

高速逆流色谱法分离玫瑰茄中的花色苷

刘雪辉¹, 王振¹, 吴琪¹, 刘林峰¹, 李佳银², 陆英^{1,3}

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128) (2. 长沙三福生物科技有限公司, 湖南长沙 410126)

(3. 湖南农业大学国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410128)

摘要: 实验以玫瑰茄花萼为原料, 建立高速逆流色谱法制备分离玫瑰茄花色苷的方法。玫瑰茄花萼经40%乙醇浸提, 通过D101大孔吸附树脂吸附初步纯化, 然后水-正丁醇-甲基叔丁基醚-乙腈-三氟乙酸(6:3:1:1:0.001, V/V)为两相溶剂系统进行HSCCC分离纯化, 上相为固定相, 下相为流动相, 流速2.0 mL/min, 上样量120mg, 经一次分离得到花色苷1粉末21.8 mg, HPLC面积归一法计算纯度为97.8%, 回收率为95.3%; 花色苷2纯度为84.5%, 经相同溶剂体系二次分离, 得到5.3 mg纯度为96.2%的花色苷2, 回收率为92.3%。通过质谱、核磁等技术鉴定所分离得到的两个花色苷类化合物分别为飞燕草素-3-O-桑布双糖苷以及矢车菊素-3-O-桑布双糖苷。该方法操作简便, 重现性好, 适于玫瑰茄中高纯度花色苷大量制备, 为花色苷进一步药理研究及质量控制提供物质基础。

关键词: 玫瑰茄; 花色苷; 高速逆流色谱; 分离; 结构鉴定

文章编号: 1673-9078(2014)1-190-194

Isolation of Anthocyanin from *Hibiscus sabdariffa* by High Speed Counter-current Chromatography

LIU Xue-hui¹, WANG Zhen¹, WU Qi¹, LIU Lin-feng¹, LI Jia-yin², LU Ying^{1,3}

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China) (2. Changsha Sunfull Bio-tech Co., Ltd., China) (3. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Functional Ingredients From Botanicals, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The calyx of *Hibiscus sabdariffa* was extracted with 40% ethanol at room temperature, and poured through D101 resin. A solvent system of water-n-butanol-methyl tert- acetonitrile-trifluoroacetic acid (6:3:1:1:0.001, V/V) was used for isolation and purification by high speed counter-current chromatography (HSCCC) using upper phase as stationary phase and lower phase as mobile phase, with the flow rate of 2 mL/min and injection volume of 120 mg. 21.8 mg anthocyanin 1 power was obtained with the purity and the recovery rate being of 97.8% and 95.3%, respectively. Anthocyanin 2 was isolated twice with purity of 96.2% (5.3 mg) and recovery rate of 92.3%. The chemical structures of the two anthocyanins were identified as delphinidin-3-O-sambubioside for anthocyanin 1 and cyanidin-3-O-sambubioside for anthocyanin 2 by ESI-MS and NMR. The method is simple, reproducible, which is suitable for preparation of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*, and also provides basis for further pharmacological studies and quality control of anthocyanins

Key words: *Hibiscus sabdariffa*; anthocyanins; high speed counter-current chromatography; isolation; preparation

玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa* L.) 又被称为卡凯蒂、洛神花、洛神葵、山茄等, 是锦葵科木槿属一年生木质状草本植物, 在非洲中南部、亚洲东南部及其他地方都有广泛的种植, 在我国的福建、云南、广东、广西等地也有大面积的栽培。玫瑰茄花萼为紫红色, 其中含有的大量花色苷、黄酮类及有机酸等天然活性成分, 具有抗氧化^[1-2]、抗肿瘤^[3]、保肝^[4-5]、降血压^[6-7]等多种生理活性和药理作用, 此外, 玫瑰茄提取物对

收稿日期: 2013-08-27

基金项目: 湖南农业大学大学生科技创新项目资助 (K1205202-21)

通讯作者: 陆英(1970-), 女, 博士, 副教授, 主要从事天然产物开发与利用

猪胰 α -淀粉酶抑制作用^[8]等活性也被进一步证实。

近年来, 植物花色苷所表现出的多种生物活性引起了人们的广泛关注, 特别是随着合成色素暴露出越来越多的问题, 天然色素资源的探寻和开发已经逐渐成为国内外研究者的热点关注, 现代流行病学调查研究和体内体外试验研究表明, 花色苷具有抗氧化、抗炎、调节血脂、改善胰岛素抵抗、抗突变及抗肿瘤等一系列促进人体健康和预防疾病的作用^[9]。然而, 已有的研究结果还存在着不确定性, 因为大部分的研究数据来自花色苷的粗提取物, 而从单体成分获得的研究数据甚少, 因此进一步明确花色苷单体成分的药理药效、药代动力学、毒性和致畸等作用是非常必要

的。同时,由于植物花色苷的不稳定性及含量相对较低,传统分离花色苷多为硅胶柱色谱、凝胶色谱、纸色谱、 C_{18} 反相色谱等方法,存在制备量小、重现性差等缺点,难以获得大量高纯度花色苷,成为进一步研究的瓶颈。近年来,高速逆流色谱(HSCCC)因具有高效、稳定、制备量大的特点,被广泛用于天然活性成分的制备分离,也成功用于越橘、紫甘薯等植物中的花色苷分离和制备^[10-11]。玫瑰茄花萼中花色苷含量约为2%,主要为飞燕草素糖苷和矢车菊素糖苷两大类^[12],是极其重要的天然色素资源,目前玫瑰茄色素已被广泛应用于国内外食品、保健品等领域。本研究建立了的高速逆流色谱制备玫瑰茄花萼中两种主要花色苷的方法,为花色苷进一步的研究及质量控制奠定物质基础。

1 材料与方法

1.1 原料

玫瑰茄花萼(*Hibiscus sabdariffa*.), 2012年12月采自中国云南省元谋县。

色谱甲醇(美国天地公司),正丁醇、甲醇(分析纯,天津市恒兴化学试剂公司);甲基叔丁基醚(天津市光复精细化工研究所)。

1.2 主要仪器设备

LC-20A高效液相色谱仪,日本岛津公司;配有SPD检测器,色谱Wondasil™ C_{18} (5 μ m, 4.6×250 mm); TBE-300A高速逆流色谱仪,中国上海同田生化技术有限公司;配有TBE-2000紫外检测器(聚四氟乙烯柱,内径1.6 mm,柱容积280 mL), TBP-50泵; MODULYOD-230冷冻干燥机,美国Thermo Fisher Scientific;真空旋转蒸发浓缩仪,郑州长城科工贸有限公司;Agilent 1100 Series LC/MSD质谱仪,美国Agilent;核磁共振仪,美国瓦里安公司。

1.3 试验方法

1.3.1 HPLC 分析条件

Science Wondasil™ C_{18} 柱(4.6×250 mm, 5 μ m); 流动相 A: 0.1%磷酸水, B: 甲醇,二元梯度洗脱: 0~20 min: 14→40% B; 20~40 min: 40% B, 流速1 mL/min,柱温30℃。

1.3.2 玫瑰茄花色苷的提取

取干燥的玫瑰茄花萼1.5 kg,粉碎,用15 L的40%乙醇常温避光浸提48 h,适时搅拌,过滤,滤渣再次在同等条件下浸提二次,合并滤液,40℃减压浓缩至无

醇味,得玫瑰茄花萼粗提液2000 mL。

1.3.3 大孔吸附树脂初步纯化玫瑰茄花色苷

量取500 mL D101大孔吸附树脂装柱(2×40 cm),将2.2制备的提取液以2 BV/h流速通过层析柱,上样完毕后静置30 min,分别以水(500 mL),10%乙醇(1000 mL),20%乙醇(1000 mL)依次洗脱,流速3 BV/h。收集20%乙醇洗脱液,减压浓缩后冷冻干燥,得玫瑰茄花萼纯化提取物150 g。

1.3.4 HSCCC 溶剂系统选择

将不同溶剂按比例配制,震荡后静置分层。取3 mL下相,加入少量2.3制备的样品,超声溶解后取样,然后再加入等体积上相进行萃取,用HPLC分别测定萃取前及萃后样品中目标组分在下相溶液中的面积 $S_{萃前}$ 、 $S_{萃后}$,按下式计算各组分的分配系数。根据K值选择适合的溶剂体系作为HSCCC的固定相与流动相。

$$K = (S_{萃前} - S_{萃后}) / S_{萃后}$$

1.3.5 HSCCC 分离制备

按水:正丁醇:甲基叔丁基醚:乙腈:三氟乙酸(V/V, 6:3:1:1:0.001)配制溶剂体系,静置过夜后两相分离,超声脱气30 min。上相作固定相,下相作流动相。将固定相以20 mL/min的流速泵满管路,再以850 rpm·min⁻¹正转,流速2 mL/min的条件泵入流动相,温度25℃,检测波长280 nm。有下相流出时体系平衡,取2.3制备的干粉120 mg用15 mL下相溶解、进样。根据色谱流出图对组分出峰部位进行分步收集、检测,获得高纯度的花色苷1,纯度不高的花色苷2流出液浓缩,在相同色谱条件下进行第二次分离。

1.3.6 纯度测定及结构鉴定

化合物经HPLC测定,根据254 nm处的色谱图采用面积归一法计算纯度。

采用MS、¹H NMR和¹³C NMR对两个化合物进行结构鉴定。质谱采用电喷雾电离源(ESI),正离子模式,由湖南农业大学分析测试中心完成;核磁共振测定样品用CD₃OD溶解,频率为300 MHz,由湖南大学化工院分析测试中心完成。

2 结果与讨论

2.1 玫瑰茄提取液的HPLC分析

花色苷类物质具有独特的吸光特征,在可见光区和紫外区的最大吸收波长分别为500~540 nm和280 nm附近^[13],通过光谱特征可对花色苷进行简单定性。通过对流动相的考查发现,有机相分别为甲醇和乙腈时,色谱峰的分离效果相同,水相为冰乙酸水溶液时峰形

矮小宽大, 磷酸水峰形高而尖, 因此选定甲醇-0.1%磷酸水为流动相, 在2.1色谱条件下各组分能得完全分离, 见图1, 由图可见, 玫瑰茄花萼40%乙醇提取液中主要含有两种花色苷, 保留时间分别为19.401 min (花色苷1) 和21.922 min (花色苷2), 分别占花色苷总量的78.1%、21.8%。

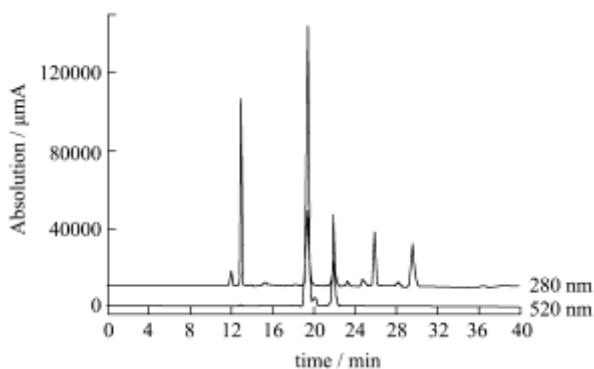


图1 玫瑰茄花萼40%乙醇提取液 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatogram of the extract of *Hibiscus sabdariffa*

2.2 提取条件的确定

植物花色苷稳定性差, 保持花色苷原有形态是在提取分离纯化花色苷类物质时首先要考虑。研究表明, 高温、光照、过高的pH均能导致花色苷一定程度的降解^[14-16], 因此实验采用常温避光提取条件。同时, 根据花色苷易溶于水、乙醇、甲醇的性质, 考查了水、20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇和甲醇对玫瑰茄花色苷提取效果的影响, 通过对花色苷组分的峰面积比较发现, 40%乙醇、60%乙醇及甲醇的提取效果相差不大, 因此选择40%乙醇在常温下对玫瑰茄花萼避光冷浸提取, 三次浸提后原料颜色明显变浅, 表明提取效果较好。

2.3 大孔树脂纯化

玫瑰茄花萼40%乙醇提取液中还含有蛋白质、多糖及其他一些化合物, 在高速逆流色谱分离前除去部分水溶性杂质可以提高后续分离的效率及效果, 文献表明大孔吸附树脂对花色苷类物质具有较好的纯化效果^[17]。实验采用D101大孔吸附树脂对玫瑰茄花色苷进行富集, 通过梯度洗脱发现, 目标组分主要集中在20%乙醇洗脱液中, 经低温浓缩干燥作为后续HSCCC分离的原料。

2.4 HSCCC 两相溶剂体系的选择及分离效果

高速逆流色谱中分离花色苷的经典溶剂体系主要由水、正丁醇、甲基叔丁基醚、乙腈及少量三氟乙酸组成。实验对多个不同比例的溶剂体系进行选择, 其K

值见表1。由表可见, 溶剂体系1、3、4中两个花色苷的测定的分离度较大, 经HSCCC上机分离发现, 两个组分的分离效果较差, 可能是因为在这些溶剂体系中两个组分的K值均偏小, 在固定相中保留时间短而难以分离。溶剂体系2、5中两个花色苷的K值均有较大提高, 测定的分离度>1.5, 经上机分离发现, 两种溶剂体系对目标组分分离效果相差不大, 能够获得高纯度的花色苷1, 但花色苷2纯度较低, 干扰组分为花色苷1, 因此, 考虑采用相同溶剂体系进行第二次分离提高花色苷2的纯度。

表1 不同溶剂体系的K值

Table 1 The K-values and resolutions of the compounds in different two-phase solvent systems

编号	水:正丁醇:甲基叔丁基醚:乙腈:三氟乙酸(V/V)	K 值		分离度 (K ₂ /K ₁)
		花色苷 1	花色苷 2	
1	6:3:2:1:0.001	0.35	0.88	2.54
2	6:3:1:1:0.001	0.77	1.22	1.58
3	6:3:2:2:0.001	0.46	0.72	1.55
4	5:4:1:1:0.001	0.35	0.94	2.65
5	4:4:1:1:0.001	0.91	1.70	1.86

由于溶剂体系2较体系5的有机溶剂的用量少, 实验最终确定选择溶剂体系2进行玫瑰茄花色苷的HSCCC分离。考察了流动相流速、转速及上样量对分离效果的影响, 最后选择流速2 mL/min、转速850 r/min, 柱温箱25 °C, 在该条件下固定相的保留率为40%, 上样量120 mg。收集124~134 min流出液, 冷冻干燥, 经HPLC检测, 按面积归一法计算得纯度为97.8%; 而136~145 min的流出液为纯度84.5%花色苷2, 该部分浓缩后经二分离, 收集139~148 min流出液, 冷冻干燥, 经HPLC纯度达到95.2% (HSCCC图谱见图2)。在该分离条件下, 一次制备可得到花色苷1干粉21.8 mg, 花色苷2干粉5.3 mg。

2.5 回收率

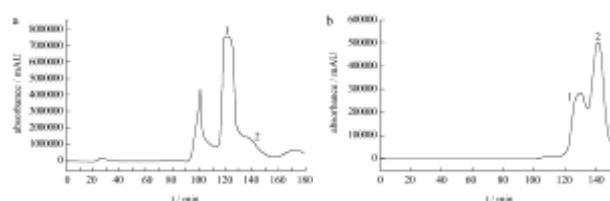


图2 HSCCC 分离图 (280nm)

Fig.2 HSCCC chromatogram of the separation and purification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*

通过该方法, 从玫瑰茄花萼原料分离制备高纯度的花色苷类化合物具有较高的回收率, 其中花色苷1回收率为95.3%, 而花色苷2经过了二次纯化, 回收率

相对较低，但也达到了92.3%。

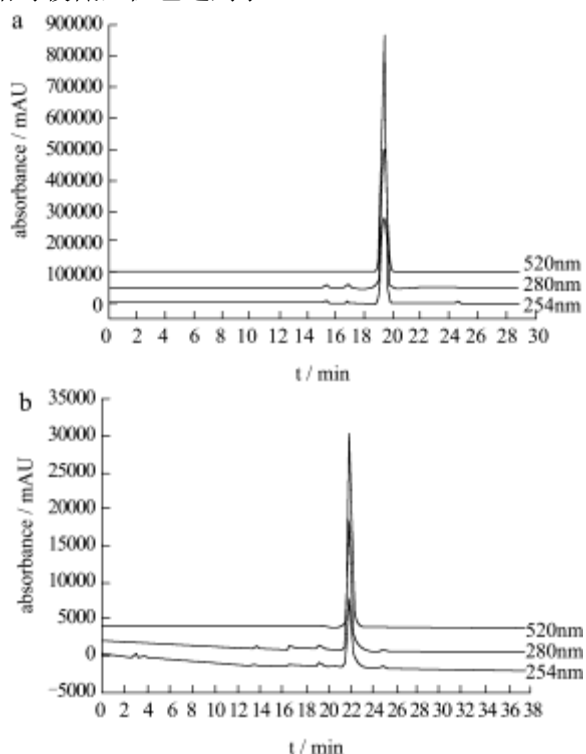


图3 分离组分的HPLC图

Fig.3 HPLC chromatogram of anthocyanin 1 and anthocyanin 2

2.6 结构鉴定

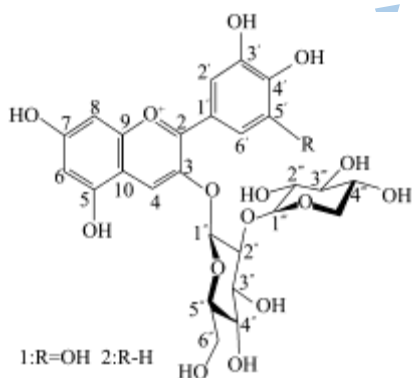


图4 玫瑰茄花色苷的结构式

Fig.4 The chemical structures of dephindin-3-O-sambubioside(1) and cyanidin-3-O-sambubioside(2)

花色苷1: 紫红色粉末, 紫外图谱显示该化合物在280 nm和520 nm有特征吸收, 推测该化合物为花色苷类化合物; LC-MS (ESI, positive) 离子峰m/z为597.1414, 质谱中可见其他离子碎片, 可分别为m/z 303.0496, [M-295+H]⁺, 是分子离子峰失去3-O位上结合的二糖基所得的碎片, 推测为飞燕草素母核; m/z 465.1011, [M-133+H]⁺推测是分子离子峰失去一个糖基所得的碎片, ¹H NMR及¹³C NMR数据见表2。MS、¹H NMR及¹³C NMR与文献^[10,17]相符, 确证为飞燕草素

-3-O-桑布双糖苷, 结构式见图4。

表2 化合物1和化合物2的碳谱及氢谱数据

Table 2 ¹³C-NMR and ¹H-NMR Spectra data for the anthocyanin 1 and 2

Carbon number	Anthocyanin 1		Anthocyanin 2	
	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
2	167.323		167.239	
3	145.550		145.330	
4	133.764	8.50(s)	133.028	8.78(s)
5	157.474		158.013	
6	101.212	6.61(d, J=2.1)	101.968	6.67(d, J=6.3)
7	172.396		172.388	
8	94.025	6.76(d, J=2.1)	94.140	6.99(d, J=1.5)
9	155.506		158.032	
10	111.534		112.012	
1'	117.949		119.123	
2'	111.204	7.69(s)	115.638	7.97(d, J=1.8)
3'	146.771		146.890	
4'	144.101		158.413	
5'	146.771		117.234	6.99(d, J=1.3)
6'	111.204	7.69(s)	126.254	8.29(dd, J=2.1, 9.1)

3-O-β-D-glucoside				
1''	100.739	5.63(d, J=8.4)	100.968	5.60(d, J=5.4)
2''	82.521	4.47(dd, J=2.9, 2.6)	82.056	4.01 (dd, J=8.1, 9.1)
3''	76.617	3.85(t, J=9.0)	77.082	3.80(t, J=9.0)
4''	69.537	3.56(t, J=9.0)	69.568	3.55(dd, J=7.8, 10.2)
5''	74.755	3.65(m)	74.885	3.61(m)
6''	60.779	4.12(dd, J=5.4, 12.0)	60.138	4.00(dd, J=2.1, 10.32)
		3.82(d, J=10.3)		3.82(dd, J=4.2, 1.2)

2''-O-xyllo				
1'''	105.423	4.88(d, J=7.3)	105.234	4.65(d, J=2.7)
2'''	73.954	3.29(dd, J=6.3, 9.0)	74.885	3.26(dd, J=7.2, 6.9)
3'''	77.898	3.31(t, J=9.0)	77.891	3.40(m)
4'''	69.537	3.45(m)	69.536	3.48(m)
5'''	65.845	3.65(dd, J=6.3, 10.5)	65.550	3.72(dd, J=4.8, 3.9)
		3.04(dd, J=10.3, 11.5)		3.16(dd, J=10.5, 11.5)

花色苷2: 所得为紫红色粉末, 紫外图谱显示该化合物在280 nm和520 nm有特征吸收, 推测该化合物为花色苷类化合物; LC-MS (ESI, positive) 离子峰m/z为581.1468。质谱中可见其他离子碎片, 可分别归属为m/z 287.0547, [M-295+H]⁺, 是分子离子峰失去3-O位上结合的二糖基所得的碎片, 推测为矢车菊素母核。¹H NMR及¹³C NMR数据见表2。MS、¹H-NMR及¹³C-NMR与文献^[10,17]相符, 确证为矢车菊素-3-O-桑布双糖苷,

结构见图4。

3 结论

3.1 从玫瑰茄花萼提取液的HPLC图谱可以看出玫瑰茄中花色苷主要有两个,它们在结构上很相似,仅是花色苷1比花色苷2在B环上多一个-OH,极性相差不是很大,因此在HSCCC上要达到完全分离比较困难。本文建立的HSCCC方法第一次分离能得到高纯度的含量相对高的花色苷1,而花色苷2由于极性接近和含量较低,在HSCCC上形成一个近似花色苷1峰的拖尾峰,HPLC检测显示花色苷1的含量约为13%,花色苷2为84.5%。该部分第二次分离,两个化合物分离度显著提高,得到高纯度花色苷2。本工艺建立了高纯度的玫瑰茄花色苷简单、重现性好、适合大量制备的方法,同时也为花色苷的进一步药理研究及质量控制提供了重要的物质基础。

3.2 同时从HPLC图谱可以看出,玫瑰茄花萼中除了花色苷外,还有3个含量相对较高的物质,它们的UV光谱在显示可能为多酚或黄酮类化合物,它们也是玫瑰茄提取物中重要的生物活性物质,有待进一步分离研究。

参考文献

- [1] Pi-Jen Tsai John McIntosh, Philip Pearce, et al. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract [J]. Food Research International, 2002, 35: 351-356
- [2] Hirunpanieh V, Utaipat A, Morales N P, et al. Antioxidant Effects of Aqueous Extracts from Dried Calyx of *Hibiscus sabdariffa* LINN. (Roselle) in Vitro Using Rat Low-Density Lipoprotein (LDL) [J]. Biological and Pharmaceutical, Bulletin, 2005, 28 (3): 481-484
- [3] Yun-Ching Chang, Hui-Pei Huang, Jeng-Dong Hsu, et al. *Hibiscus* anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, 205: 201-212
- [4] Jer-Yuh Liu, Chang-Che Chen, Wen-Hong Wang, et al. The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl₄-induced liver fibrosis in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44: 336-343
- [5] B H Ali, H M Mousa, S El-Mougy. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats [J]. Phytotherapy Research, 2003, 17: 56-59
- [6] M Haji Faraji, A H Haji Tarkhani. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1999, 65: 231-236
- [7] Armando Herrera-Arellano, Judith Miranda-Sánchez, Pedro Ávila-Castro, et al. Clinical Effects Produced by a Standardized Herbal Medicinal Product of *Hibiscus sabdariffa* on Patients with Hypertension. A Randomized, Double-blind, Lisinopril-Controlled Clinical Trial [J]. Planta Medica, 2007, 73(1): 6-12
- [8] Chanida Hansawasdi, Jun Kawabta, Takanori Kasai. α -Amylase inhibitors from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64: 1041-1043
- [9] E Kowalczyk, P Krzesiński, M Kura, et al. Anthocyanins in medicine [J]. Pol J Pharmacol, 2003, 55(5): 699-702
- [10] Qizhen Du, Gerold Jerz, Peter Winterhalter. Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1045: 59-63
- [11] 陆英, 李佳银, 罗晋, 等. 高速逆流色谱制备分离紫甘薯花色苷 [J]. 分析化学, 2011, 39(6): 851-856
- [12] LU ying, LI Jia-yin, LUO Jin, et al. Preparative Isolation of Anthocyanins from Purple Sweet Potato by High-speed Counter-current Chromatography [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(6): 851-856
- [13] 李升锋, 刘学铭, 陈智毅, 等. 玫瑰茄花萼营养和药理作用研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2006, 10(127): 129-133
- [14] LI Sheng-feng, LIU Xue-ming, CHEN Zhi-yi, et al. Recent Advance In The Studies On Chemical Composition And Pharmacological Functions Of *Hibiscus sabdariffa*. Calyx. [J]. Food Research And Development, 2006, 10(127): 129-133
- [15] P Markakis. Anthocyanins as food colors [M]. San Diego: Academic Press, 1982
- [16] L Fernando Reyes, L Cisneros-Zevallos. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Food Chemistry, 2007, 100(3): 885-894
- [17] Wei-Dong Wang, Shi-Ying Xu. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 82: 271-275
- [18] MR Ochoa, AG Kessler, A De Michelis, et al. Kinetics of colour change of raspberry, sweet (*Prunus avium*) and sour (*Prunus cerasus*) cherries preserves packed in glass containers: light and room temperature effects [J]. Journal of Food Engineering, 2001, 49: 55-62
- [19] 尹忠平, 洪艳平, 徐明生, 等. 大孔树脂吸附纯化粗提玫瑰茄红色素研究 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(6): 1026-1030

- YIN Zhong-ping, HONG Yan-ping, XU Ming-sheng, et al. A Study on Refining of Crude Extraction of Roselle Calyx Red Pigment by Macro-porous Resin [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2007, 29(6): 1026-1030
- [18] Antonio Segura-Carretero, Miguel A Puertas-Mejía, Sonia Cortacero-Ramírez, et al. Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from Hibiscus sabdariffa L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight/ion trap) [J]. Electrophoresis 2008, 29: 2852-2861

现代食品科技