

## 蓝莓花色苷提取物 HPLC 指纹图谱

刘志刚<sup>1,2</sup>, 刘晓燕<sup>1,2</sup>, 杜超<sup>1,2</sup>, 李顺琼<sup>1</sup>, 敖靖<sup>1</sup>, 谢晓林<sup>1</sup>

(1. 贵阳学院 食品与制药工程学院, 贵阳 550005;  
2. 贵州省果品加工工程技术研究中心, 贵阳 550005)

**[摘要]** 目的:建立蓝莓花色苷提取物高效液相色谱指纹图谱,为其质量控制和科学评价提供依据。方法:采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-10% 甲酸水(B)进行梯度洗脱,柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 520 nm。结果:建立了蓝莓花色苷提取物的指纹图谱,确定 13 个共有峰,指认了其中 7 个共有峰,10 批样品相似度均 >0.92。结论:该方法的精密性、重复性和稳定性良好,可用于蓝莓花色苷提取物及其相关产品的质量控制。

**[关键词]** 蓝莓; 花色苷; 高效液相色谱; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0058-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210058

**Fingerprints Analysis of Blueberry Anthocyanins Extract by HPLC** LIU Zhi-gang<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-yan<sup>1,2</sup>, DU Chao<sup>1,2</sup>, LI Shun-qiong<sup>1</sup>, AO Qing<sup>1</sup>, XIE Xiao-lin<sup>1</sup> (1. Guiyang University, Guiyang 550003, China; 2. Guizhou Engineering Research Center for Fruit Processing, Guiyang 550005, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop the fingerprints of blueberry anthocyanins by high performance liquid chromatography, and provide basis for quality control and scientific evaluation. **Method:** HPLC fingerprint was performed on Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with mixture of acetonitrile-10% formic acid as mobile phase in a gradient mode at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. In addition, the detection wavelength and column temperature were set at 520 nm and 25 °C, respectively. **Result:** Fingerprints of blueberry anthocyanins were established and there were 13 common peaks. Among them, 7 common peaks were identified. The similarities of 10 batches of samples were greater than 0.92. **Conclusion:** The proposed method is accurate, repeatable, stable and can be used as quality control method for blueberry anthocyanins extract and its related products.

**[Key words]** blueberries; anthocyanins; HPLC; fingerprint

蓝莓为杜鹃花科多年生灌木,其果实呈深蓝色,被白霜,含有丰富的花色苷和维生素等活性成分<sup>[1]</sup>。花色苷是花青素与糖以糖苷键结合而形成的一类酚类化合物,具有消除眼部疲劳、抗氧化和提高免疫力等生物活性<sup>[2-4]</sup>。蓝莓花色苷种类较多,不同品种蓝莓中种类和含量差异较大<sup>[5]</sup>,目前测定蓝莓花色苷含量的方法主要有分光光度法, HPLC 法和 LC-MS 法等<sup>[6-8]</sup>。指纹图谱技术作为一种控制多组分复杂样品质量的有效方法,可更全面地反映样品中的化学成分及其相对比例,从而有效表征产品质量<sup>[9-13]</sup>,张军祥等<sup>[14]</sup>采用 HPLC

指纹图谱技术对 9 个不同品种红葡萄酒中花色苷成分进行分析,能够更有效地鉴别不同酿造品种葡萄酒。目前尚未见到关蓝莓花色苷提取物指纹图谱文献报道,本研究采用高效液相色谱法,建立蓝莓花色苷提取物 HPLC 指纹图谱,以期对蓝莓花色苷的质量控制提供有效方法,从而为蓝莓相关产品的开发利用提供依据。

### 1 材料

矢车菊素 3-O-葡萄糖苷(批号 GZDD-0645 纯度 98.0%)对照品购于贵州迪大生物科技有限责任公司。甲醇、乙腈(色谱纯, Tedia, USA),水为重蒸水,

**[收稿日期]** 20141211(005)

**[基金项目]** 贵州省科技厅农业攻关项目(黔科合 NY[2014]3008 号);贵州省教育厅自然科学研究重点项目(黔教合 KY 字[2012]033 号);贵州省教育厅“125 计划”重大科技专项项目(黔教合重大专项[2013]024 号)

**[第一作者]** 刘志刚,博士,副教授,从事天然产物分离、分析相关教学和研究工作, E-mail:1623188533@qq.com

其余试剂均为分析纯。10批蓝莓均采自贵州省麻江县宣威镇龙崩蓝莓基地,由贵阳学院高蓬明教授鉴定为杜鹃花科越多年生灌木蓝莓 *Vaccinium spp* 的果实,花色苷提取物为研究室自制。

LC-15C型高效液相色谱仪(包括LC-15C输液泵,SPD-15C紫外检测器和LC-solution色谱工作站,日本岛津);ACQUITY Ultra Performance LC™ 色谱仪, Micromass® Quattro micro™ API 质谱仪(美国 Waters);AUW120D型分析天平(日本岛津)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Diamonsil(钻石) C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-10% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 5%~8% A; 15~35 min, 8%~10% A; 35~55 min, 10%~12% A);进样体积 20 μL,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 520 nm。

**2.2 质谱条件** 电喷雾电离源(ESI源),脱溶剂气温度 400 °C,脱溶剂气流速(N<sub>2</sub>)450 L·h<sup>-1</sup>,扫描方式全扫描,子离子扫描。

**2.3 供试品溶液的制备** 取蓝莓花色苷提取物约 30 mg,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 10% 磷酸超声溶解,并定容至 50 mL 量瓶中,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

**2.4 对照品溶液的制备** 取矢车菊素 3-O-葡萄糖苷对照品约 5.2 mg,精密称定,用 10% 磷酸超声溶解,定容至 100 mL 量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 参照物峰的选择** 矢车菊素 3-O-葡萄糖苷是蓝莓花色苷的主要有效成分之一,指纹图谱中矢车菊素 3-O-葡萄糖苷峰面积较稳定,保留时间适中,可与其他色谱峰很好分离,故将其作为本指纹图谱检测标准的参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

**2.5.2 精密度试验** 取同一批蓝莓花色苷提取物供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 5 次,记录色谱图,以矢车菊素 3-O-葡萄糖苷为参照峰,计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积,结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,说明仪器精密度良好,符合指纹图谱的要求。

**2.5.3 稳定性试验** 取同一批蓝莓花色苷提取物供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 进样 20 μL,记录色谱图,计算指纹图谱中

各共有峰的相对保留时间及相对峰面积,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%,供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.5.4 重复性试验** 取蓝莓花色苷提取物 5 份,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录色谱图,计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积,结果表明,各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%,表明方法重复性良好。

## 2.6 蓝莓花色苷提取物 HPLC 指纹图谱的建立

**2.6.1 指纹图谱的采集** 取 10 批蓝莓花色苷提取物,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样 20 μL 分析,各批次指纹图谱相对保留时间及相对峰面结果见表 1, 2。

**2.6.2 共有峰的标记** 根据测定结果,10 批样品指纹图谱的色谱峰均在 55 min 内完成,有 13 个色谱峰在各批蓝莓花色苷提取物指纹图谱中均出现,其峰面积之和约占总峰面积的 94%,因此标定该 13 个色谱峰为共有指纹峰。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件对 10 批蓝莓花色苷提取物指纹图谱进行评价,采用中位数法生成对照指纹图谱,建立了蓝莓花色苷提取物的色谱指纹图谱共有模式,见图 1。其中 6 号峰为矢车菊素 3-O-葡萄糖苷为参照峰。

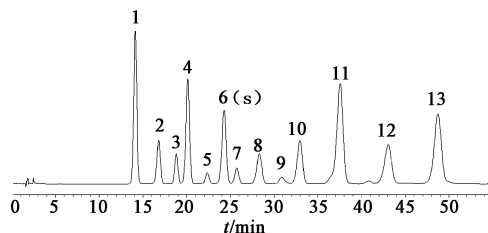


图1 蓝莓花色苷提取物 HPLC 指纹图谱共有模式

Fig. 1 Standard fingerprint chromatogram of blueberry anthocyanins extract

**2.6.3 对照指纹图谱的建立及相似度评** 将 10 批蓝莓花色苷提取物的色谱数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版),以对照指纹图谱为标准进行整体相似度评价,结果显示 10 批蓝莓花色苷提取物样品的相似度均 > 0.92。见图 2。

## 3 讨论与结论

**3.1 色谱条件的优化** 本研究对色谱柱、检测波长、柱温、流动相及洗脱梯度程序等条件进行了优化。分别比较了 WondaSil C<sub>18</sub>-WR(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 和 Diamonsil(钻石) C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250

表 1 HPLC 指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks in the HPLC fingerprint

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.59	0.59	0.58	0.58	0.59	0.60	0.58	0.59	0.58	0.58
2	0.71	0.72	0.72	0.71	0.72	0.73	0.71	0.71	0.71	0.70
3	0.78	0.78	0.77	0.77	0.77	0.79	0.77	0.78	0.77	0.77
4	0.84	0.84	0.83	0.83	0.84	0.85	0.83	0.83	0.83	0.83
5	0.92	0.93	0.91	0.92	0.93	0.92	0.91	0.93	0.91	0.91
6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
7	1.06	1.05	1.05	1.06	1.05	1.07	1.05	1.07	1.05	1.05
8	1.16	1.16	1.17	1.17	1.16	1.17	1.15	1.16	1.17	1.15
9	1.25	1.24	1.25	1.24	1.24	1.26	1.24	1.25	1.24	1.24
10	1.35	1.36	1.34	1.36	1.36	1.36	1.34	1.34	1.34	1.35
11	1.53	1.54	1.54	1.53	1.52	1.54	1.52	1.52	1.52	1.52
12	1.75	1.75	1.74	1.73	1.74	1.76	1.74	1.76	1.74	1.74
13	1.96	1.97	1.97	1.95	1.95	1.97	1.95	1.94	1.95	1.95

表 2 HPLC 指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common peaks in the HPLC fingerprint

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	1.54	1.23	1.32	1.62	1.48	1.35	1.24	1.18	1.42	1.68
2	0.51	0.38	0.57	0.71	0.59	0.43	0.38	0.55	0.58	0.62
3	0.30	0.38	0.51	0.42	0.28	0.39	0.52	0.46	0.38	0.30
4	1.22	1.08	1.53	1.42	1.33	1.18	1.28	1.35	1.02	1.54
5	0.13	0.23	0.10	0.25	0.18	0.19	0.33	0.09	0.17	0.20
6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
7	0.21	0.33	0.14	0.38	0.43	0.20	0.33	0.42	0.18	0.15
8	0.49	0.38	0.49	0.62	0.41	0.58	0.67	0.38	0.39	0.58
9	0.11	0.19	0.31	0.28	0.08	0.15	0.22	0.32	0.21	0.08
10	0.75	0.56	0.65	0.45	0.87	0.94	0.74	0.78	0.67	0.53
11	2.06	2.28	2.34	1.84	1.89	2.25	2.11	2.18	2.33	2.24
12	0.87	0.81	0.99	1.07	0.68	0.79	0.74	0.92	0.88	0.66
13	1.59	1.88	1.69	1.37	1.28	1.68	1.60	1.79	1.91	1.32

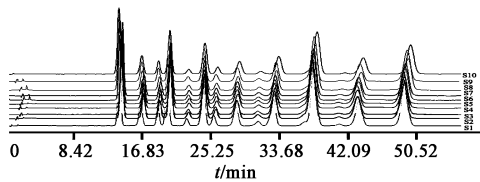


图 2 10 批蓝莓花色苷提取物 HPLC 指纹谱

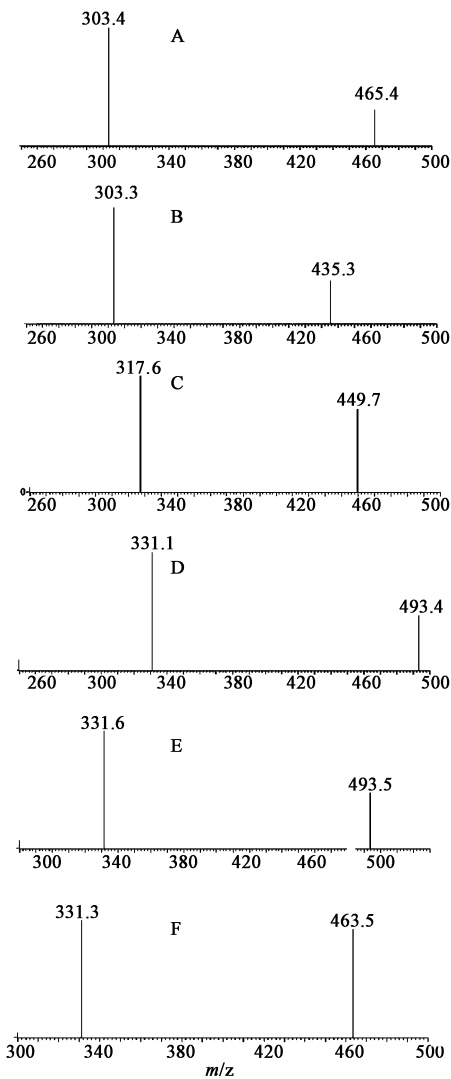
Fig. 2 HPLC chromatogram of 10 batches of blueberry anthocyanins extract

mm, 5  $\mu$ m) 等色谱柱, 结果采用后者分离所得色谱峰之间的分离效果较好, 峰形尖锐。蓝莓花色苷提取物在 520 nm 处所得色谱峰数量多, 信号响应值大, 基线平稳, 确定 520 nm 为最佳检测波长。选择流动相及洗脱梯度条件时, 分别比较了采用甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水溶液以及乙腈-1% 甲酸水溶液等不同体系作为流动相, 以不同梯度进行洗脱, 结果表明乙腈-10% 甲酸水溶液进行梯度洗脱

所得色谱图峰形最好, 基线平稳、分离度良好, 因此确定采用该系统作为本试验的流动相。

**3.2 共有峰的指认** 通过对照品比对, 确定 HPLC 指纹图谱中 6 号峰为矢车菊素 3-O-葡萄糖苷, 经 UPLC-MS 分析, 依据其分子离子峰和子离子扫描信息推测了其余 6 个色谱峰, 其色谱和质谱信息与文献[15]报道质谱数据基本一致, 故指认 1 号峰为飞燕草素 3-半乳糖苷, 4 号峰为飞燕草素 3-阿拉伯糖苷, 10 号峰为矮牵牛素 3-阿拉伯糖苷, 11 号峰为锦葵色素 3-半乳糖苷, 12 号峰为锦葵色素 3-葡萄糖苷, 13 号峰为锦葵色素 3-阿拉伯糖苷。见图 3。

**3.3 结论** 本研究对 10 批蓝莓花色苷提取物进行了 HPLC 指纹图谱构建, 标定了 13 个共有峰, 指认了其中 7 个共有峰, 10 批样品相似度均 > 0.92, 相似度较高。该方法简便、准确、重复性好, 可作为蓝莓花色苷提取物质量综合控制与评价的有效方法。



A. 飞燕草素 3-半乳糖苷; B. 飞燕草素 3-阿拉伯糖; C. 牵牛素 3-阿拉伯糖苷; D. 锦葵色素 3-半乳糖苷; E. 锦葵色素 3-葡萄糖苷; F. 锦葵色素 3-阿拉伯糖苷

图 3 各共有峰离子扫描质谱

Fig. 3 MS/MS spectra of common peaks in the HPLC fingerprint

[参考文献]

[ 1 ] 胡雅馨, 李京, 惠伯棣. 蓝莓果实中主要营养及花青素成分的研究 [J]. 食品科学, 2006, 27 ( 10 ): 600-603.  
[ 2 ] Prior R L, Wu X L, Gu L W, et al. Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity [J]. J Agr Food Chem, 2008, 56 ( 3 ): 647-653.  
[ 3 ] 李颖畅, 孟宪军, 孙靖靖, 等. 蓝莓花色苷的降血脂和抗氧化作用 [J]. 食品与发酵工业, 2008, 34 ( 10 ):

44-48.

[ 4 ] 李颖畅, 马春颖, 孟宪军, 等. 蓝莓花色苷提取物抗油脂氧化能力的研究 [J]. 中国粮油学报, 2010, 25 ( 2 ): 92-95.  
[ 5 ] 杨桂霞, 范海林, 李亚东, 等. RP-HPLC 法测定栽培种越橘果中花色素苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25 ( 10 ): 1222-1224.  
[ 6 ] Lee J, Durst R W, Wrolstad R E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorant and wines by the pH differential Method: collaborative study [J]. J Aoac Int, 2005, 88 ( 5 ): 1269-1278.  
[ 7 ] Di Paola Naranjo R D, Sanehez Sanehez J, Gonzalez Panunas A M, et al. Liquid chromatographic-spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum* [J]. J Chromatogr A, 2004, 1054 ( 1/2 ): 205-210.  
[ 8 ] Zhang Z, Kou X L, Fugal K, et al. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyaninidins in bilberry extracts [J]. J Agr Food Chem, 2004, 52 ( 4 ): 688-691.  
[ 9 ] 陈东东, 周萍, 白钢钢, 等. 基于 HPLC 中药指纹图谱技术延胡索药材及其制剂控制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 ( 12 ): 2470-2473.  
[ 10 ] 梁从莲, 刘红燕, 崔媛, 等. 金银花指纹图谱及其清除 DPPH 自由基的谱-效关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 ( 17 ): 44-46.  
[ 11 ] 陀扬凌, 金玲, 张旭. 赶黄草花与茎、叶 HPLC 指纹图谱比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 ( 15 ): 61-64.  
[ 12 ] Eugene Emile Nicoue, Sylvain Savard, Khaled Belkacem. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification [J]. J Agr Food Chem, 2007, 55 ( 14 ): 5626-5635.  
[ 13 ] Chen C, Zhang H, Xiao W, et al. High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries [J]. J Chromatogr A, 2007, 1154 ( 1/2 ): 250-259.  
[ 14 ] 张军翔, 冯长根, 李华. 不同品种红葡萄酒花色苷高效液相色谱指纹图谱识别 [J]. 农业工程学报, 2006, 22 ( 10 ): 216-221.  
[ 15 ] Wu X L, Prior R L. 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 ( 7 ): 2589-2599.

[责任编辑 顾雪竹]