

高效液相色谱 - 串联质谱法分离鉴定 黑莓花色苷

王卫东^{1,2}, 李超¹, 许时婴^{2,*}

(1. 徐州工程学院食品工程学院, 江苏 徐州 221008; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用高效液相色谱与二极管阵列检测器/电喷雾质谱联用技术研究了黑莓中的花色苷类化合物, 分离鉴定出四种花色苷, 均为矢车菊素花色苷。除了一种花色苷是由阿拉伯糖和矢车菊合成苷外, 其他花色苷的糖基均为葡萄糖, 并且有两种花色苷和脂肪酸发生酰化。矢车菊 3-*O*-葡萄糖苷是黑莓中的主要花色苷, 占全部色素含量的 76.92%, 矢车菊 3-*O*-阿拉伯糖苷、矢车菊 3-*O*-丙二酸酐葡萄糖苷和矢车菊 3-*O*-草酸酐葡萄糖苷含量依次为 5.57%、2.76% 和 14.75%。

关键词: 黑莓; 花色苷; 高效液相色谱-串联质谱(HPLC/ESI-MS/MS)

High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Anthocyanins in Blackberry Fruit

WANG Wei-dong^{1,2}, LI Chao¹, XU Shi-ying^{2,*}

(1. College of Food Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China ;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The anthocyanin compositions in blackberry fruit were isolated using high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a lichrospher C₁₈ column and a DAD detector and characterized by UV spectrometry, gas chromatography (GC) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). A total of 4 anthocyanins were found to be isolated on the C₁₈ column. Among them were cyanidin (Cy) 3-*O*-glucoside (76.92%), Cy 3-*O*-arabinoside (5.57%), Cy 3-*O*-malonylglucoside (2.76%) and Cy 3-*O*-dioxalylglucoside (14.75%).

Key words: blackberry; anthocyanin; high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0230-05

花色苷属于类黄酮化合物, 具有黄烺盐离子的基本结构, 是果蔬及其产品呈现从红色到蓝色的物质基础, 具有抑制血小板凝固, 预防血栓、心脏病, 抗癌, 延缓衰老等作用^[1-3]。黑莓(blackberry)富含花色苷和其他多酚类物质, 其提取物在体外具有很强的抗氧化活性^[4], 据报道, 每 100g 黑莓果实中的花色苷含量为 67.4~230mg^[5], 主要属于矢车菊类花色苷, 其中含量最多的矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷的含量占到花色苷总量的 80% 以上^[6-8]。此外, Dugo 等^[9]在黑莓中发现了天竺葵和锦葵色素的花色苷。由于黑莓品种繁多, 且野生及人工改良的种类、成熟度、气候以及种植条件都将导致花色苷含量和种类的巨大差异, 加之花色苷类物质标准品少, 因而, 对它进

行检测分析很困难。本实验拟通过高效液相色谱连接光电二极管阵列检测器和电喷雾质谱检测器联用技术(即液质联用, HPLC-DAD-ESI-MS)得到花色苷类物质的紫外光谱信息、分子量和分子结构的碎片信息, 以期测定黑莓中花色苷的成分及含量, 为今后黑莓花色苷的研究提供了一种准确且简便易行的方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

黑莓单冻(individually quick frozen, IQF), 品种为赫尔(Hull) 南京新得力食品有限公司。

甲醇(色谱纯) 国药集团化学试剂有限公司; L- 鼠

收稿日期: 2008-10-28

作者简介: 王卫东(1971 -), 男, 讲师, 博士, 研究方向为功能性食品添加剂及配料。E-mail: wwd.123@163.com

* 通讯作者: 许时婴(1940 -), 女, 教授, 研究方向为功能性食品添加剂开发与应用。E-mail: syxu2005@hotmail.com

李糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖和D-半乳糖标准品 Sigma 公司；其余化学试剂均为分析纯。

Waters 2690 高效液相色谱-质谱联用仪、Waters 996 DAD 检测器 美国 Waters 公司；Agilent 6890 型气相色谱仪 美国安捷伦公司；14A 型 Shimadzu GC-2010 气相色谱仪(配以氢火焰离子化检测器) 日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 花色苷提取

花色苷为水溶性色素，在中性或者碱性溶液中不稳定，因此常用含有 0.1%~1% (V/V) 的盐酸甲醇或乙醇溶液提取，其中酸有利于提高花色苷的稳定性，防止非酰基化的花色苷的降解。然而在提取液浓缩除去甲醇或乙醇的过程中，由于盐酸浓度的提高可能导致花色苷的降解。用丙酮提取花色苷的效率更高，重复性更好，而且在真空浓缩时使用的温度更低，因此本实验采用丙酮提取黑莓中的花色苷，提取液用 Sep-Pak C₁₈ 小柱纯化后进行 HPLC-DAD-ESI-MS 分析。

黑莓花色苷和多酚的提取参考 Trappey 等^[10]的方法进行。分别称取 10g 黑莓果肉、黑莓种子或者黑莓浆(将冷冻黑莓在 4℃ 解冻后打浆)，加入 20ml 丙酮，超声 10min(超声波功率 350W)。布氏漏斗抽滤后，残渣用 70% (V/V) 丙酮重复提取，直到提取液清澈无色。合并提取液，与氯仿以 1:2 (V/V) 混合，上层水相在 30℃ 下真空浓缩除去丙酮，用水定容到 25ml。

1.2.2 花色苷纯化

将 Sep-Pak-C₁₈ 固相微萃取小柱依次用含有 0.01% 盐酸的甲醇、乙酸乙酯和 0.01% 盐酸的水各 5ml 活化，取 2ml 花色苷提取液吸附在小柱上，用氮气吹 3min 后，先用 0.01% 盐酸的水 10ml 洗去柱子上吸附的糖、蛋白等水溶性物质，再用 5ml 乙酸乙酯洗脱非花色苷多酚类物质，花色苷用 0.01% 盐酸的甲醇洗脱收集。将甲醇洗脱液在 40℃ 下浓缩至干，溶解于 1ml 含有 0.01% 盐酸的甲醇中，以备液相色谱和质谱的测定。

1.2.3 花色苷水解

将 3ml 1.2.1 节中所得的提取液用 C₁₈ 小柱纯化后，浓缩至干，加入 6mol/L 的盐酸溶液 3ml，充入氮气并加塞，在 100℃ 的水浴中加热水解 45min 后立即用冰水冷却。将水解液吸附在 Sep-Pak-C₁₈ 小柱上，糖基部分用 0.01% 的盐酸水溶液洗脱收集，花色苷部分用 0.01% 的盐酸甲醇溶液回收。

1.2.4 花色苷糖基部分的鉴定

水解回收的含糖基部分冷冻干燥，将干燥后的糖基加入试管中，再加入 10mg 的盐酸羟胺和 0.5ml 的吡啶，摇匀后于 90℃ 加热 30min，冷却，再加入 0.5ml 的

乙酸酐摇匀，在 90℃ 加热 30min，冷却后用于气相色谱分析。

色谱分析采用气相色谱仪(配以氢火焰离子化检测器)；色谱柱为石英毛细管柱(DB-1701, 30m × 0.53mm)，汽化室温度 250℃，检测器温度 260℃；空气流量 400ml/min，H₂ 流量 47ml/min，氮气压力 64.9kPa，流量 10ml/min；分流比为 30:1，进样量 0.5μl；程序升温：起始温度 120℃，停留 2min，以 10℃/min 升温至 190℃，停留 2min，以 3℃/min 升温至 240℃，停留 5min。

1.2.5 液相色谱和质谱条件

液相色谱条件：色谱柱：Lichrospher C₁₈ 柱(2.0 × 250mm, 5μm)；流动相：A 液为甲醇，B 液为 0.4% 的甲酸。线性梯度洗脱：0~30min，A 液从 5% 升至 40%；30~40min，A 液从 40% 升至 80%。流速：0.3ml/min。柱温 35℃，进样量 10μl。DAD 检测器，200~700nm 全扫描。

质谱条件：正离子扫描(ESI⁺, m/z 200~1200)，毛细管电压：3.99kV；锥孔电压：25V；光电倍增器电压：650V；离子源温度：100℃；脱溶剂气温度：250℃。

2 结果与分析

2.1 黑莓花色苷提取液的液相色谱和紫外光谱

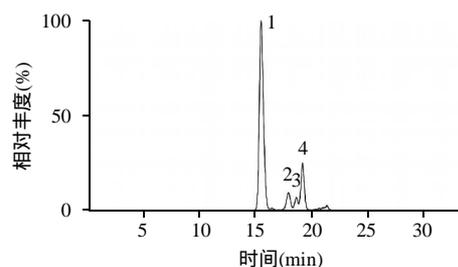


图1 黑莓花色苷提取物的高效液相色谱图(检测波长 520nm)
Fig.1 HPLC chromatogram of blackberry anthocyanin extract (detected at 520 nm)

表1 黑莓花色苷提取物的液相色谱和光谱特性

Table 1 Liquid chromatographic and spectral characteristics of anthocyanins from blackberry

峰号	保留时间 (min)	Vis-max* (nm)	A ₄₄₀ /A _{Vis-max} (×100)	相对含量 (%)
1	15.5	516	33.81	76.92
2	18.0	519	32.57	5.57
3	18.7	519	33.31	2.76
4	19.2	519	31.86	14.75

注：* 可见光区最大吸收波长。

图1为黑莓花色苷提取物以 520nm 为检测波长时的高效液相色谱图，检测到 4 个主要的色谱峰，各个色谱峰的保留时间、光谱信息和相对含量见表 1。由表 1 可

见,峰1(保留时间 15.5min)占了总峰面积的 76.92%, 峰2、3、4 分别占总峰面积的 5.57%、2.76% 和 14.75%。

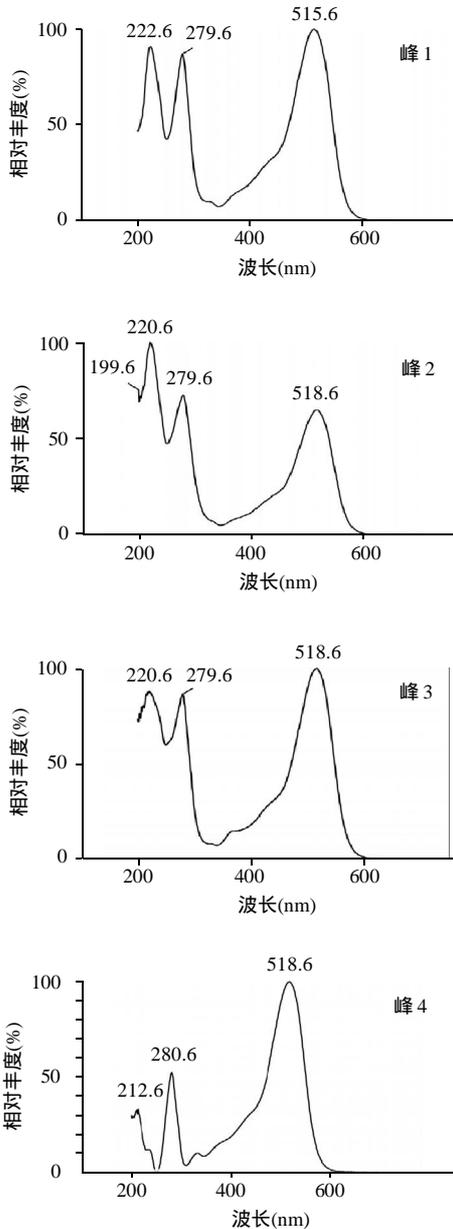


图2 色谱峰1、2、3、4的紫外-可见吸收图谱
Fig.2 UV-Vis spectra of peaks 1, 2, 3 and 4 (see Fig.1)

紫外-可见光谱很早就被人们应用于花色苷的结构鉴定。花色苷是类黄酮化合物,在280nm和520nm左右的两个波长处有特征吸收峰,而干扰花色苷分析的其他类黄酮化合物(如黄酮、黄烷酮、黄酮醇、黄烷醇等)在紫外区300~350nm和240~285nm有特征吸收峰,因此通过测定多酚类物质的最大吸收波长即可判断其是否为花色苷类多酚。图1中四个色谱峰的紫外-可见光谱图见图2。由图2可知,这四个色谱峰在510~520nm处都有最大吸收,因此可以确定它们都是花色苷类化

合物。

花色苷的紫外吸收光谱还可提供花色苷元、糖基取代模式的信息。花色苷分子中C3羟基总是以糖基化形式存在,进一步的糖基化可以发生在C5上的羟基,也可能发生于C7、C3'、C5'上的羟基。根据Harborne^[11]的研究,花色苷的 A_{440} 与 $A_{\text{vis-max}}$ 的比值与糖基的取代位置有关,C3、C5取代双糖花色苷的 $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ 值是C3取代单糖花色苷的一半,因此根据 $A_{\text{vis-max}}$ 与 A_{440} 的比值,结合查阅相关文献就可以判断糖基的位置。由表1可见,四种花色苷的 $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ 值都在30%以上,根据Hong等^[12]的研究,双糖花色苷的 $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ 值小于20%,因此这些较高的值表明糖取代基处在花色苷的C3或C7上的羟基。四个色谱峰在300~330nm处都没有明显的吸收峰存在,说明花色苷分子中的糖没有和羟基苯乙烯酸发生酰化,有可能存在脂肪酸酰化(如果有酰化基团存在)^[11,13]。

2.2 花色苷酸水解后的糖基和配基

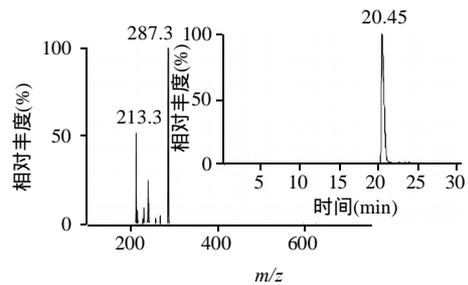


图3 花色苷水解后花色苷的HPLC(检测波长520nm)和ESI+-MS图
Fig.3 HPLC chromatogram and ESI+-MS spectrum of cyanidin in blackberry anthocyanins (detected at 520 nm)

花色苷在盐酸的作用下,糖基被水解,糖苷配基(水解产物的非糖部分,即花色苷)的液相色谱图见图3。从图3可以看出,黑莓中花色苷的糖苷配基只有一种。由于花色苷分子中不再含有糖基,极性减弱,所以保留时间延长到20.45min。从质谱图中可以看出,此花色苷的分子离子 $[M]^+$ 为 m/z 287.3,对应于矢车菊花色苷的分子量。黑莓中只有矢车菊类花色苷存在,使得在鉴别黑莓产品的真伪上更为方便,因为在其中掺入葡萄或草莓的成分,都会出现更多种类的花色苷。

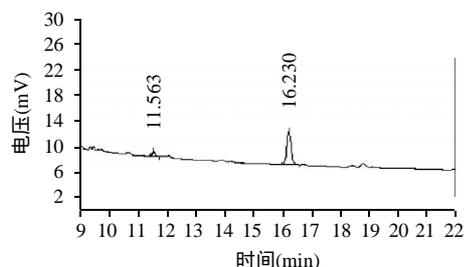


图4 花色苷经酸水解后糖基的气相色谱图
Fig.4 Gas chromatogram of sugar moiety in blackberry anthocyanins

花色苷水解后的糖基部分用气相色谱检测,结果如图4所示,图4中两个色谱峰的保留时间为11.563min和16.230min。根据标准糖样的保留时间,确定糖基是阿拉伯糖和葡萄糖。对峰面积进行归一化定量,其含量分别占总糖基的8.25%和91.75%。

2.3 花色苷的质谱分析

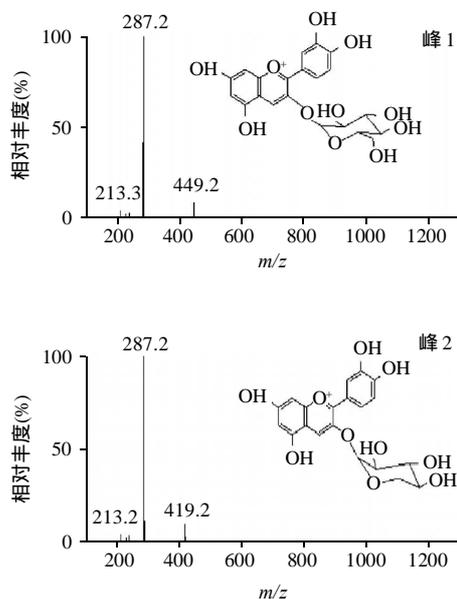


图5 黑莓花色苷(峰1和峰2)ESI⁺-MS图及结构

Fig.5 ESI⁺-MS spectra and structure of blackberry anthocyanins (peaks 1 and 2)

图1中峰1的质谱图见图5,其分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 449.2,碎片离子为 m/z 287.2,是由分子离子失去了一个质量数为162的中性碎片(脱水六碳糖基)而得。对应于矢车菊葡萄糖苷或者其他六碳糖苷。由于花色苷用盐酸水解后的糖中六碳糖只有葡萄糖,因此峰1所代表的花色苷是葡萄糖和矢车菊形成的苷。花色苷分子中的游离3-羟基可破坏发色团的稳定性,因此它总是以糖基化形式存在。综上所述,确定峰1为矢车菊3-*O*-葡萄糖苷。到目前为止,矢车菊3-*O*-葡萄糖苷被认为是黑莓中最常见和含量最高的花色苷^[8]。

峰2的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 419.2(图5),碎片离子为 m/z 287,是由 m/z 419.2失去一个质量数为132的中性碎片而形成。132正是五碳糖和花色苷成苷时失去一分子水时的质量数。结合花色苷水解物的气相色谱图,可知此五碳糖为阿拉伯糖。和峰1的花色苷一样,只有一个糖时,成苷位置在3位,因此峰2为矢车菊3-*O*-阿拉伯糖苷。Dugo等^[9]和Wada等^[14]也认为黑莓中与矢车菊成苷的五碳糖是阿拉伯糖,但Sapers等^[15]则认为五碳糖是木糖。

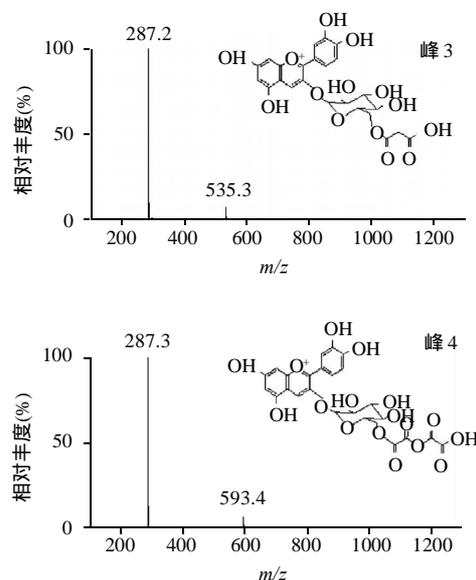


图6 黑莓花色苷(峰3和峰4)ESI⁺-MS图及结构

Fig.6 ESI⁺-MS spectra and structure of blackberry anthocyanins (peaks 3 and 4)

峰3的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 535.3(图6),碎片离子为 m/z 287,由 m/z 535失去一个质量数为248的中性碎片而形成。由于黑莓花色苷水解后的糖基只有葡萄糖和阿拉伯糖,所以这个中性碎片中的糖基可能是葡萄糖或者阿拉伯糖。如果是葡萄糖,则这个中性碎片可能为葡萄糖(质量数162)和丙二酸(质量数86)酰化形成的;如果248的中性碎片由阿拉伯糖形成,则它可能与苹果酸(质量数116)发生酰化。迄今为止,关于黑莓中的酰化花色苷尚未有苹果酸酰化的报道,因此推断峰3为矢车菊3-*O*-丙二酸酰葡萄糖花色苷,与Fang-Chiang^[16]的报道一致。

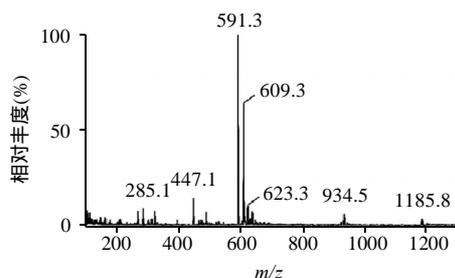


图7 黑莓花色苷(峰4)ESI⁻-MS图

Fig.7 ESI⁻-MS spectrum of blackberry anthocyanin (peak 4)

峰4的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 593.4(图6),碎片离子为 m/z 287,由 m/z 593失去一个质量数为306的中性碎片而形成。由于花色苷正离子质谱图中碎片信息很少,所以对峰4的分析又参照了其负离子质谱图(图7)。从负

离子质谱图可以看出, 峰4的[M-H]⁻ m/z 为591.3, 碎片离子 m/z 285 是矢车菊素的负离子, m/z 447 是矢车菊素-脱水葡萄糖的负离子, 由分子离子失去质量数为144的碎片形成, 因此推断峰4为矢车菊3-*O*-草酸酐酰葡萄糖花色苷。

3 结 论

采用高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术可有效地分离分析黑莓中花色苷类物质。实验结果表明, 黑莓中存在的花色苷为矢车菊3-*O*-葡萄糖苷、矢车菊3-*O*-阿拉伯糖苷、矢车菊3-*O*-丙二酸酐酰葡萄糖花色苷和矢车菊3-*O*-草酸酐酰葡萄糖花色苷。矢车菊3-*O*-葡萄糖苷为主要的花色苷, 其含量约占黑莓花色苷总量的80%。

参考文献:

- [1] CACACE J E, MAZZA G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol[J]. *J Food Sci*, 2003, 68(1): 240-248.
- [2] BRIDLE P, TIMBERLAKE C F. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects[J]. *Food Chem*, 1997, 58(1): 103-109.
- [3] KONG J M, CHIA L S, GOH N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 923-933.
- [4] WANGS Y, LIN H. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage [J]. *J Agric Food Chem*, 2000(8): 140-146.
- [5] MOYER R A, HUMMER K E, FINN C E, et al. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(2): 519-525.
- [6] LIDIJA J, MARIJAN S, MARTINA M K, et al. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices[J]. *Dtsch Lebensmittel-Rundsch*, 2007, 103(2): 58-64.
- [7] SELLAPPAN S, AKOH C C, KREWER G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grow blueberries and blackberries[J]. *J Agri Food Chem*, 2002, 50(8): 2432-2438.
- [8] STINTZING F C, STITZING A S, CARLE, et al. A novel zwitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (*Rubus laciniatus* Willd.)[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 396-399.
- [9] DUGO P, MONDELLO L, RRANTE G. Identification of Anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(8): 3987-3992.
- [10] TRAPPEY II A, BAWADI H A, BANSODE R R, et al. Anthocyanin profile of mayhaw (*Crotaegus opaca*) [J]. *Food Chem*, 2005, 91(4): 665-671.
- [11] HARBORNE J B. Comparative biochemistry of the flavonoids[M]. New York: Academic Press, 1967.
- [12] HONG V, WROLSTAD R E. Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC/photodiode array detection[J]. *J Agric Food Chem*, 1990a, 38: 698-708.
- [13] HONG V, WROLSTAD R E. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins[J]. *J Agric Food Chem*, 1990, 38(3): 708-715.
- [14] WADA L, OU B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(12): 3495-3500.
- [15] SAPERS G M, HICKS K B, BURGHER A M, et al. Anthocyanin patterns in ripening thornless blackberries[J]. *J Am Soc Hort Sci*, 1985, 111(6): 945-950.
- [16] FANG-CHIANG H J. Anthocyanin pigments, nonvolatile acid and sugar composition of blackberries[D]. Corvallis: Oregon State University, 2000.