacquier J C, Morgan D J, et al. Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods [J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(1): 204-208.
- [12] 秦含章. 葡萄酒分析化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991. Qin H Z. Wine in analytical chemistry [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1991. (in Chinese)
- [13] 唐 琳, 李子江, 赵 磊, 等. 两种 pH 值法测定玫瑰花花色苷含量的比较 [J]. *食品科学*, 2009, 30(18): 310-313. Tang L, Li Z J, Zhao L, et al. Comparison of two pH methods for determining anthocyanins from flower petals of rose [J]. *Food Science*, 2009, 30(18): 310-313. (in Chinese)
- [14] 张泽生, 林纪伟, 王志平, 等. 比色法测定不同产地黑豆皮中花青素含量 [J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(5): 143-145, 156. Zhang Z S, Lin J W, Wang Z P, et al. Determination of anthocyanidin from the seed hulls of black soybean from varied areas using colorimetry [J]. *Food Research And Development*, 2012, 33(5): 143-145, 156. (in Chinese)
- [15] 陈 琼, 陆瑞琼. 茶树芽叶花色苷含量测定方法的研究 [J]. *北京工商大学学报: 自然科学版*, 2011, 29(2): 41-44. Chen Q, Lu R Q. Method for quantitative determination of anthocyanins of purple tea leaves [J]. *Journal of Beijing Technology and Business University: Natural Science Edition*, 2011, 29(2): 41-44. (in Chinese)
- [16] 翦 祎, 韩舜愈, 张 波, 等. 单一 pH 法、pH 示差法和差减法快速测定干红葡萄酒中总花色苷含量的比较 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(23): 323-325, 423. Jian W, Han S Y, Zhang B, et al. Comparison of single pH method, pH-differential method and subtraction method for determining content of anthocyanins from red wine [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(23): 323-325, 423. (in Chinese)
- [17] 张 玥, 龙 君, 文 云, 等. 紫色马铃薯花色苷定量分析方法的比较 [J]. *湖南农业科学*, 2012(9): 25-28. Zhang Y, Long J, Wen Y, et al. Comparison of quantitative analysis methods for anthocyanin in purple potato [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2012(9): 25-28. (in Chinese)
- [18] Lee J, Durst R W, Wrolstad R E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study [J]. *AOAC Int*, 2005, 88(5): 1269-1278.
- [19] Lee J, Rennaker C, Wrolstad R. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric

- methods [J]. Food Chemistry, 2008, 110(3): 782-786.
- [20] Prodanov M P, Dominguez J A, Blázquez I, et al. Some aspects of the quantitative/qualitative assessment of commercial anthocyanin rich extracts [J]. Food Chemistry, 2005, 90(4): 585-596.
- [21] Grisebach H. Anthocyanins as food colors [M]. New York: Academic Press, 1982: 69-92.
- [22] 毛建霏, 付成平, 郭灵安, 等. 可见分光光度法测定紫甘薯总花青素含量 [J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(2): 101-104.  
Mao J F, Fu C P, Guo L A, et al. Determination of total anthocyanidins in purple sweet potato by vis spectrophotometry [J]. Food and Fermentation Technology, 2010, 46(2): 101-104. (in Chinese)
- [23] 王本晓, 彭向前, 乔伟, 等. 玫瑰花中花色苷的分析方法研究 [J]. 食品与药品, 2009, 11(11): 42-44.  
Wang B X, Peng X Q, Qiao W, et al. Study on assay of anthocyanins in flowers of *Rosa rugosa* Thunb [J]. Food and Drug, 2009, 11(11): 42-44. (in Chinese)
- [24] 王娜, 褚衍亮, 汪君, 等. 樟树果红色素的提取及对果蝇的毒理性研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(11): 231-235.  
Wang N, Chu Y L, Wang J, et al. Study on extraction and toxic properties to *Drosophila melanogaster* of red pigment from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl [J]. Food Science and Technology, 2009, 34(11): 231-235. (in Chinese)
- [25] Farzad M, Griesbach R, Weiss M R. Floral color change in *Viola cornuta* L. (Violaceae): A model system to study regulation of anthocyanin production [J]. Plant Science, 2002, 162(2): 225-231.
- [26] Kähkönen M P, Heinämäki J, Ollilainen V, et al. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities [J]. J Sci Food Agric, 2003, 83(14): 1403-1411.
- [27] Séverine T, Catherine F, Odile T, et al. Bioavailability of a bilberry anthocyanin extract and its impact on plasma antioxidant capacity in rats [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006, 86(1): 90-97.
- [28] 岳喜庆, 张超, 王宇滨, 等. 双标样高效液相色谱法测定紫玉米花青素的含量 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(6): 126-129.  
Yue X Q, Zhang C, Wang Y B, et al. Determination of anthocyanin content of purple corn (*Zea mays* L.) by two standards HPLC method [J]. Food Research and Development, 2010, 31(6): 126-129. (in Chinese)
- [29] Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides [J]. Phytochemistry, 2000, 54(3): 237-256.
- [30] Oo C W, Pizzi A, Pasch H, et al. Study on the structure of mangrove polyflavonoid tannins with MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2008, 109(2): 963-967.
- [31] Caridi D, Trenerry V C, Rochfort S, et al. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography [J]. Food Chemistry, 2007, 105(2): 691-699.
- [32] Zhang Z, Liao L, Moore J, et al. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.) [J]. Food Chemistry, 2009, 113(1/2): 160-165.
- [33] Jorgenson J W. Zone electrophoresis in open-tubular capillaries [J]. Trends in Analytical Chemistry, 1984, 3(2): 51-54.
- [34] Shigeru T, Koji O, Teiichi A. Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary [J]. Analytical Chemistry, 1985, 57(4): 834-841.
- [35] Sáenz-López R, Fernández-Zurbano P, Tena M T. Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1052(1/2): 191-197.
- [36] 曾哲灵, 郝纯青, 邹强. 玫瑰茄红色素的纯化及其结构鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(7): 57-60.  
Zeng Z L, Hao C Q, Zou Q. Study on the purification and the structure of Roselle calyx red pigment [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(7): 57-60. (in Chinese)
- [37] 王姗姗. 蓝莓可溶性固形物、总酚和花青素近红外光谱检测技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2012: 37-40.  
Wang S S. Research on near infrared spectroscopy for rapid measurements of SSC, total phenols, and anthocyanins in blueberry [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2012: 37-40. (in Chinese)
- [38] 王晓琴, 赵武奇, 褚添天, 等. 石榴花色苷近红外光谱定量分析模型 [J]. 食品科学, 2013, 34(13): 75-78.  
Wang X Q, Zhao W Q, Chu T T, et al. Modeling for quantitative analysis of anthocyanins in pomegranate by Near-infrared Spectroscopy [J]. Food Science, 2013, 34(13): 75-78. (in Chinese)
- [39] Inácio M R, de Lima K M, Lopes V G, et al. Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration [J]. Food Chemistry, 2013, 136(3/4): 1160-1164.
- [40] Mullen W, Lean M E, Crozier A. Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 966(1/2): 63-70.
- [41] Yang Z, Zhai W. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC-MS [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(3): 470-476.
- [42] 石秀花, 徐金玉, 陶金华, 等. 野玫瑰色素的分离及结构鉴定 [J]. 农产品加工(学刊), 2010, 12(1): 71-73.  
Shi X H, Xu J Y, Tao J H, et al. Purification and identification of pigment in wild rose [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2010, 12(1): 71-73. (in Chinese)
- [43] 毛建霏, 周虹, 雷绍荣, 等. 高效液相色谱法测定紫甘薯花青素含量 [J]. 西南农业学报, 2012, 25(1): 123-127.  
Mao J F, Zhou H, Lei S R, et al. Detection of anthocyanins content in purple sweet potato by high performance liquid

- chromatographic [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 25(1): 123-127. (in Chinese)
- [44] Acevedo de la Cruz A, Hilbert G, Rivière C, et al. Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC-MS and LC-NMR [J]. Analytical Chemical Acta, 2012, 732: 145-152.
- [45] Lee J H, Lim J D, Choung M G. Studies on the anthocyanin profile and biological properties from the fruits of *Acanthopanax senticosus* (Siberian Ginseng) [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(1): 380-388.
- [46] 李颖畅, 吕春茂, 孟宪军, 等. 圣云蓝莓果中锦葵色素-3-半乳糖苷的结构鉴定 [J]. 食品科学, 2010, 31(23): 14-17.  
Li Y C, Lü C M, Meng X J, et al. Structural identification of malvidin-3-galactoside from St. cloud blueberry fruits [J]. Food Science, 2010, 31(23): 14-17. (in Chinese)
- [47] 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.  
Kong L Y, Wang Y, Cao Y H, et al. Analysis of components and structures of black rice pigment [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2008, 27(2): 25-29. (in Chinese)
- [48] Garzón G A, Narváez C E, Riedl K M. Chemical composition anthocyanins non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia [J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 980-986.
- [49] 赵晓燕, 马越, 张超. HPLC-DAD-ESI-MS 法研究黑树莓花色苷分子结构 [J]. 农产品加工(学刊), 2011, 12(1): 41-44.  
Zhao X Y, Ma Y, Zhang C. Determination of anthocyanins of black raspberry by HPLC-DAD-ESI-MS analysis [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2011, 12(1): 41-44. (in Chinese)
- [50] 刘玉芹, 赵先恩, 杜金华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定紫洋葱花色 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(6): 151-156.  
Liu Y Q, Zhao X E, Du J H, et al. HPLC-ESI-MS for the analysis of anthocyanins in red onion [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(6): 151-156. (in Chinese)
- [51] 于东, 叶兴乾, 方忠祥, 等. 采用 HPLC-DAD-ESI-MS 技术鉴定紫山药中的花色苷成分 [J]. 中国食品学报, 2010, 10(3): 213-218.  
Yu D, Ye X Q, Fang Z X, et al. Identification of anthocyanins in purple yam [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 10(3): 213-218. (in Chinese)
- [52] 陈亮, 辛秀兰, 袁其朋. 野生桑葚中花色苷成分分析 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(15): 307-310.  
Chen L, Xin X L, Yuan Q P. Analysis of compositions of anthocyanins in wild mulberry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(15): 307-310. (in Chinese)
- [53] 刘安成, 王庆, 余刚, 等. 多叶羽扇豆花色与花青苷分析 [J]. 西北农业学报, 2012, 21(3): 164-169.  
Liu A C, Wang Q, Yu G, et al. Flower color and anthocyanins of *Lupinus polyphyllus* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2012, 21(3): 164-169. (in Chinese)
- [54] Goupy P, Vian M A, Chemat F, et al. Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 44: 496-510.
- [55] Wiczkowski W, Szawara-Nowak D, Topolska J. Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity [J]. Food Research International, 2013, 51(1): 303-309.
- [56] 李伟, 姜媛, 唐晓珍, 等. 采用高效液相色谱串联质谱法分析黑粒小麦麸皮中的花色苷组成 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(7): 161-166.  
Li W, Jiang Y, Tang X Z, et al. HPLC tandem mass spectrometry to analysis anthocyanins composition from black wheat bran [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(7): 161-166. (in Chinese)
- [57] Barceló D. LC-tandem MS [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2005, 24(7): 564-565.
- [58] Barnes J S, Nguyen H P, Shen S, et al. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(23): 4728-4735.
- [59] 常虹, 兰彦平, 周家华, 等. 欧李花色苷的分离及其鉴定 [J]. 食品科学, 2011, 32(9): 59-63.  
Chang H, Lan Y P, Zhou J H, et al. Isolation and identification of anthocyanins in the fruits of *Prunus humilis* Bunge [J]. Food Science, 2011, 32(9): 59-63. (in Chinese)