

# 高效液相色谱 - 质谱检测红葡萄皮中花色苷\*

季梅<sup>1</sup> 李强<sup>2</sup> 娄红祥<sup>1\*\*</sup>

(1. 山东大学药学院, 济南 250012; 2. 山东大学附属省立医院妇产科, 济南 250012)

**摘要** 目的: 建立高效液相色谱 - 质谱联用(LC-MS)方法检测红葡萄皮中花色苷。方法: 采用 AichromBond C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相 A(2% 甲酸水溶液)和 B(乙腈)梯度洗脱(0 min: 10% B; 10 min: 25% B; 15 min: 30% B; 35 min: 50% B)。流速: 0.6 mL · min<sup>-1</sup> 检测波长: 530 nm, 二极管阵列检测器, 质谱检测设定为负离子模式。结果: 大泽山玫瑰香红葡萄皮中主要花色苷有 15 种。结论: LC-MS 法检测红葡萄皮中花色苷, 具有高的灵敏度和选择性, 方法准确可靠。

**关键词:** 高效液相色谱 - 质谱联用; 红葡萄皮; 花色苷; 类黄酮化合物; 花青素; 鉴定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)12-2240-04

## HPLC - DAD - MS - MS determination of anthocyanins in red grape skin \*

Ji Mei<sup>1</sup>, Li Qiang<sup>2</sup>, Lou Hong-xiang<sup>1\*\*</sup>

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC - DAD - MS - MS method for determination of anthocyanins from red grape skin. **Methods:** The major anthocyanins of grape skin was determined by HPLC - DAD - MS - MS method. AichromBond C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm 5 μm) was used in HPLC assay. Mobile phase A and B were 2% formic acid and acetonitrile, respectively. 0 min: 10% B; 10 min: 25% B; 15 min: 30% B; 35 min: 50% B. The flow rate was 0.6 mL · min<sup>-1</sup>. The detective wavelength was 530 nm. The PDA detector and negative ion mode of MS were adopted. **Results:** 15 anthocyanins were determined from the red grape skin of Mountain Daze. **Conclusion:** It is sensitive and selective to determine anthocyanins of grape skin with HPLC - MS method. The method is also accurate and reliable.

**Key words:** HPLC - DAD - MS - MS; red grape skin; anthocyanin; flavonoid; anthocyanidin; identify

花色苷是类黄酮化合物, 广泛存在于葡萄、蓝莓、樱桃、红橙、草莓、桑葚、紫甘薯等植物组织中<sup>[1]</sup>。花色苷的苷元是花青素(见图 1)。在葡萄属植物中常见的花青素有 6 种, 即天竺葵素(Pg)、矢车菊素(Cy)、飞燕草素(Dp)、芍药素(Pn)、牵牛花素(Pt)和锦葵素(Mv)。由于花青素不稳定, 在自然条件下常与 1 个或多个葡萄糖基、鼠李糖基、半乳糖基、木糖基、阿拉伯糖基等通过糖苷键形成花色苷, 花色苷中的糖苷基和羟基还可以与 1 个或几个分子的 *p*-香豆酸、咖啡酸、阿魏酸、对羟基苯甲酸等通

过酯键形成酰基化的花色苷<sup>[2]</sup>, 自然界中存在的花色苷近 600 余种<sup>[3]</sup>。

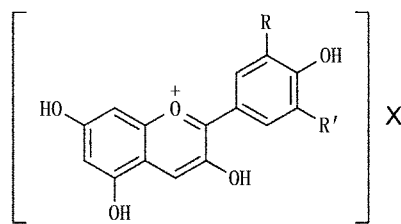


图 1 花青素分子基本结构

Fig 1 Structure unit of anthocyanidin

葡萄花色苷是优良的天然色素和抗氧化剂。目前对其抗氧化性及生理功能有较多的研究报道。清除体内自由基,降低氧化酶活性,抑制低密度脂蛋白氧化和血小板聚集,从而预防心血管疾病的发生<sup>[4,5]</sup>。同时研究表明花色苷具有抗畸变、抗肿瘤和较强的抗炎作用<sup>[6,7]</sup>。花青素防止毛细血管脆裂,改善循环系统机能<sup>[8]</sup>,是植物药的有效成分。

大泽山玫瑰香葡萄,色泽鲜丽,玫瑰香气宜人,富含花色苷。不同品种的红葡萄皮,其花色苷组成不同<sup>[9]</sup>。本研究采用高效液相色谱-质谱联用(LC-MS)的方法检测大泽山玫瑰香红葡萄皮中的花色苷。

### 1 材料与方 法

**1.1 仪器与试剂** Agilent 1200 高效液相色谱仪(德国 Agilent Technologies 公司),配备二极管阵列检测器(DAD);API 4000 型串联四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)及 Analyst 1.3.1 数据处理系统(美国 Applied Biosystem Sciex 公司)。对照品购自 Sigma 公司,红葡萄从平度大泽山采购,乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

### 1.2 方 法

**1.2.1 色谱条件** 色谱柱: AichromBond C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm 5 μm);流动相: 乙腈(A)、2% 醋酸溶液(B) 梯度洗脱(0 min: 10% B; 10 min: 25% B; 15 min: 30% B; 35 min: 50% B)。流速: 0.6 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长: 530 nm;柱温: 25 °C;进样量: 10 μL。

**1.2.2 质谱条件** 电喷雾(ESI)离子源;离子源温度为 500 °C;电喷雾电压(1S)为 4.5 kV;气帘气(CUR)为 0.14 MPa;雾化气(GS1)为 0.24 MPa;辅助气(GS2)为 0.35 MPa;负离子方式检测。

### 2 样品溶液的制备

选择大泽山玫瑰香红葡萄(9 月份采摘),将皮剥离,避光通风处自然干燥、粉碎,过 40 目筛,称 5 g 干皮置 100 mL 三角瓶中,加入甲醇 50 mL 浸泡 24 h<sup>[8]</sup>,超声(60 kHz)提取 2 次,每次 20 min,合并滤液,用旋转蒸发仪减压浓缩至膏状,正丁醇萃取 3 次,每次 15 mL,合并萃取液,减压浓缩至 20 mL,取 1.5 mL,8000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清液,经 0.45 μL 滤膜过滤,备用。

### 3 结构鉴定与分析

红葡萄皮中花色苷成分复杂,较难分离,通过一系列预实验,以乙腈和水为流动相,进行甲酸不同添加量的梯度洗脱优化。结果显示,流动相 A 为 2% 甲酸浓度时,样品中花色苷成分分离度好,基线平稳,分离效果理想。通过化合物的色谱保留时间、紫外最大吸收波长,并进一步通过质谱的分子离子峰和碎片离子峰与对照品或参考文献进行比对,鉴定了 15 个花色苷。其中峰 1,4,7,8,9,12,14 对应的 7 个化合物的鉴定是通过与对照品的色谱、质谱数据比对得到证明;峰 2,3,5,6,10,11,13,15 对应的 8 个化合物通过与文献的色谱、质谱数据比对得以验证<sup>[10-12]</sup>,见图 3-A~H。

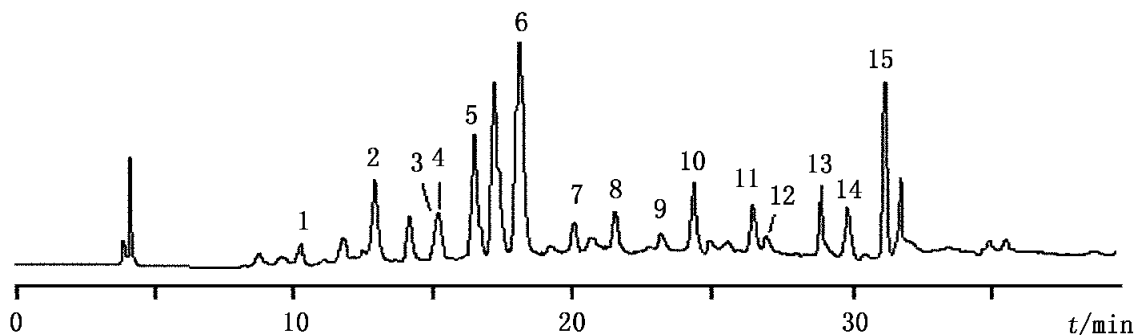


图 2 红葡萄皮样品高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of anthocyanins in red grape skin

1~15. 同表 1 (same as Tab 1)

### 4 结 论

红葡萄皮花青素是天然花色苷类色素,具有好的水溶性和鲜丽的色彩,同时具有优良的抗氧化特性,

对人体的多种疾病有非常突出的治疗、预防作用和保健功能,被众多消费者所喜爱,有广阔的市场前景。近年来从红葡萄皮中提取花色苷成为研究热点。本

表 1 高效液相色谱-质谱联用检测葡萄皮中花色苷  
Tab 1 HPLC-DAD-MS/MS of anthocyanins in grape skin

峰号 (peak No.)	M <sup>+</sup> m/z	M m/z	λ <sub>max</sub> /nm	t <sub>R</sub> /min	鉴定 (identity)
1	465	303	526	10.26	翠雀素-3-O-葡萄糖苷 (delphinidin 3-O-glucoside)
2	463	301	515	12.96	甲基花青素-3-O-葡萄糖苷 (peonidin 3-O-glucoside)
3	493	331	530	15.20	二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷 (malvidin 3-O-glucoside)
4	627	465, 303	520	15.20	翠雀素-3,5-二葡萄糖苷 (delphinidin 3-O-glucoside-5-O-glucoside)
5	653	287, 449	516	16.51	矢车菊素-3-O-(6-O-乙酰)-5-O-二葡萄糖苷 (cyanidin 3-O-(6-O-acetyl)-5-O-diglucoside)
6	641	317, 479	523	18.05	矮牵牛素-3,5-二葡萄糖苷 (petunidin 3-O-glucoside-5-O-glucoside)
7	801	331, 493	530	20.03	二甲花翠素-3-O-(6-O-对香豆酰)-5-O-二葡萄糖苷 (malvidin 3-O-(6-O-coumaroyl)-5-O-diglucoside)
8	611	449, 287	516	21.50	矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷 (cyanidin 3-O-glucoside-5-O-glucoside)
9	507	303, 465	521	23.21	翠雀素-3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷 (delphinidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside)
10	625	301, 463	513	24.18	甲基花青素-3,5-二葡萄糖苷 (peonidin 3-O-glucoside-5-O-glucoside)
11	639	331, 493	521	26.51	二甲花翠素-3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷 (malvidin 3-O-(6-O-p-coumaroyl)-glucoside)
12	655	331, 493	524	26.96	二甲花翠素-3,5-二葡萄糖苷 (malvidin 3-O-glucoside-5-O-glucoside)
13	505	301, 463	518	28.80	甲基花青素-3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷 (peonidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside)
14	771	625, 463	520	29.77	甲基花青素-3-O-(6-O-对香豆酰)-5-O-二葡萄糖苷 (peonidin 3-O-(6-O-coumaroyl)-5-O-diglucoside)
15	609	301, 463	523	31.18	甲基花青素-3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷 (peonidin 3-O-(6-O-coumaroyl)-glucoside)

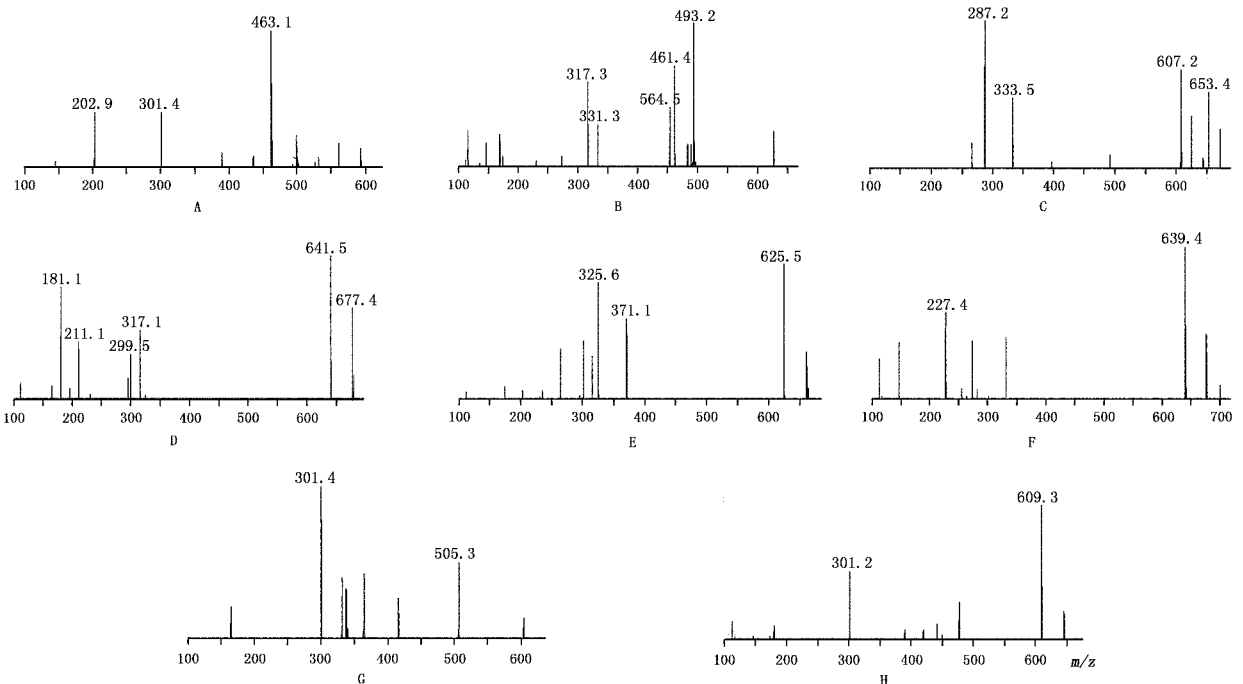


图 3 红葡萄皮样品中花色苷的质谱图 (A~H 分别与色谱图中峰 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 15 相对应)

Fig 3 MS spectra of anthocyanins in red grape skin (A to H is corresponding with Chromatography peak 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 15 respectively)

A. 甲基花青素-3-O-葡萄糖苷 (peonidin 3-O-glucoside) B. 二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷 (malvidin 3-O-glucoside) C. 矢车菊素-3-O-(6-O-乙酰)-5-O-二葡萄糖苷 (cyanidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside-5-O-glucoside) D. 矮牵牛素-3,5-二葡萄糖苷 (petunidin 3,5-diglucoside) E. 甲基花青素-3,5-二葡萄糖苷 (peonidin 3,5-diglucoside) F. 二甲花翠素-3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷 (malvidin 3-O-(6-O-p-coumaroyl)-glucoside) G. 甲基花青素-3-O-(6-O-乙酰)葡萄糖苷 (peonidin 3-O-(6-O-acetyl)-glucoside) H. 甲基花青素-3-O-(6-O-对香豆酰)葡萄糖苷 (peonidin 3-O-(6-O-coumaroyl)-glucoside)

实验首次通过 HPLC - DAD - MS - MS 对葡萄皮中花色苷进行检测,该方法方便、快速、可靠,可为葡萄及相关产品生产标准及质量标准制定提供依据。

参考文献

1 Jackman R ,Yada R ,Tung M *et al.* Anthocyanins as food colorants a review. *J Food Biochem* ,1987 ,11(3) : 201  
 2 YANG Xiu - juan( 杨秀娟) ZHAO Xiao - yan( 赵晓燕) ,MA Yue ( 马越) *et al.* The advancement of anthocyanins( 花青素研究进展) . *China Food Add( 中国食品添加剂)* 2005 A: 40  
 3 Huang ZL ,Wang B ,Paul W. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC - ESI - MS. *LWT - Food Sci Technol* , 2009( 42) : 819  
 4 Pastrana - Bonilla E ,Akokh CC ,Sellappan S *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J Agricul Food Chem* , 2003 ,51( 18) : 5497  
 5 Van de Wiel A ,van Golde PHM ,Hart HCh. Blessings of the grape. *Eur J Int Med* 2001 ,12: 484  
 6 Greenspan P ,Bauer JD ,Pollock SH *et al.* Antiinflammatory properties of the muscadine grape( *Vitis rotundifolia*) . *J Agric Food Chem* , 2005 ,53: 8481

7 Park SJ ,Shin WH ,Seo JW *et al.* Anthocyanins inhibit airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine asthma model. *Food Chem Toxicol* 2007 A5( 8) : 1459  
 8 JIN Hong - yu( 金红宇) ,TIAN Jin - gai( 田金改) ,DU Qing - peng( 杜庆鹏) . HPLC Determination of cyanidin chloride in Difaming tablets( HPLC 法测定递法明片中氯化花青素的含量) . *Chin J Pharm Anal( 药物分析杂志)* 2005 25( 5) : 505  
 9 Sandra P ,Maria TL ,Giuseppe G *et al.* Rapid screening for anthocyanins and anthocyanin dimers in crude grape extracts by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* , 2009 ,1216: 3864  
 10 HaiBo W ,Edward JR ,Anil J ,Shrikhande. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2003 51: 1839  
 11 Liang ZC ,Wua BH ,Fan PG , Anthocyanin composition and content in grape berry skin in Vitis germplasm. *Food Chem* ,2008 ,111: 837  
 12 Mark O ,Downey ,Simone R. Simultaneous separation by reversed - phase high - performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *J Chromatogr A* 2008 ,1201: 43

( 本文于 2011 年 1 月 28 日收到)

## 中国药检学术期刊 60 华诞纪念 暨 2011 年《药物分析杂志》编委( 扩大) 会圆满召开

中国药检学术期刊 60 华诞纪念暨 2011 年《药物分析杂志》编委( 扩大) 会议于 2011 年 11 月 13 日在浙江省绍兴市圆满召开。本次会议得到了中国食品药品检定研究院的大力支持。参加会议的有来自全国各地的《药物分析杂志》编辑委员会成员及特邀专家 120 余名。

会议由《药物分析杂志》主编金少鸿主持。中国食品药品检定研究院院长、《药物分析杂志》名誉主编李云龙到会并做了重要讲话,他要求编委会成员发扬 60 年学术期刊办刊人的优良传统,提高办刊能力和水平,加强编辑队伍自身建设,继续办好品牌学术期刊,为广大药物分析专业技术工作者、管理者搭建学术交流平台。为药理学学科发展服务,为药品质量监管服务,为人民用药安全有效服务。

中国食品药品检定研究院副院长、《药物分析杂志》副主编李波介绍了本次会议的目的、意义和内容安排。本次会议,一是纪念中国药检学术期刊办刊 60 周年,回顾中国药检历经艰辛、始终不渝坚持办学术期刊的历程,回顾《药物分析杂志》为推动药物分析学科发展,为促进我们行业技术进步所作的努力;二是总结本届编委会换届三年来的工作,并就期刊发展面临的挑战和需要努力的方向汇报工作规划。李波副院长代表中国食品药品检定研究院《药物分析杂志》编辑部对到会的编委专家表示衷心的感谢,对长期以来为本刊发展作出贡献的编委专家表示诚挚的敬意。同时希望编委专家对期刊发展提出建议,并希望今后能得到编委专家们更多的支持和帮助。

田颂九副主编回顾了从《药检工作通讯》到《药物分析杂志》的发展历史。金少鸿主编解读了新修订的编委会章程及编委增补情况,并代表编委会常委会对近年来贡献突出的编委专家给予了表扬;曾苏副主编介绍了药物分析杂志新增栏目和内容设想;粟晓黎副主编汇报编委会工作和期刊管理及发展思路;陈立亚编审讲解编委会工作标准;赵慧芳编辑介绍新采编系统功能。

本次会议取得预期效果。中国药检 60 年的办刊历程已为《药物分析杂志》竖立了里程碑,必将激励《药物分析杂志》在新的起点上,继续以编委专家为依托,共同努力,去迎接更好的明天。

中国食品药品检定研究院信息中心供稿