

# 仪器分析综合实验设计：pH示差法和HPLC法测定黑米中总花青素含量

陈恺昕<sup>1</sup>, 吴成琳<sup>1</sup>, 赵美莲<sup>2</sup>, 余蓉<sup>1\*</sup>, 谢欣<sup>1\*</sup>, 范雨<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学医学技术学院, 四川 成都

<sup>2</sup>成都中医药大学公共卫生学院, 四川 成都

收稿日期: 2023年7月17日; 录用日期: 2023年8月28日; 发布日期: 2023年9月6日

## 摘要

设计了一个综合性实验, 以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G)作为外标物, 旨在比较pH示差法和高效液相色谱法(HPLC)检测黑米中总花青素含量的结果, 对两种方法的准确性进行评估。实验结果表明, pH示差法检测黑米中的C3G含量为29.95 mg/L, HPLC法测定结果为36.79 mg/L, 两种检测结果差异较小。在缺乏高效液相色谱仪的实验室中, 可用pH示差法替代检测黑米中总花青素含量。该综合实验将光谱、色谱知识内容与样品前处理、数据处理、问题分析等实际应用有机结合, 通过科研全流程的模拟, 增强了学生对理论知识与实际操作相互关系的理解, 拓展了知识内容, 激发了学习兴趣。学生通过该实验, 巩固了《仪器分析》的基本原理和方法, 掌握了系统科学的研究方法, 对其专业素养与创新思维的提升与培养具有重要意义。

## 关键词

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷, 仪器分析, pH示差法, 高效液相色谱法(HPLC), 综合实验教学

# Comprehensive Experimental Design for Instrumental Analysis: Determination of Total Anthocyanins in Black Rice by pH Differential Method and HPLC Method

Kaixin Chen<sup>1</sup>, Chenglin Wu<sup>1</sup>, Meilian Zhao<sup>2</sup>, Rong Yu<sup>1\*</sup>, Xin Xie<sup>1\*</sup>, Yu Fan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

<sup>2</sup>School of Public Health, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

\*通讯作者。

文章引用: 陈恺昕, 吴成琳, 赵美莲, 余蓉, 谢欣, 范雨. 仪器分析综合实验设计: pH 示差法和 HPLC 法测定黑米中总花青素含量[J]. 创新教育研究, 2023, 11(9): 2585-2594. DOI: 10.12677/ces.2023.119381

## Abstract

A comprehensive experiment using centaurin-3-O-glucoside (C3G) as external standard was designed to compare the results of pH differential method and high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of total anthocyanins in black rice, and to evaluate the accuracy of the two methods. The results showed that the content of C3G in black rice by pH difference method was 29.95 mg/L, and that by HPLC method was 36.79 mg/L. In the laboratory without high performance liquid chromatography, the pH differential method can be used to detect the total anthocyanins in black rice. The comprehensive experiment organically combined the knowledge content of spectrum and chromatography with practical applications such as sample pre-processing, data processing and problem analysis. Through the simulation of the whole process of scientific research, students' understanding of the relationship between theoretical knowledge and practical operation was enhanced, knowledge content was expanded, and learning interest was stimulated. Through this experiment, students consolidated the basic principles and methods of Instrumental Analysis and mastered the research methods of systematic science, which was of great significance to the improvement and training of their professional quality and innovative thinking.

## Keywords

Cyanidin-3-O-Glucoside, Instrumental Analysis, pH Differential Method, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Comprehensive Experiment Teaching

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

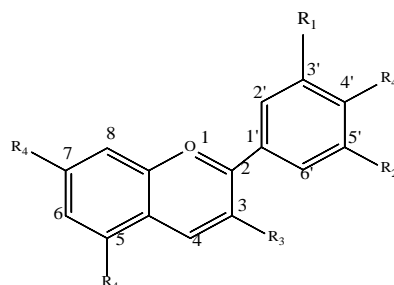
## 1. 引言

实验教学是高等教育的重要组成部分，是现代教学的重要方式之一，对于大学生动手能力和创新思维的培养具有极其重要的作用。但是，现在的本科实验教学多以教师为主导，以教材为依据，以验证性实验为主，导致相当一部分实验项目的实训内容过于基础，操作过于程式化和单一化，强调技术的规范和熟练，忽略了学生科研思维和能力的培养，难以激发学生的主动性、兴趣性和创造力。为改善以上实验教学的现状，综合实验教学是现高校实验教学改革的重要组成部分。

当下的《仪器分析》实验教学内容过于孤立，集中在光、电、色谱等内容上，过分侧重于各部分知识本身的独特性和整体性，只强调单一内容的理解和掌握，比较缺少光、电、色谱等内容之间的联系和交流，更缺乏的是把各部分知识的要素串联起来，从中揭示知识体系之间的本质关系和发展规律的能力。而且，受实验教材、实验学时等方面的影响，在实验内容上也以验证性实验为主，学生按部就班地操作，过程受到教师和教材的限制，课堂沉闷，不利于学生兴趣的发展和活力的体现。有鉴于此，综合实验教学应以多学科或者跨学科的实验内容为主，尽量考虑到实验方法的综合性，促进对学科的交叉性、方法的融合性、学生的创新性等方面的培养，以区别于传统的实验教学，更好地构建、培养学生的整体思维能力和科研素养及技能。

花青素是一种水溶性天然色素，属类黄酮，3,5,7,4'-四羟基黄酮阳离子的糖基化衍生物，因其在 B 环

上存在不同的取代基, 形成不同种类的花青素[1], 基本结构如图 1 所示。花青素广泛存在于水果、蔬菜和花卉等天然植物中, 可使植物(叶、茎、根、花和果实)的颜色呈现红色、紫色或蓝色, 具有抗炎[2] [3]、抗癌[4] [5]、抗动脉粥样硬化[6]和抗哮喘[7]等作用。迄今为止, 超过 635 种不同类型的花色苷在自然界中被鉴定出来, 自然界中含量最丰富的花色苷为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(Cyanidin-3-O-glucoside, C3G) [8], 黑米富含 C3G, 具有较高的营养价值。



注:  $R_1$  和  $R_2$  是 H、OH、 $OCH_3$ ,  $R_3$  是糖苷或 H,  $R_4$  是糖基或 OH

Figure 1. Basic structure of anthocyanins

图 1. 花青素基本结构

pH 示差法和高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC) [9]常用于花青素的定量检测。官方农业化学家协会(AOAC)通常采用 pH 示差法测量各种植物的花青素, 研究实验室和食品工业中富含花青素的水果和蔬菜[10] [11]。它是一种快速、简便的方法, 不需要高成本的仪器。原理如图 2 所示, 花青素在低 pH 时以黄酮阳离子(红色)存在, 在 pH4.5 时转化半缩酮形式(无色) [12], 利用不同 pH 下花青素结构转变引起吸光度变化, 从而实现对花青素的测定[13] [14]。近年来, 随着 HPLC 的广泛应用, HPLC 结合紫外/可见检测/二极管阵列检测(DAD)成为最重要的色谱技术之一, 可用于分离、鉴定和定量单个花青素, 被认为是一种可靠的检测花青素的方法[8]。

运用 HPLC 检测 C3G 的研究已在大量文献中报道过, 也出现运用智能手机与比色法相结合检测 C3G 的报道[15], 然而很少有研究对比 pH 示差法与 HPLC 方法检测 C3G 含量。结合自身科研工作和文献调研, 设计了该综合实验, 目的在于对比 pH 示差法与高效液相色谱法检测黑米中 C3G 的准确性, 并对两种方法所得到的结果进行分析。学生自主从样品的提取溶剂、C3G 的结构等方面分析 pH 示差法和 HPLC 法检测 C3G 结果差异的原因, 进一步探究了 C3G 的结构特性对检测结果的影响, 为实验室进行 pH 示差法和 HPLC 法评估定量检测的准确性提供了新的思路, 也为实际样品中 C3G 的检测方法选择提供重要依据。该综合实验培养学生从实际问题出发, 探索不同路径解决问题的能力, 并对几种所学的仪器分析原理加以巩固, 了解科学前沿的热点、掌握科学研究的方法, 培养综合思维以及创新能力, 可作为《仪器分析》课程的综合实验设计。

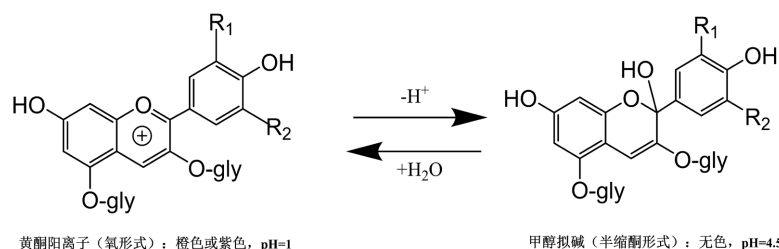


Figure 2. Predominant structural forms of anthocyanins present at different pH levels

图 2. 在不同 pH 值下花青素的存在形式

## 2. 材料和方法

### 2.1. 材料与仪器

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准品(纯度  $\geq 98\%$ )中国四川省维克奇生物科技有限公司; 甲醇色谱纯, 成都市科隆化学品有限公司; 氯化钾、无水乙酸钠、盐酸分析纯, 成都市科龙化工试剂厂; 磷酸分析纯, 天津市致远化学试剂有限公司; 其他试剂皆为分析纯, 无需进一步纯化。在整个实验过程中使用电阻率为  $18.25\text{ M}\Omega$  的超纯水。

黑米(*Semen Trigone*.)采购于成都市场。在使用样品前, 将黑米样品置于室温下避光保存。

KQ-500DE 型数控超声波清洗器中国江苏昆山市超声仪器有限公司; L500 医用离心机中国长沙湘仪离心机仪器有限公司; A580 紫外可见分光光度计中国上海翱艺仪器有限公司; PHS-25 pH 计上海艺电科学仪器股份有限公司; QE100 高速粉碎机中国浙江屹立工贸有限公司; LC-20 液相色谱仪日本岛津公司; HH-1 数显恒温水浴锅中国常州澳华仪器有限公司。

### 2.2. 标准溶液的配制

C3G 标准储备液: 称取  $10\text{ mg}$  的 C3G, 溶解于  $5\text{ mL}$  的甲醇, 得到  $2\text{ mg/mL}$  的储备液, 置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱避光保存备用。

系列标准溶液: 根据需要稀释 C3G 储备液, 用甲醇稀释储备液以获得  $0.5\text{--}60\text{ mg/L}$  浓度范围的标准溶液, 避光保存, 临用现配。

### 2.3. 缓冲溶液的配制[16]

对 pH 示差法所需要的缓冲溶液进行配制。

氯化钾 - 盐酸缓冲溶液的制备: 准确称取  $1.49\text{ gKCl}$ , 用超纯水定容至  $100\text{ mL}$ ; 将浓 HCl 用超纯水稀释至浓度为  $0.2\text{ mol/L}$ 。KCl 溶液与  $0.2\text{ mol/L HCl}$  按照体积比  $25:67$  进行混合配制。用 KCl 溶液调 pH 至  $1.0(\pm 0.1)$ 。

乙酸钠缓冲溶液的制备: 准确称取  $1.64\text{ g}$  无水乙酸钠, 用超纯水定容至  $100\text{ mL}$ , 用  $0.2\text{ mol/L HCl}$  调 pH 至  $4.5(\pm 0.1)$ 。

### 2.4. 样品处理[17] [18]

黑米使用高速粉碎机粉碎, 过  $80$  目筛, 称取  $0.5\text{ g}$  黑米粉末溶于  $5\text{ mL}$  甲醇, 混匀后避光超声  $30\text{ min}$ , 将混合物以  $3000\text{ rpm/min}$  离心  $5\text{ min}$ 。重复提取一次后, 取上清液混匀, 通过  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  滤膜过滤。将黑米提取液避光储存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中。

### 2.5. pH 示差法

#### 2.5.1. 实验步骤

将所提取的黑米样品用盐酸 - 氯化钾缓冲液(pH1.0)和乙酸钠缓冲液(pH4.5)分别进行稀释, 稀释  $10$  倍至最终体积为  $2\text{ mL}$ , 在  $30^\circ\text{C}$  下反应  $50\text{ min}$  后, 以蒸馏水作为空白对照, 在  $516\text{ nm}(\lambda_{\text{max}})$  和  $700\text{ nm}$  处测量两种稀释液(pH1.0 盐酸 - 氯化钾缓冲液和 pH4.5 乙酸钠缓冲液)下的黑米样品的吸光度, 每个样品浓度(mg/L)根据公式计算并表示为 C3G 的含量。

#### 2.5.2. 经验公式计算方法[19]

使用以下公式计算原始样品中的 C3G 浓度(mg/L)

$$c(\text{mg/L}) = \frac{A \times DF \times MW \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

其中  $A = (A_{516} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{516} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$ 。

MW 是 C3G 的分子量为 449.2 g/mol; DF 是稀释因子(0.2 mL 样品稀释至 2 mL, DF = 10);  $\epsilon$  是 C3G 的消光系数( $L \times \text{cm}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$ ) = 26,900, 其中 L(路径长度, cm) = 1。

## 2.6. 高效液相色谱分析条件

### 2.6.1. 波长选择

在 HPLC 法进行含量测定时, 为了提高方法的灵敏度, 降低干扰, 往往选用主成分的最大吸收波长作为检测波长。因此, 用紫外分光光度计在 200~800 nm 范围内扫描 25 mg/L 的 C3G 标准溶液。从标准溶液的紫外光谱(图 3)中可看出, C3G 在 516 nm 处有最大吸收峰, 故 C3G 的最大吸收波长为 516 nm。所以, 本实验中 HPLC 法的紫外检测器均设置为 516 nm。

### 2.6.2. HPLC 分析条件

根据文献所描述方法[20]分析 C3G, 紫外检测器设置为 516 nm, 使用配备 ZORBAX Eclipse Plus C18 (250 mm  $\times$  4.6mm, 5  $\mu\text{m}$ )。柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。洗脱液为流动相 A (0.5% 甲酸水溶液)和流动相 B (0.5% 甲酸甲醇溶液)。进行梯度洗脱, 色谱条件为: 0~6 min, B (10~20%); 6~10 min, B (20~30%); 10~15 min, B (30~35%); 15~20 min, B (35~50%); 20~24 min, B (50~90%); 24~29 min, B (90~10%); 29~30 min, B (10%), 流动相流速为 1 mL/min, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. pH 示差法

#### 3.1.1. pH 的选择

通过测量 2 个不同 pH 值(pH 3.4 和 2.0)下吸光度变化来确定材料中花青素含量的概念是 1948 年由 Sondheimer 等人首次提出[21], 他们使用 pH 2.0 和 pH 3.4 溶液之间的差异测量来确定草莓和草莓产品中花青素的浓度。从那时起, 研究人员进行了方法条件的优化评估, 最终提出使用 pH 值 1.0 和 4.5 [14]作为示差法的 pH 条件用于花青素的定量检测。pH 示差法是一种根据花色苷发色团在 pH 1.0~4.5 之间的结构变化, 从而测定单体花青素含量的方法。在 pH 值为 1.0 时, 以有色的氧羰基(红色)为主; 在 pH 值为 4.5 时, 以半缩酮(无色)为主。pH 示差法基于该反应, 即使在聚合降解色素和其他干扰化合物存在的情况下, 也可以准确快速地测量花青素。因此, 在本研究中, 选用 1.0 和 4.5 作为 pH 示差法的 pH 值用于准确检测黑米中总花青素含量。

#### 3.1.2. 波长的选择

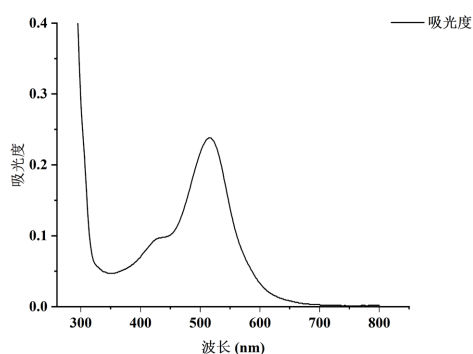


Figure 3. UV spectrum of C3G

图 3. C3G 的紫外光谱图

根据朗伯-比尔定律[22],在两个不同的 pH 下,花青素的吸光度差值与花青素含量呈正比。通过两个 pH 在同一波长(花青素最大可见吸收波长)下的吸光度差值以及在 700 nm 处测得的用于校正略微浑浊供试液的吸光度值可求得花青素[23]。为确定最大吸收波长,首先将光谱仪校准为零,然后在 200~800 nm 范围内扫描 C3G 标准品(25 mg/L)的最大吸收波长。如图 3 所示,在 516 nm 处观察到强吸收峰,确定 516 nm 为 C3G 的最大吸收波长。因此,选用 516 nm 和 700 nm 作为 pH 示差法检测黑米中总花青素含量的波长。

### 3.1.3. 样品的测定

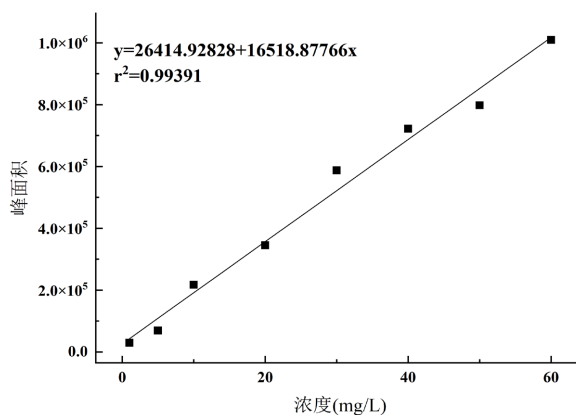
pH 示差法是一种快速简便的测定花青素的方法[24],花青素色素在不同 pH 值呈现不同的结构状态,并且吸收光谱明显发生不同。分别在 516 nm (最大吸收波长)和 700 nm 处检测不同 pH 值下黑米样品的吸光度,将检测结果代入 2.5.2 中经验公式,计算得到黑米中 C3G 的结果。在检测样品的过程中,样品中存在一些胶状物质,出现浑浊外观,故检测 700 nm 处吸光度以校正雾度是有必要的。如表 1,黑米样品中 C3G 的平均含量为 29.95 mg/L。

**Table 1.** Detection results of C3G in black rice samples by pH differential method

**表 1.** 黑米样品中 C3G 的 pH 示差法检测结果

样品	组别	pH	吸光度		浓度 (mg/L)	平均浓度 (mg/L)
			516 nm	700 nm		
黑米	①	1.0	1.086	0.684	31.23	29.95
		4.5	0.407	0.192		
	②	1.0	1.122	0.708	32.90	
		4.5	0.405	0.188		
	③	1.0	1.121	0.708	25.72	
		4.5	0.499	0.240		

## 3.2. HPLC 法



**Figure 4.** Calibration curve of C3G

**图 4.** C3G 的校准曲线

在检测黑米 C3G 的体系中,以 C3G 标准品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,建立了标准曲线(图 4),线性方程为  $y = 26414.92828 + 16518.87766x$ , C3G 在 1~60 mg/L 不同浓度范围内与峰面积具有良好的线性关系(相关系数  $r^2$  为 0.99391)。如图 5 所示,在  $\lambda$  为 516 nm 处,将黑米样品提取液的 HPLC 色谱图与

40 mg/L C3G 标准液进行保留时间比较, 确定黑米样品中峰 1 (图 6) 为 C3G, 将峰 1 的峰面积代入上述线性方程, 计算得到黑米提取液中 C3G 的含量为 36.79 mg/L。

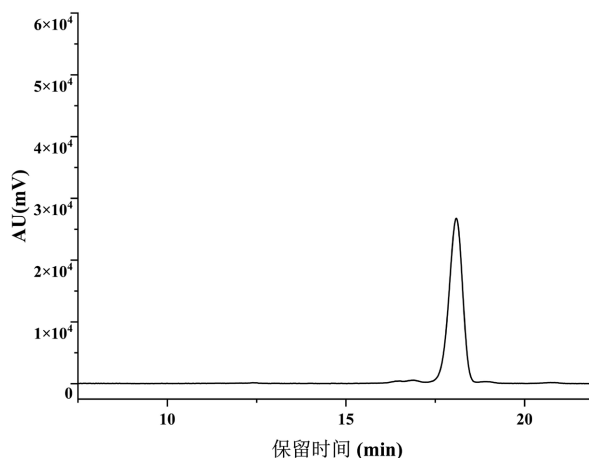


Figure 5. Chromatogram of C3G

图 5. C3G 标准液的色谱图

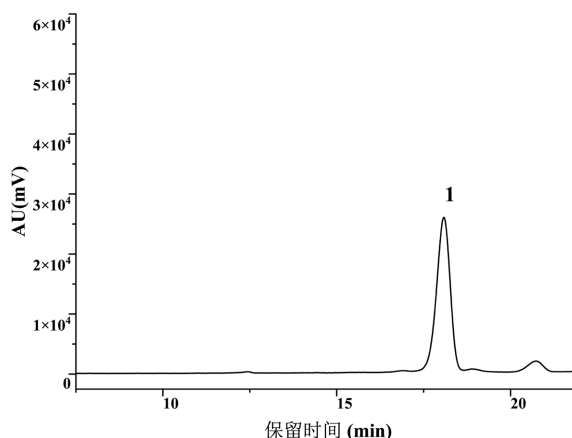


Figure 6. Chromatogram of black rice sample

图 6. 黑米样品提取液的色谱图

### 3.3. pH 示差法和 HPLC 法对比

通过两种方法的结果可判断(表 2), HPLC 法和 pH 示差法检测黑米中的 C3G 结果比较一致。由于黑米中 C3G 是由甲醇提取, 这种溶剂体系能使细胞变性, 同时溶解花青素并使其稳定[25]。花青素与一般的黄酮类化合物一样, 具有含极性取代基(羟基、羧基和甲氧基)的芳香环和葡萄糖苷残基, 这些残基都会导致分子具有极性[26], 可在温和条件下用冷酸化溶剂(极性有机溶剂、水)提取花青素[26]。有机溶剂通常是甲醇, 但也可以使用丙酮、乙醇或乙腈等。本实验中, pH 示差法检测正常黑米中的 C3G 含量为 29.95 mg/L, 而 HPLC 法测定结果为 36.79 mg/L, 由此可判断 pH 示差法检测黑米 C3G 虽具有一定的准确性, 但 pH 示差法所检测的结果相较 HPLC 法而言较低。导致这种结果的可能原因为花青素通常与辅色素结合, 以共呈色的形式存在[27], 因此花青素含量越高, 这种作用越强。这种现象往往会导致偏离朗伯-比尔定律[22]的现象出现, 从而影响 pH 示差法对 C3G 的含量测定。其次, pH 示差法仅针对游离状态的花青素分子, 而聚合形式的花青素在 pH 值分别为 1.0、4.5 时均有吸收[23], 因此在 pH 值为 1.0 时, 辅色

素不完全转化导致游离态花青素分子较少[28], 可能为 pH 示差法结果偏低的另一个原因。HPLC 是鉴别和定量样品中不同个体花青素的重要工具, 其具有分辨率高、灵敏度高、不易受环境影响等优点, 可用于含量低、结构复杂的花青素含量测定。pH 示差法是一种简单、快速、经济的测定样品中花青素含量的方法, 但由于其易受仪器、温度、溶液 pH 值及操作等的影响[29]。相比较下, HPLC 法测定结果比 pH 示差法更加准确。

在本实验中, HPLC 法和 pH 示差法检测黑米中的 C3G 结果相差不大, 而 HPLC 方法仪器昂贵并且检测时间长, 因此, 在一定条件下可用 pH 示差法代替 HPLC 进行黑米中 C3G 的测定。

**Table 2.** Comparison of the determination of C3G in black rice by pH differential method and HPLC  
**表 2.** pH 示差法与 HPLC 法测定黑米中 C3G 的比较

方法	HPLC	pH 示差法
浓度范围(mg/L)	1~60	-
线性方程	$Y = 26414.92828 + 16518.87766x$	-
相关系数	0.99391	-
样品浓度(mg/L)	36.79	29.95

#### 4. 结语

本实验教学模式是一种学生在教师的引导下, 结合理论知识的基础上, 以小组为单位, 自主完成实验方案的设计, 独立实施实验过程, 并对实验结果进行处理和分析, 得出实验结论的新型实验教学模式。该实验教学强调学生的主体地位, 教师仅仅起到引导和辅助作用, 学生可以在实验过程中加强对理论知识的理解和发现, 提出问题并寻求解决办法, 在此过程中逐渐培养自主性和创新性, 从而养成科学的实验素养和创新精神。

该综合实验涵盖了仪器分析最重要的光谱、色谱两大块知识内容, 包含查阅文献、实验技能培养、方案设计、数据处理和机制讨论等环节, 能让学生得到较为系统的科学研究训练, 全方位培养学生的科研素养与创新能力, 开发学生科研探索的潜力, 提升学生综合科学素质。此实验教学内容难度适中、可操作性强、综合性较强, 适合仪器分析实验教学以小组式、项目制度的形式向学生开放, 能充分调动学生的主观能动性, 激发探究意识和创新思维。

该综合实验虽得到一些实验结果, 但实验过程中仍存在着一些不足之处, 之后将在以下几个方面进行改进:

(1) 实验过程需要进一步优化。本实验中从正常黑米中提取 C3G 的过程繁琐、耗时长, 后续将进行提取过程优化, 实现繁琐工序重复提取到快速提取的转变, 缩短前处理时间, 最大限度地保证了学生在规定的实验学时内顺利完成实验, 达到实验课安排目的。

(2) 实验教学策略需要进一步完善。本研究是实验内容的改进, 只在实验室中成功完成, 并未在高校推广, 还需要长期的实验教学探索, 并根据实际的教学效果不断改善。此外, 研究并没有涉及教学策略的研究, 没有设计出完整的教学流程。在今后的工作中, 将补充这方面的内容, 设计完善的教学流程, 并且在优化实验的同时, 优化教学过程, 为实验教学的改革做出贡献。

#### 基金项目

四川省自然科学基金项目(2022NSFSC1475); 成都中医药大学 2021 年度校级教学质量工程建设重点项目 ZLGC202136; 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(MPRC2022027); 四川省大学



生创新创业训练计划(S202210633024)。

## 参考文献

- [1] He, Y., Wen, L., Yu, H., *et al.* (2018) Effects of High Hydrostatic Pressure-Assisted Organic Acids on the Copigmentation of *Vitis amurens* Rupr Anthocyanins. *Food Chemistry*, **268**, 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.052>
- [2] Speciale, A., Bashllari, R., Muscarà, C., *et al.* (2022) Anti-Inflammatory Activity of an *in Vitro* Digested Anthocyanin-Rich Extract on Intestinal Epithelial Cells Exposed to TNF- $\alpha$ . *Molecules*, **27**, Article No. 5368. <https://doi.org/10.3390/molecules27175368>
- [3] Arfaoui, L. (2021) Dietary Plant Polyphenols: Effects of Food Processing on Their Content and Bioavailability. *Molecules*, **26**, Article No. 2959. <https://doi.org/10.3390/molecules26102959>
- [4] Suantai, B., Jantakee, K., Kaewkod, T., *et al.* (2022) Anthocyanins in Red Jasmine Rice (*Oryza sativa* L.) Extracts and Efficacy on Inhibition of Herpes Simplex Virus, Free Radicals and Cancer Cell. *Nutrients*, **14**, Article No. 1905. <https://doi.org/10.3390/nu14091905>
- [5] de Arruda Nascimento, E., de Lima Coutinho, L., da Silva, C.J., *et al.* (2022) *In Vitro* Anticancer Properties of Anthocyanins: A Systematic Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **1877**, Article ID: 188748. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188748>
- [6] Azman, E.M., Yusof, N., Chatzifragkou, A., *et al.* (2022) Stability Enhancement of Anthocyanins from Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) Pomace through Intermolecular Copigmentation. *Molecules*, **27**, Article No. 5489. <https://doi.org/10.3390/molecules27175489>
- [7] Ma, B., Wu, Y., Chen, B., *et al.* (2019) Cyanidin-3-O- $\beta$ -Glucoside Attenuates Allergic Airway Inflammation by Modulating the IL-4R $\alpha$ -STAT6 Signaling Pathway in a Murine Asthma Model. *International Immunopharmacology*, **69**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.01.008>
- [8] Taghavi, T., Patel, H., Akande, O.E., *et al.* (2022) Total Anthocyanin Content of Strawberry and the Profile Changes by Extraction Methods and Sample Processing. *Foods*, **11**, Article No. 1072. <https://doi.org/10.3390/foods11081072>
- [9] Schiepati, D., Patience, N.A., Campisi, S., *et al.* (2021) Experimental Methods in Chemical Engineering: High Performance Liquid Chromatography—HPLC. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **99**, 1663-1682. <https://doi.org/10.1002/cjce.24050>
- [10] Lee, S.G., Vance, T.M., Nam, T.G., *et al.* (2016) Evaluation of pH Differential and HPLC Methods Expressed as Cyanidin-3-Glucoside Equivalent for Measuring the Total Anthocyanin Contents of Berries. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **10**, 562-568. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9337-9>
- [11] Wang, H. (2014) Rapid Quantitative Analysis of Individual Anthocyanin Content Based on High - Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection with the pH Differential Method. *Journal of Separation Science*, **37**, 2535-2544. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400364>
- [12] Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., *et al.* (2017) Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and the Potential Health Benefits. *Food & Nutrition Research*, **61**, Article ID: 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- [13] He, J. and Giusti, M.M. (2010) Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, **1**, 163-187. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>
- [14] Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E. (2001) Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, No. 1, F1.2.1-F1.2.13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- [15] Bennett, C., Sookwong, P., Jakmunee, J., *et al.* (2021) Smartphone Digital Image Colorimetric Determination of the Total Monomeric Anthocyanin Content in Black Rice via the pH Differential Method. *Analytical Methods*, **13**, 3348-3358. <https://doi.org/10.1039/D1AY00719J>
- [16] 马凯, 杨鸿波, 唐年琴. 蓝莓花色苷含量分析及定量方法的比较——以贵州麻江引种蓝莓为例[J]. 贵州科学, 2015, 33(2): 20-24.
- [17] 赵珊, 席清清, 李曦, 等. 超高效液相色谱法测定有色稻米中花色苷的含量[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(11): 301-306.
- [18] 廖若宇, 刘新保, 张春娥, 等. 黑米中矢车菊色素的提取工艺优化及测定[J]. 中国调味品, 2021, 46(11): 166-172.
- [19] Fuleki, T. and Francis, F.J. (1968) Quantitative Methods for Anthocyanins. 1. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries. *Journal of Food Science*, **33**, 72-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb00887.x>

- [20] 中华人民共和国农业部. NY/T 3164-2017 黑米花色苷的测定高效液相色谱法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [21] Sondheimer, E. and Kertesz, Z.I. (1948) Anthocyanin Pigments. *Analytical Chemistry*, **20**, 245-248. <https://doi.org/10.1021/ac60015a017>
- [22] Boulton, R. (2001) The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **52**, 67-87. <https://doi.org/10.5344/ajev.2001.52.2.67>
- [23] Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E., *et al.* (2005) Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, **88**, 1269-1278. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269>
- [24] Taghavi, T., Patel, H. and Rafie, R. (2022) Comparing pH Differential and Methanol - Based Methods for Anthocyanin Assessments of Strawberries. *Food Science & Nutrition*, **10**, 2123-2131. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2065>
- [25] Navas, M.J., Jiménez-Moreno, A.M., Bueno, J.M., *et al.* (2012) Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part IV: Extraction of Anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **42**, 313-342. <https://doi.org/10.1080/10408347.2012.680343>
- [26] Karaaslan, N.M. and Yaman, M. (2017) Anthocyanin Profile of Strawberry Fruit as Affected by Extraction Conditions. *International Journal of Food Properties*, **20**, S2313-S2322. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1368548>
- [27] Klisurova, D., Petrova, I., Ognyanov, M., *et al.* (2019) Co-Pigmentation of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Anthocyanins with Phenolic Co-Pigments and Herbal Extracts. *Food Chemistry*, **279**, 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.125>
- [28] Prodanov, M.P., Dominguez, J.A., Blazquez, I., *et al.* (2005) Some Aspects of the Quantitative/Qualitative Assessment of Commercial Anthocyanin-Rich Extracts. *Food Chemistry*, **90**, 585-596. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.017>
- [29] 彭祖茂, 邓梦雅, 严虞虞, 等. 植物中花青素含量测定及种类分布研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(17): 100-104.