

花色苷化学研究进展

郑杰^{1,2}, 丁晨旭¹, 赵先恩³, 索有瑞^{1*}¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ²中国科学院研究生院, 北京 100049; ³山东省科学院分析测试中心, 济南 250014

摘要: 本文以近期研究报道作为基础从花色苷的化学性质、提取与分离技术、鉴定技术三个方面对花色苷化合物的化学研究进展做一系统综述。

关键词: 花色苷; 高效液相色谱; 高速逆流色谱; 质谱; 核磁共振; 进展

中图分类号: R284; Q949.777.7

文献标识码: A

Review of Anthocyanins Chemical Studies

ZHENG Jie^{1,2}, DING Chen-xu¹, ZHAO Xian-en³, SUO You-rui^{1*}

¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; ²Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³Shandong Analysis and Test Center, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

Abstract: Anthocyanins are a kind of widely spread natural colorant, which have raised great interest due to its potent physiological and nutritional effects. Although the great potential of application that anthocyanins represent for food, pharmaceutical and cosmetic industries, their use has been limited because of lack of knowledge about its chemical properties, deficient extraction and identification technology. Currently, many researches are focused on resolving the difficulties. In this paper, the recently advances in anthocyanins research filed are summarised from three parts: anthocyanins chemical characterizations; extraction and separation technologies; and identification methods.

Key words: anthocyanins; high performance liquid chromatography; high speed countercurrent chromatography; mass spectrometry; nuclear magnetic resonance; review

花色苷为一类自然界中广泛分布的类黄酮类天然水溶性色素, 其主要存在于花卉、果实及有色叶片中。大量研究表明花色苷类化合物具有显著的生理活性: 抗自由基^[1]、改善视力^[2,3]、预防心血管疾病^[4,5]、提高认知能力^[6]、抗肿瘤^[7,8]、抗突变^[9]等。在食品安全问题日益受到人们重视的情况下, 花色苷作为一种天然染料, 其低毒性、色彩自然艳丽及资源可再生等特点在食品、化妆品及药品行业得到逐步应用。

花色苷的母核结构为花色素, 其结构如图1所示^[10]。据报道现已发现的花色素与花色苷分别到达23和600余种^[10,11]。其中天竺葵素(Pelargonidin)、矢车菊素(Cyanidin)、飞燕草素(Delphinidin)、芍药素(Peonidin)、矮牵牛素(Petunidin)和锦葵素

(Malvidin) 是自然界中分布最广的花色素, 大部分的花色苷都由此六种花色素衍生而来。花色苷的种类多样性赋予了其广泛的生物活性, 但同时也使该类化合物的提取与分析变得十分困难。过去对于花色苷类化合物的提取一般采用溶剂提取法, 而对于花色苷的定量定性则以薄层层析(Thin Layer Chromatography)以及紫外可见光谱法(Ultra Violet Visible Spectrometry)作为常规分析手段。随着分析技术的发展, 上述技术已不能满足当前生物样品中花色苷类化合物分析的真实性与准确性要求。本文主要根据近年来花色苷化合物的研究进展, 从化学性质、提取与分离以及结构鉴定三个方面对其进行系统综述。

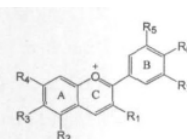


图1 花色苷母核

Fig. 1 General structure of anthocyanins

收稿日期: 2009-11-06

接受日期: 2010-06-12

基金项目: 国家自然科学基金(30873158); 青海省重大科技专项(2009A2-2)

* 通讯作者 Tel: 86-971-6143857; E-mail: yrsuo@nwipb.ac.cn

种类 Category	取代类型 Substitution type						
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Cyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Delphinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Peonidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Petunidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH
Malvidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
Apigeninidin	H	OH	H	OH	H	OH	H
Arrabidin	H	H	OH	OH	H	OH	OMe
Aurantininidin	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Capensinidin	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe
Carajurin	H	H	OH	OH	H	OMe	OMe
Europinidin	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH
Hiesutidin	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe
3'-Hydroxyarrabidin	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe
6-Hydroxycyanidin	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H
6-Hydroxypelargonidin	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
6-Hydroxydelphinidin	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH
Luteolin	H	OH	H	OH	OH	OH	H
5-Methylcyanidin	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H
Pulchellidin	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH
Riccionidin A	OH	H	OH	OH	H	OH	H
Rosinidin	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H
Tricetinidin	H	OH	H	OH	OH	OH	OH

1 花色苷的化学性质

1.1 花色苷的化学结构

花色苷的共轭结构使其在紫外与可见光区具有显著吸收(520 ~ 545 nm ,275 ~ 285 nm) ,这是花色苷具有绚丽的色彩的主要原因^[12]。自然界中游离形式的花色苷十分少,糖苷化是其主要存在形式,其中以 C₃、C₅ 和 C₇ 位羟基的糖苷化为主。糖残基主要分为单糖及双糖,图 2 中罗列出花色苷的主要糖残基。Nicoue 等^[13] 等从野生蓝莓中分离并鉴定了 49 种花青素,其中除了常见的葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖,还发现了新的乙糖与戊糖,但未鉴定出糖残基的种类,这说明花色苷的糖苷化取代类型不限于图 2 中所列种类。花色苷的酰基化也较为常见,酰基化基团有: 乙酸、丙二酸、香豆酸、芥子酸、阿魏酸、没食子酸、草酸、丁二酸、苹果酸、咖啡酸和琥

珀酸^[14-16]。除此之外 Florian^[17] 曾报道从黑莓中发现了一种新的酰化矢车菊花色苷: Cyanidin 3-O-(6'-dioxalylglucoside) 。Fumi^[18] 也报道发现了一种少见的酰化锦葵素花色苷: Malvidin 3-O-[6'-(3''-hydroxy-γ-3''-methylglutaryl) -β-glucopyranoside]。目前仍有新的糖苷化或酰基化花色苷类化合物被发现,而且其中不乏高分子量的多聚体的报道。新化合物的发现对于理解花色苷类化合物代谢途径与分子调控机制有着重要意义,并为后续利用基因工程技术从改造植物中获取单一性高含量的目标产物打下理论基础。

1.2 花色苷的稳定性

花色苷类物质由于其结构的特殊性,其结构易受外界因素的影响。目前已知影响花色苷结构的主要因素有: 自身结构、pH、温度、溶剂体系和共色效应。

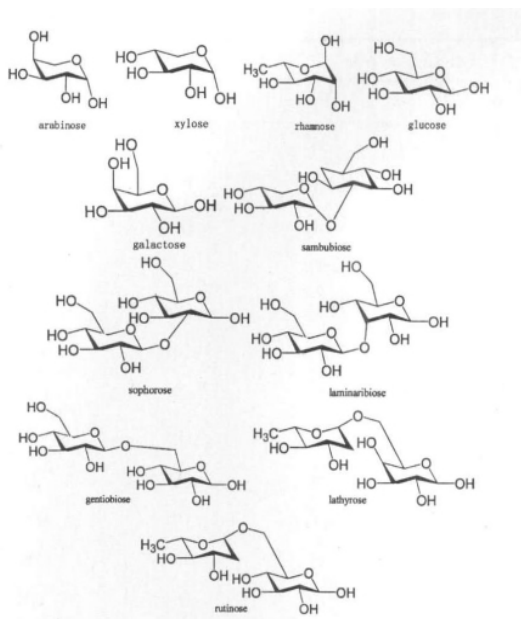


图2 花色苷中常见的糖基取代类型

Fig. 2 Common mono- and disaccharides structure in anthocyanins

花色苷 B 环的结构与其稳定性有很大联系, B 环的羟基化或甲氧基化都会使其在中性环境下稳定性降低。Fleschhut 等^[19]曾报道中性条件下天竺葵素是最为稳定的花色素,同时其指出糖苷化有利于花色素的稳定性,原因是糖残基是富电子基团,这使花色苷的 C₂ 位免受亲核分子的攻击。酰基化增加了水等亲核分子进攻花色苷苷元的空间位阻,进一步使得花色苷稳定性增强。苷元 C₄ 位的取代基团也会加强其稳定性^[16]。

不同 pH 下,花色苷会表现不同的颜色。低 pH 下花色苷呈红色,在高 pH 时无色。这主要是由于花色苷的结构改变所致。在低 pH 下,花色苷主要是以离子形式存在。pH 为 2~4 时,花色苷主要以醌式结构存在,此时颜色为蓝色。pH 为 5~6 时,羟基进攻 C₂ 位,形成半缩醛化合物假碱,由于半缩醛化合物的不稳定性,假碱进而转变为查尔酮形式化合物。假碱与查尔酮都为无色^[20]。Torskangerpoll^[21]以三种不同的花色苷: cyanidin-3-O-glucoside、cyanidin-3-O-(2'-glucosylglucoside)-5-glucoside、cyanidin-3-O-[2'-(2''-sinapoylglucosyl)-6''-sinapoylglucoside]-5-O-glucoside 为研究对象。对此三种花色苷在不同 pH 条件下的色角、色饱和度、亮度、最大紫外可见光吸收波长及摩尔消光系数进行了系统研究及比较,结果表明酰基化的花色苷的稳定性优于

非酰化的花色苷。

温度对花色苷的稳定性有着很大影响。在一定条件下花色苷在溶剂体系中处于一种动态转变的平衡状态,温度的改变会影响其平衡常数,从而使得花色苷的存在形式趋于有利方向转变。低温时花色苷烔盐离子为优势形式,随着温度的升高,平衡偏向吸热的方向,假碱和查尔酮结构为花色苷的主要存在形式。Sadilova 等^[22]对来自三种植物的花色苷的花色苷的稳定性做过系统研究,其研究表明在高温 95℃ 的环境下 7 h 后大部分花色苷有显著的降解。而且戊糖苷比己糖苷更容易降解,酰化花色苷比非酰化花色苷在高温环境下稳定。

溶剂体系的不同也会影响花色苷的存在状态。质子型的溶剂使花色苷保持单体状态,颜色为红色。非质子型溶剂下花色苷会形成二聚体,颜色呈黄色^[23]。

Robinson 等^[24]发现在相似的 pH 条件下,相同的花色苷在不同植株中表现出不同的颜色,而不同的花色苷在同一植株的不同部位能显示相同的颜色。这表明花色苷在植物中可能与其它成分或自身结构中自由度大的基团相互作用,而且通过这种方式能使花色苷的稳定性大大增加。经研究发现花色苷确实能与其它化合物或自身基团发生相互作用,其主要的方式有:分子内共色、分子间共色、络合共色。分子内共色指花色苷中的糖残基或糖残基上的酰化基团与花色苷 C 环叠合。Giusti 等^[25]研究表明花色素肉桂酰化和丙二酰化后,稳定性显著提高。分子间共色效应存在于花色苷与共色分子之间。两者通过非共价键结合,主要以氢键及疏水键为主。此种结合具有饱和性。不同的共色素与相同的花色苷能形成不同的颜色,这与结合后的空间结构有关^[26]。共色分子一般包括类黄酮、生物碱、氨基酸及有机酸。络合共色指花色苷的羟基与金属离子形成螯合物。花色苷形成金属螯合物后往往呈蓝色^[27]。Takeda 等^[28]曾以镁、锰、锌、铜等金属与鸭跖草黄素结合形成蓝色金属复合物,并指出花色苷与金属的螯合具有选择性。

2 花色苷的提取与分离

2.1 花色苷的提取

花色苷的提取主要以溶剂提取为主。提取剂一般为甲醇或乙醇,同时加入一定的酸使花色苷处于烔盐离子状态。甲酸、乙酸、TFA 及盐酸为常用酸性

试剂^[11]。花色苷提取时需要避免光照与高温,长期的光照与高温会破坏花色苷的结构。特别是酰基化的花色苷要注意控制提取液的 pH 与温度以保证样品分析的真实性与准确性^[29]。花色苷的提取除了常规的溶剂提取外,还可以借助超声波与酶法等辅助提取方法^[30-31]。

2.2 花色苷的分离

植物样本中往往有多种花色苷,鉴定成份以前需要将花色苷分离。花色苷的高效分离主要借助高效液相色谱及高速逆流色谱。

2.2.1 高效液相分离花色苷

高效液相色谱分离花色苷时主要采用 C₁₈ 反相色谱柱,反相柱的填料粒径及硅烷化程度对花色苷的分离度影响最大^[32]。一般小粒径,高硅烷化程度

有利于花色苷的分离。但是粒径过小会导致柱压过高损害色谱柱使用寿命,在实际分析中应结合样品的实际情况选取合适的色谱柱。花色苷在反相柱中依照极性大小依次从高到低流出。由于花色苷种类繁多,常会出现共流出峰或重叠峰。此情况可利用二级管阵列检测器(Diode Array Detector)对峰的纯度进行实时监测。表 1 中列出了在分离花色苷时所采用的一般色谱条件。除了使用 C₁₈ 反相柱,McCal-lum^[33]利用花色苷带有电荷的特点,联合使用离子交换柱和反相柱对葡萄中的花色苷进行分析。混合柱分离到 37 中花色苷,并鉴定了其中 25 种,单使用反相柱分离到 22 种花色苷,鉴定了其中 22 个成份。此结果说明使用混合柱对花色苷实现两步分离的效果更佳。

表 1 花色苷分离的高效液相色谱条件

Table 1 High performance liquid chromatography conditions for anthocyanins separation

样品 Sample	色谱柱 HPLC column	温度 Temperature(℃)	流动相 Mobile phase
蓝莓 Blueberry	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ (4.6 mm × 150 mm 5 μm)	35	A: 0.1% 甲酸溶液 ^[34] B: 乙腈(0.1% 甲酸)
葡萄渣 Grape pomace	Luna C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm)	20	A: 10% 甲酸溶液 B: 乙腈(10% 甲酸) ^[35]
圆叶葡萄 Muscadine grapes	Symmetry C ₁₈ (3 mm × 150 mm 5 μm)	—	A: 5% 甲酸溶液 B: 甲醇(5% 甲酸) ^[11]
葡萄皮 Grape skins	Novapak C ₁₈ (3.9 mm × 150 mm 4 μm)	—	A: 10% 甲酸溶液 B: 水/醇/甲酸 45:45:10 ^[36]
草莓 Strawberry	Torrance C ₁₈ (4.6 mm × 150 mm 5 μm)	35	A: 0.1% TFA 溶液 B: 乙腈 ^[37]
野生蓝莓 Wild blueberry	Supelco Bellefonte C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm 4 μm)	40	A: 4% 磷酸溶液 B: 乙腈 ^[13]
牡丹 Paeonia section Moutan	Tosoh ODS-80Ts QA C ₁₈ (150 mm × 4.6 mm 5 μm)	35	A: 0.1% 甲酸 B: 乙腈(0.1% 甲酸) ^[38]
荷花 Nelumbo	Tosoh ODS-80Ts QA C ₁₈ (150 mm × 4.6 mm 5 μm)	30	A: TFA-甲酸-水(0.1:2:97.9) ^[39] B: TFA-甲酸-乙腈-水(0.1:2:5:62.9)

“—”表示在该文中没有报道柱温; “—” indicates no temperature information mentioned in this article

2.2.2 高速逆流色谱分离花色苷

高速逆流色谱采用两相连续萃取原理,利用不同成份在两相中具有不同的分配系数,从而使混合物得以分离。高速逆流色谱采用液体作为固定相,不会因为不可逆吸附或表面作用损失样品。

高速逆流色谱在分离花色苷类时溶剂体系的选择尤为重要。花色苷为极性化合物,一般会使用正丁醇维持体系的极性,同时还需加入适当的酸性添加剂稳定花色苷。对于极性相近的花色苷化合物,可以使用多步分离来实现分配系数相近化合物的分离。Renault^[40]曾使用两步分离到 Peonidin-3-O-glucoside、Malvidin-3-O-glucoside 及 Cyanidin-3-O-glucoside。现将已有报道的逆流色谱分离花色苷的条件列于表 2。

3 花色苷的结构鉴定

花色苷的结构鉴定过去主要依靠紫外可见光谱法及薄层层析法。这两种方法有着很大的局限性,紫外可见光谱法对纯物质鉴定效果较好,若化合物纯度不高则很难准确鉴定其结构,且常常出现误判的情况。且不同的溶剂体系其紫外吸收光谱也会有所不同,很难建立一种普适方法。薄层层析能分析简单的混合物体系,但是待分析样品中化合物较复杂时,薄层层析很难将混合物区别开,特别是在纯在同分异构体的情况下,其低分辨率的弊端更明显。目前花色苷化合物的结构鉴定主要为质谱法与核磁共振法。该两种方法在很大程度上能实现互补。

3.1 质谱鉴定花色苷结构

表 2 花色苷分离的高速逆流色谱条件

Table 2 High speed counter current chromatography conditions for anthocyanins separation

样品 Sample	溶剂体系与容量(mL) Solvent system	转速与流速(mL/min) Rpm and Flow
红酒 (Red wine)	MTBE: BuOH: ACN: W 0.1% TFA (2: 2: 1: 5) 850; (Head to tail)	800; 3. 5 ^[41]
葡萄皮、玫瑰酒(Grape skin and rose wine)	MTBE: BuOH: ACN: W 0.02% TFA (2: 2: 0. 1: 5)	200; 2. 0 ^[42]
	MTBE: BuOH: ACN: W 0.02% TFA (2: 2: 2. 5: 5) 200; (Tail to head)	
接骨木果实(Elderberry)	MTBE: BuOH: ACN: W 0.1% TFA (1: 3: 1: 5) 850; (Head to tail)	1000; 2. 5 ^[43]
黑莓(Blackberry)	MTBE: BuOH: ACN: W 0.1% TFA (2: 2: 1: 5) 850; (Head to tail)	1000; 3. 7 ^[43]
欧洲越橘 (Bilberry)	MTBE: BuOH: ACN: W 0.01% TFA (1: 4: 1: 5) 380; (Head to tail)	650; 1. 5 ^[44]
红洋葱(Red onion)	MTBE: BuOH: ACN: W 0.01% TFA (2: 2: 1: 5) 850; (Head to tail)	1000; 5 ^[45]
郁金香(Tulip)	MTBE: BuOH: ACN: W 0.01% TFA (2: 2: 1: 5) 850; (Head to tail)	1000; 5 ^[45]
桑椹 (Mulberry)	MTBE: BuOH: ACN: W 0.1% TFA (1: 3: 1: 5) 1200; (Head to tail)	700; 3. 0 ^[46]

质谱与高效液相的联用已成为花色苷定性与定量分析的主要手段,且液质联用能满足复杂生物样本中花色苷的代谢组学研究的高灵敏度与高通量的要求。Passamonti^[47]曾利用液质联用技术发现注射了葡萄花青苷的小鼠,几分钟后在其大脑中检测到痕量花青苷。从而证明花色苷能够透过大脑屏障。随后 Rahman^[48]发现了花色苷对于去胡须导致的小鼠大脑中的氧应急态反应有减缓作用,从生理活性的角度进一步证实了 Passamonti 的液质分析结果。Wang^[49]等利用 MALDI 电离源对蓝莓的花色苷混合

物进行分析,4 min 内实现了对蓝莓样品中花色苷的高通量检测。

质谱通过检测花色苷的特征碎片离子来对其进行鉴定。对于特征离子的识别是花色苷结构鉴定的关键。花色苷的定性分析通常采用 ESI 电离源。在分析时可以通过调节仪器参数以得到一级质谱图。同时质谱仪多样的检测模式提供丰富的碎片信息以分析花色苷的准确结构。现将常见的花色苷质谱特征碎片列于表 3^[13, 50-52]。

表 3 花色苷特征离子碎片

Table 3 Characterization ion fraction of anthocyanins

种类 Category	[M] ⁺ m/z	MS/MS m/z	种类 Category	[M] ⁺ m/z	MS/MS m/z
Pelargonidin(Pg)			Cyanidin(Cy)		
Pg-3-O-glucoside	433	271	Cy-3-O-glucoside	449	287
Pg-3-O-galactoside	433	271	Cy-3-O-galactoside	449	287
Pg-3-O-rutinoside	579	433/271	Cy-3, 5-O-diglucoside	611	449/287
Pg-3-O-(malonoyl) glucoside	519	433/217	Cy-3-O-arabinoside	419	287
Pg-3-O-(6'-acetyl) glucoside	475	271	Cy-3-O-xyloside	419	287
Pg-3-O-(6'-feruloyl) diglucoside	771	271	Cy-3-O-rutinoside	595	449/287
Pg-3-O-(diglucoside-5-O-glucoside	757	595/433/271	Cy-3-O-(6'-malonoyl) glucoside	535	449/287
Pg-3-O-(acetyl) rutinoside-5-O-glucoside	919	757/579/271	Cy-3-O-dioxaloylglucoside	593	287
Pg-3-O-diglucoside-5-O-(malonoyl) glucoside	843	595/519/271	Cy-3-O-(3'-malonoyl) glucoside	535	287
Pg-3-O-(feruloyl) glucoside	609	271	Cy-3-O-sophoroside	611	287
Pg-3-O-rutinoside-5-O-(malonoyl) glucoside	827	579/519/271	Cy-3-O-(6'-p-coumaryl) glucoside	595	287
Pg-3-O-(caffeoyl) glucoside-5-O-glucoside	919	757/433/271	Cy-3-O-(propionyl) galactoside	507	287
Pg-3-O-(feruloyl) diglucoside-5-O-(malonoyl) glucoside	1019	771/519/271	Cy-3-O-dioxaloylglucoside	593	287

Pg-3-O-(p-coumaroyl) diglucoside-5-O-(malonoyl) glucoside	989	741 /519 /271	Cy-3-O-(6'-p-coumaryl) pentoside	565	287
Pg-3-O-(6'-acetyl) diglucoside-5-O-glucoside	905	743 /433 /271	Cy-3-O-(6'-acetyl) pentoside	461	287
Pg-3-O-(caffeoyl) diglucoside-5-O-(malonoyl) glucoside	1005	757 /519 /271	Cy-3-O-(6'-acetyl) glucoside	491	287
Pg-3-O-(feruloyl) glucoside-5-O-(malonoyl) glucoside	857	609 /519 /271	Cy-3-O-sophoroside-5-O-rhamnoside	757	611 /433 /287
Pg-3-O-(p-coumaroyl) diglucoside-5-O-glucoside	903	741 /433 /271	Cy-3-O-sambubioside-5-O-rhamnoside	727	581 /433 /287
Pg-3-O-(feruloyl) diglucoside-5-O-glucoside	933	771 /433 /271	Cy-3-O-xylosylrutinoside	727	581 /287
Cy-3-O-sambubioside	581	287			
Delphinidin(Dp)					
Cy-3-O-diglucoside-5-O-glucoside	773	611 /449 /287			
Dp-3-O-glucoside	465	303	Cy-3-O-(caffeoyl) diglucoside-5-O-glucoside	935	449 /287
Dp-3-O-galactoside	465	303	Cy-3-O-(sinapoyl) diglucoside-5-O-glucoside	979	817 /449 /287
Dp-3 5-O-diglucoside	627	303	Cy-3-O-(feruloyl) diglucoside-5-O-glucoside	949	787 /449 /287
Dp-3-O-(6'-acetyl) glucoside	507	303	Cy-3-O-diglucoside-5-xyloside	743	611 /419 /287
Dp-3-O-(6'-p-coumaryl) glucoside	611	303			
Dp-3-O-(pyruvic) glucoside	533	303	Petunidin(Pn)		
Dp-3-O-(6'-p-coumaryl) glucosidepyruvicacid	679	303	Pn-3-O-glucoside	479	317
Dp-3-O-(6'-acetyl) 5-O-diglucoside	669	303	Pn-3-O-galactoside	479	317
Dp-3-O-(6'-p-coumaryl) 5-O-diglucoside	773	611 /465 /303	Pn-3 5-O-diglucoside	641	317
Dp-3-O-(6'-feruloyl) 5-O-diglucoside	803	303	Pn-3-O-(6'-acetyl) glucoside	521	317
Dp-3-O-arabinoside	435	303	Pn-3-O-(6'-p-coumaryl) glucoside	625	317
Dp-3-O-(malonoyl) glucoside	551	303	Pn-3-O-(6'-p-caffeoyl) 5-O-diglucoside	803	317
			Pn-3-O-(6'-coumaryl) 5-O-diglucoside	787	317
Peonidin(Pg)			Pn-3-O-(6'-coumaryl) 5-O-diglucoside	787	317
Pg-3-O-glucoside	463	301	Pn-3-O-arabinoside	449	317
Pg-3-O-galactoside	463	301			
Pg-3 5-O-diglucoside	625	301	Malvidin(Mv)		
Pg-3 5-O-digalactoside	625	463 /301	Mv-3-O-glucoside	493	331
Pg-3-O-(acetyl) glucoside	487	301	Mv-3-O-galactoside	493	331
Pg-3-O-(propionyl) galactoside	535	301	Mv-3 5-O-diglucoside	655	331
Pg-3-O-(propionyl) glucoside	535	301	Mv-3-O-(6'-caffeoyl) glucoside	655	331
Pg-3-O-(oxalyl) galactoside	535	301	Mv-3-O-(acetyl) glucoside	517	331
Pg-3-O-(succinyl) arabinoside	535	301	Mv-3-O-(6'-p-coumaryl) 5-O-diglucoside	801	331
Pg-3-O-rutinoside	609	463 /301	Mv-3-O-arabinoside	463	331
Pg-3-O-(6'-acetyl) glucoside	505	301	Mv-3-O-(6'-acetyl) galactoside	535	331
Pg-3-O-(6'-p-coumaryl) glucoside	609	301	Mv-3-O-(6'-acetyl) glucoside	535	331
Pg-3-O-(6'-p-coumaryl) 5-O-diglucoside	771	301	Mv-3-O-(6'-p-coumaryl) glucoside	639	331
			Mv-3-O-glucoside-catechin-dimer	809	331
			Mv-3-O-(oxalyl) arabinoside	535	331
			Mv-3-O-(malonoyl) glucoside	579	331

3.2 核磁共振鉴定花色苷结构

质谱在分析同分异构体和确定新化合物的结构时有很大的局限性。由于质谱法对花色苷结构的鉴定很大程度上是根据已知化合物的质谱数据来进行,故不能确定未知化合物及同分异构体结构。核磁共振技术(Nuclear Magnetic Resonance)是化合物结构分析最准确的手段。尤其是对花色苷中的同分异构体及其糖苷和酰基化位点,该方法都有着质谱所不具有的优势。Ando^[53]等利用核磁共振技术成功的确定了从矮牵牛花中分离出的 Cyanidin-3-(coumaryl) glucoside-5-glucoside、Peonidin-3-(coumaryl) glucoside-5-glucoside、Cyanidin-3-O-sophoroside 的酰基化位点。

现用于分析花色苷结构的核磁共振仪一般为 400-600 MHz。高分子量花色苷还可借超导核磁共振(900 MHz)将多级核磁共振谱转换为一级核磁共振谱,避免了谱峰的重叠现象^[54]。在分析复杂花色苷类化合物时除使用超导核磁共振仪外,二维核磁共振谱(Two Dimension Nuclear Magnetic Resonance)也扮演着重要的角色。Fumi^[18]利用二维核磁共振技术确定了 Malvidin-3-O-[6-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -glucopyranoside] 的结构。花色苷结构鉴定中所涉及到的二维共振谱包括¹H-¹H 化学位移相关谱(¹H-¹H Chemical Shift Correlation Spectroscopy)、¹H-¹³C 异核相关谱(Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)、¹H-¹³C 远程相关谱(Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)、¹H-¹H 核间奥氏效应(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)及¹³C-¹³C 非常规天然丰度双量子转移实验(Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment)。

花色苷机构分析中¹H-¹H 化学位移相关谱为最常规的二维核磁共振谱,一般情况下该谱甲基单峰的非耦合峰会影响解谱。可以使用双量子过滤技术过滤掉单量子过渡态,使得对 AB 或 AX 自旋体系有更高的选择性,同时还会使图谱变得简单。

¹H-¹³C 异核相关谱与¹H-¹³C 远程相关谱都能检测异核相关性。主要区别为¹H-¹³C 远程相关谱只能检测二键耦合(2J_{CH})和三键耦合(3J_{CH}),两种谱图的结合使用有助于判断花色苷中糖基化与酰基化位点。

分析高分子量的花色苷类化合物时,¹³C-¹³C 非常规天然丰度双量子转移实验的使用能迅速的判断

化合物的碳骨架结构,而且通过该图谱可以将一维¹H 化学位移谱中重叠的谱峰分为不同的峰簇。

¹H-¹H 核间奥氏效应是弛豫现象在化合物结构分析中的应用。对于花色苷中的顺反异构体的确定有着重要的意义。奥氏效应是一种非键空间效应,针对没有自旋-自旋耦合作用,但在空间上接近的质子。使用其中一核的共振频率照射自身,除减弱该核自身 NMR 信号的同时,还会使另一个空间上相近的质子 NMR 信号产生变化。

4 展望

花色苷类化合物作为一种天然色素无论是在食品、化妆品以及药品中都有着极其重要的地位。尤其是在当下人们对于食品安全日益重视的情况下,花色苷无疑成为最符合人们对于色素类添加剂安全性要求的天然色素。但是目前花色苷类化合物从化学性质、生理活性、提取技术和纯化技术到分离及鉴定技术,最后到产品的开发的一系列相关技术都需要不断的完善,并且需要形成一套完整的花色苷类化合物研究技术体系。相信随着技术的不断完善,新化合物的发现与应用技术的成熟,花色苷类化合物的研究势必进入一个新的阶段,同时使得花色苷能为人类健康事业做出贡献。

参考文献

- 1 Wu XL *et al.* Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 583-589.
- 2 Matsumoto H *et al.* Stimulatory effect of cyaniding 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 3560-3563.
- 3 Nakaishi H *et al.* Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. *Altern Med Rev* 2005, 5: 553-562.
- 4 Frank J *et al.* Effects of dietary anthocyanins on tocopherols and lipids in rats. *J Agric Food Chem* 2002, 50: 7226-7230.
- 5 Folts JD. Antithrombotic potential of grape juice and red wine for preventing heart attacks. *Pharm Biol*, 1998, 36 (suppl. 1): 21-27.
- 6 Tan YZ (谭毓治) *et al.* Effects of GSP on learning and memory in mice. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2004, 20: 804-807.
- 7 Lamy S *et al.* Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits

- vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis* 2006 27: 989-996.
- 8 Hagiwara A *et al.* Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple color of 2-aminO-4-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats retreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett* 2001 171: 17-25.
 - 9 Yoshimoto M, Okano S. Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001 65: 1652-1655.
 - 10 Castaneda-Ovando A *et al.* chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem* 2009 113: 859-871.
 - 11 Huang ZL *et al.* Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *LWT-Food Sci Technol* 2009 42: 819-824.
 - 12 Wrolstad RE *et al.* Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci Technol* 2005 16: 423-428.
 - 13 Nicoue EE *et al.* Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. *J Agric Food Chem* 2007 55: 5626-5635.
 - 14 Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* 2004 39: 1-15.
 - 15 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 Agric Food Chem* 2005 53: 2589-2599.
 - 16 Sun JX(孙建霞) *et al.* Structural stability and degradation mechanisms of anthocyanins. *Sci Agric Sin(中国农业科学)* 2009 42: 996-1008.
 - 17 Stintzing FC *et al.* A novel zwitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (*Rubus Laciniatus* Willd.). *J Agric Food Chem* 2002 50: 396-399.
 - 18 Tatsuzawa F *et al.* An unusual acylated malvidin 3-glucoside from flowers of *Impatiens textori* Miq. (Balsaminaceae). *Phytochemistry* 2009 70: 672-674.
 - 19 Fleschhut J *et al.* Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *Eur J Nutr* 2006 45: 7-18.
 - 20 Kennedy JA, Waterhouse AL. Analysis of pigmented high-molecular-mass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2000 866: 25-34.
 - 21 Kjell Torskangerpoll, Øyvind M. Andersen. colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chem* 2005 89: 427-440.
 - 22 Sadilova E *et al.* Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *J Food Sci* 2006 71: 504-512.
 - 23 Ito F *et al.* Why do flavylum salts show so various colors in solution?: effect of concentration and water on the flavylum's color changes. *J Photochem Photobiol A: Chemistry* 2002 150: 153-157.
 - 24 Robinson B. Chemical Structure of Anthocyanins. New York: Academic Press 1982. 1-38.
 - 25 Giusti MM, Wrolstad RE. Acylated anthocyanins from edible sources and their application food systems. *Biochem Eng J* 2003 14: 217-255.
 - 26 Wang F(王锋) *et al.* Research progress on anthocyanins and copigmentation. *Food Sci(食品科学)* 2008 29: 472-476.
 - 27 Gu L(顾林) *et al.* The chemical structure of anthocyanins, biological synthesis pathway, mechanism of forming color and the ways of improving their stability. *Sci Technol Food Ind(食品工业科技)* 2007 28: 240-244.
 - 28 Takeda K. Further experiments of synthesizing crystalline blue metal-anthocyanins using various kinds of bivalent metals. *Proceed Japan Acad. Ser. B: Phys Biol Sci* 1977 53: 257-261.
 - 29 Barnes S *et al.* Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 1994 42: 2466-2474.
 - 30 Latti AK *et al.* Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *J Agric Food Chem* 2008 56: 190-196.
 - 31 Shi WJ(石文娟) *et al.* Study on extraction of anthocyanins in *Vaccinium uliginosum* L. with cellulase. *Food Sci(食品科学)* 2007 28: 370-373.
 - 32 Cuyckens F, Claeys M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002 16: 2341-2348.
 - 33 McCallum JL *et al.* Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *J Chromatogr A* 2007 1148: 38-45.
 - 34 Yuan S(袁帅) *et al.* Identification of anthocyanins and flavonols in extract of blueberry by using HPLC-ESI-MS/MS. *Acta Chim Sin(化学学报)* 2009 69: 318-322.
 - 35 Ruberto G *et al.* Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chem* 2007 100: 203-210.
 - 36 Nunez V *et al.* Vitis vinifera L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology And Technology* 2004 31: 69-79.

- 37 Lopes-da-Silva MF *et al.* Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT-Food Sci Technol* 2007 40: 374-382.
- 38 Chong HL *et al.* Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia Section Moutan*) yellow flowers. *J Agric Food Chem* 2009 57: 8496-8503.
- 39 Yang RZ *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 Chromatogr A* , 2009 216: 106-112.
- 40 Renault JH *et al.* Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr A* ,1997 763: 345-352.
- 41 Salas E *et al.* Characterization of Pigments from Different High Speed Countercurrent Chromatography Wine Fractions. *J Agric Food Chem* 2005 53: 4536-4546.
- 42 Vidal S *et al.* Fractionation of grape anthocyanins classes using multilayer coil countercurrent chromatography with step gradient elution. *J Agric Food Chem* 2004 52: 713-719.
- 43 Schwarz M *et al.* Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochem Eng J* 2003 14: 179-189.
- 44 Qizhen Du *et al.* Isolation of two anthocyanins sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed countercurrent chromatography. *J Chromatogr A* 2004 1045: 59-63.
- 45 Torskangerpoll K *et al.* Separation of acylated anthocyanins pigments by high speed CCC. *J Liquid Chromatogr Relat Technol* 2001 24: 1791-1799.
- 46 Du Q *et al.* Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. *J Food Compos Anal* ,2008 21: 390-395.
- 47 Sabina Passamonti *et al.* Fast access of some grape pigments to the brain. *J Agric Food Chem* 2005 53: 7029-7034.
- 48 Rahman MM *et al.* Effects of anthocyanins on psychological stress-induced oxidative stress and neurotransmitter status. *J Agric Food Chem* 2008 56: 7545-7550.
- 49 Wang J *et al.* Comparison between HPLC and MALDI-TOF-MS analysis of anthocyanins in high-bush blueberries. *J Agric Food Chem* 2000 48: 3330-3335.
- 50 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: vegetable, nuts and grains. *J Agric Food Chem* 2005 53: 3101-3113.
- 51 Tian QG *et al.* Characterization of a new anthocyanins in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem* 2004 94: 465-468.
- 52 Mate SK *et al.* The effect of the oxidative state of iron on the competitive complexation of malvidin by caffeic or ellagic acid. *Food Res Int* 2008 41: 693-696.
- 53 Ando T *et al.* Floral anthocyanins in wild taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Biochem System Ecol* ,1999 27: 623-650.
- 54 Wang NX (王乃兴). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy—Application Inorganic Chemistry (核磁共振谱学—在有机化学中的应用). Beijing: Chemical Industry Press , 2006. 56-59.