

# 血橙花色苷研究进展

曹少谦, 潘思轶\*

(华中农业大学食品科技学院 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 花色苷是人们最熟悉的水溶性天然食用色素, 有着巨大应用潜力, 而血橙是柑橘中唯一含花青素类色素的品种。本文综述了近年来国外学者在血橙花色苷的含量测定、提取纯化、鉴定、种类及性质等方面的工作和进展, 为血橙中有效成分花色苷的研究, 及进一步开发利用血橙资源提供参考。

**关键词:** 血橙; 花色苷; 花色素

## Review of Anthocyanins from Blood Orange

CAO Shao-qian, PAN Si-yi\*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Anthocyanins are responsible for the red, purple, and blue colors of many fruits. They are water-solubility. Blood orange is the only breed of orange which contain anthocyanins. The quantitative methods, isolation and identification methods of anthocyanins from blood orange were reviewed in this article. The article provided a scientific basis for researching and developing blood orange anthocyanins as effective ingredients, exploiting and utilizing blood orange resource for further.

**Key words:** blood orange; anthocyanin; anthocyanidin

中图分类号: TS264.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)09-0278-04

血橙属于甜橙类, 因果肉具红色血丝或血斑而得名, 其肉质细软、多汁化渣、风味酸甜, 且有玫瑰香气。我国引入的血橙品种有路比(Ruby)血橙、塔罗科(Tarocco)血橙、马耳他(Maltaise)血橙、桑吉耐洛(Sanguinello)血橙、摩洛(Moro)血橙、脐血橙等。其中路比血橙别名红玉血橙、红花橙、红蜜橙, 为最老的血橙品种之一, 原产地中海地区, 我国四川、广东、广西和湖南等地均有栽培; 塔罗科血橙被称为血橙之王, 自意大利引进, 品系较多, 是我国柑桔品种结构调整中的主要换代新品种, 发展潜力极大。此外, 从西班牙引进的脐血橙, 从意大利、西班牙引进的摩洛血橙、桑吉耐洛血橙在四川、湖南也有少量栽培。

使柑橘呈现红色的色素有两种类型, 一类是脂溶性的类胡萝卜素类, 如番茄红素、 $\beta$ -胡萝卜素等; 一类是水溶性的花青素类。血橙就是典型的因花青素类着色的品种<sup>[1]</sup>。血橙果肉的红色是花青素与糖结合形成的甙化合物所致, 血橙是柑橘中唯一含花青素类的品种<sup>[2, 3]</sup>。其色素的形成取决于基因、生理因素及果实的成熟度, 土壤和气候等条件, 即到达一定的成熟期, 在低温下才能形成。

花色苷(anthocyanin)种类较多, 与食品应用相关的主要是3种糖(葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖)和色素结合形成的花色苷。花色苷由一个糖苷配基花色素与一个或几个糖酯化而成, 研究表明, 一般多为单糖和双糖。花色苷水解失去糖基后的配体即称花色素或花青素(anthocyanidin)。花色素属生物类黄酮, 其水溶性比花色苷的水溶性差。在自然界中尚未发现游离的花色素<sup>[4]</sup>。花色素是以3, 5, 7-三羟基-2-苯基苯并吡喃(3, 5, 7-trihydroxyflavylium-2-phenylbenzopyrylium)为基本结构, 花色基元中的氧原子是四价的。花色素种类很多, 这是由在花色基元上引入的羟基、甲氧基等取代基的数量和位置所决定的。主要花色素有天竺葵色素(pelargonidin), 矢车菊色素(cyanidin), 飞燕草色素(delphinidin), 甲基花青素(peonidin), 3'-甲花翠素(3'-petunidin), 锦葵色素(malvidin), 报春花色素(hirsutidin), 苦苣苔色素(gesneridin)。

花色苷类物质在国内往往是以天然色素的形式加以开发利用的, 近年来研究发现其具有独特的生理活性。有文献指出花色苷具有抗氧化、抗血栓、抗辐射、抗动脉粥样硬化、预防糖尿病等功效, 已开发了一些含

收稿日期: 2005-10-20

\*通讯作者

基金项目: 农业部农业结构调整重大技术研究专项(04-09-03B)

作者简介: 曹少谦(1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工化学。

有花色苷的功能性食品和化妆品。但目前国内对花色苷具体成分的鉴定缺乏研究,尤其是对血橙花色苷的研究尚属空白。目前,国外对血橙花色苷的研究主要集中在花色苷种类数量的研究以及血橙在加工过程中花色苷的降解及抗氧化抗辐射活性变化。本文针对近年来国外血橙中花色苷的研究状况进行综述,为今后国内进一步的研究和综述开发利用提供参考。

## 1 血橙中花色苷含量测定的研究

花色苷的含量决定血橙果肉颜色。花色苷含量是血橙产品商业价值、该产品日摄入量及药理学活性的评价指标。因此测定血橙鲜果或浓缩果汁中花色苷含量可以作为产品质量控制的一个指标<sup>[5]</sup>。测定其含量的方法大致可分为光谱法和色谱法两类。

### 1.1 光谱法

花色苷测定方法很多,但主要是基于光谱测定法。光谱法是测定花色苷在可见区的吸光度,但需要合适的标品制作标准曲线。目前报道的光谱法测定血橙花色苷含量的方法有五种,其中三种是文献报道的方法,另两种是意大利柑橘汁加工厂所采用的方法。

方法一<sup>[6]</sup>: 10ml 澄清橙汁用 95% 乙醇/37% 盐酸混合液(20.3/79.7, V/V)稀释至 100ml, 535nm 测定吸光值。结果表示为  $C_{mg/100ml} = (A/0.1) \times 10$ 。

方法二<sup>[7]</sup>: 2ml 澄清橙汁用 pH1 的溶剂(125ml 0.2mol/L 的 KCl+375ml 0.2mol/L 的 HCl)稀释至 25ml, 另取 2ml 用 pH4.5 的溶剂(400ml 1mol/L 的  $CH_3CO_2Na$ +240ml 1mol/L 的 HCl+360ml  $H_2O$ )稀释至 25ml, 510nm 测定吸光值。结果表示为  $C_{mg/L} = (A_{pH1} - A_{pH4.5}) \times 484.82 \times 1000/24825 \times DF$ , 其中 484.82 是矢车菊素-3-葡萄糖苷的分子量, 24825 是其摩尔吸光系数, DF 是稀释度。

方法三<sup>[8]</sup>: 25ml 澄清橙汁用 95% 乙醇/37% 盐酸混合液(80/20, V/V)稀释至 100ml, 分别在 420、530、620nm 测定吸光值。结果表示为  $C_{mg/L} = NetA_{530}/slope \times DF$ , 其中  $NetA_{530} = A_{530} - (A_{420} + A_{620})/2$ , slope 是矢车菊素-3-葡萄糖苷的标准曲线的斜率, DF 是稀释度。

方法四: 样品制备同三, 在 535nm 测定吸光值, 结果表示为  $C_{mg/L} = A_{535}/98.2 \times 10000 \times DF$ , 98.2 是 1%(W/V) 越桔花色苷溶液的吸光率, 10000 是 g/100ml 与 mg/L 的转化因数, DF 是稀释度。

方法五: 样品制备同三, 532nm 测定吸光值。结果表示为  $C_{mg/L} = A_{532}/402.3 \times 10000 \times DF$ , 402.3 是 1%(W/V) 血橙花色苷溶液的吸光率, 10000 是 g/100ml 与 mg/L 的转化因数, DF 是稀释度。

资料显示, 方法二的测定结果比较可靠, 即只有用酸性水溶液和矢车菊素-3-葡萄糖苷作标品时, 光谱法测得的结果才是可靠的<sup>[9]</sup>。原因可能是: 花色苷有色

与无色形式之间的平衡取决于氢离子浓度:  $F^+ + 2H_2O = FOH + H_3O^+$ , 在强酸介质中转化为红色的 2-苯基苯并吡喃阳离子( $F^+$ )。20<sup>-</sup>, 矢车菊素-3-葡萄糖苷的水合平衡的 pK 值为 3.05, 因此吸光值必须在 pH1 左右测定, 此时花色苷以红色形式存在; 各种花色苷都具有相似的光谱特性和分子量, 所以含量可以用含量最高的矢车菊素-3-葡萄糖苷来表示。

### 1.2 HPLC 法

花色苷是决定橙汁颜色的主要因素, 但是由于其自身聚合和多酚的辅色作用会影响颜色强度。因此吸光值是否真实反映实际含量还不能肯定。用溶剂稀释果汁, 使这种相互作用降到最小是很有必要的。采用 HPLC-UV 对血橙中花色苷进行定量分析, 选择矢车菊素-3-葡萄糖苷作内标, 可以一定程度上避免上述相互作用和 pH 的影响。

血橙花色苷 HPLC 分析多采用  $C_{18}$  柱, 都是双流动相梯度洗脱, A 多为甲酸、乙酸、 $H_3PO_4$  等, B 多为甲醇、乙腈等<sup>[5][9-14]</sup>。Paola Dugo et al 采用 Waters Symmetry  $C_{18}$  色谱柱, 双流动相(A 水/甲酸, 9/1; B 水/甲酸/乙腈, 4/1/5)梯度洗脱, 从 Sicilian 血橙中共分离出 8 种花色苷物质, 其中 5 种是首次检测出的<sup>[10]</sup>。Paolo Rapisarda et al 采用 Sep Pack  $C_{18}$  柱, 双流动相(A 水/乙酸, 85/15; B 水/乙酸/甲醇, 65/15/20)梯度洗脱<sup>[9]</sup>, 花色苷含量结果可表示为  $C_{mg/L} = (area/slope) \times DF$ 。

Bálint Berente et al 对 HPLC 分析条件进行了改进, 比较了 Ultrasep ES RP-18MLD、Hypurity Elite  $C_{18}$ 、Platinum  $C_{18}$ 、Synergi  $C_{12}$ 、Synergi Phenyl 等 5 种色谱柱并且得出了其各自的优化条件, 认为采用 Synergi  $C_{12}$  柱, 乙腈-磷酸缓冲液(pH1.6)为流动相的效果好一些<sup>[15]</sup>。

## 2 血橙中花色苷提取纯化研究

血橙花色苷提取方法的选择决定于提取的目的和花色苷本身的组成。花色苷在中性或弱碱性溶液中不太稳定, 因此提取过程通常要采用酸性溶剂。对于提取溶剂, 甲醇、乙醇优于水。酸性溶剂在破坏植物细胞膜的同时溶解水溶性色素。最常用的提取溶剂是 1% 的盐酸甲醇, 但考虑到甲醇的毒性, 也常选用 1% 的盐酸乙醇溶液。 $CO_2$  超临界流体萃取-超声波联用<sup>[16]</sup>、酶法提取<sup>[17]</sup>花色苷也有报道。粗提物往往含有较多的杂质, 难以对其进行鉴定, 所以必须进行分离纯化。分离纯化方法主要是层析法(纸层析、薄层层析、柱层析)和高效液相色谱法。一般采用以下流程: 酸化甲醇、乙醇或丙二醇粗提; 乙酸乙酯初步纯化; 层析法或 HPLC 进一步分离纯化。

上述的花色苷是在盐酸存在下提取得到的, 所得产品均为花色苷的盐酸盐, 而原东京教育大学教授林孝三

等<sup>[18]</sup>报道的真花色苷的提取过程不用酸类, 所获得的色素完全不含酸类, 其色调与花色苷盐酸盐不同, 呈现出与自然花色非常近似的红色或紫色。真花色苷的发现, 不仅在花色苷化学方面开创了新局面, 而且也是研究花色苷自然存在状态的重要资料。提取过程如下: 原料在 60% 的甲醇中室温浸泡数小时, 再以 60~70 °C 加温 20min 提取; 将提取液减压浓缩成糖浆状, 再将浓缩物用乙醚和乙醇洗涤, 将不溶部分溶于温水, 过滤后再加入等体积乙醇, 在冰箱中静置 4h; 再过滤一次除去杂质, 将滤液在 30~40 °C 的减压下蒸干; 残渣溶于冷水后加入 2 倍乙醇, 在冰箱静置一夜则析出粉末状色素; 为进一步提纯, 将其溶解于 50% 乙醇(60 °C)中, 过滤后将滤液在 30~40 °C 下减压浓缩, 在冰箱静置一夜则结晶出色素, 可用 50% 乙醇再结晶。

### 3 血橙中花色苷鉴定方法的研究

人们对不同植物所含花色苷分离鉴定方法有多种, 早期如 Bate-Smith 曾用纸层析法分离花色苷元<sup>[19]</sup>; Partridge 和 Westall 用此方法来鉴别糖的种类<sup>[20]</sup>; Harbone J. B 在 1958 年提出了花色苷的光谱鉴定法<sup>[21]</sup>。

光谱法在花色苷类物质鉴定中的要点主要有以下几点<sup>[21]</sup>: (1) 花色苷在可见光区 520~560nm 有最大吸收峰; (2) 花色苷样品用 0.01% 的盐酸化甲醇溶解, 加入 5% 的  $\text{AlCl}_3$  乙醇溶液 3~5 滴,  $\lambda_{\text{max}}$  发生蓝移, 说明 B 环上有两个相邻羟基; (3) 加入甲醇钠,  $\lambda_{\text{max}}$  红移且吸光值不随时间下降, 说明 4' 位有羟基且 3 位羟基形成糖苷; (4) 300~330nm 没有吸收峰, 说明分子内没有酰基; (5) 在紫外光下有荧光, 说明 5 位有取代基; (6) 通入  $\text{SO}_2$  不褪色, 说明黄烺阳离子在 4 位上有苯基或甲氧基; (7) 440nm 下的吸光度与  $\lambda_{\text{max}}$  ( $A_{440}/A_{\text{max}}$ ), 根据参考文献值可以判断分子内酰基的个数; (8) 440nm 和  $\lambda_{\text{max}}$  的吸收比率经常用来推断糖苷的位置<sup>[22]</sup>。

另外, 花色苷定性的一些化学方法如下: (1) HCl-镁粉反应: 取色素稀释液 5ml, 加入少许镁粉, 振荡后, 再加几滴盐酸, 色素液产生气泡, 颜色变深, 如不加镁粉, 而只加盐酸, 则无气泡产生, 表明该色素属黄酮类化合物, 能在 HCl-镁粉作用下被  $\text{H}_2$  还原; (2) 中性醋酸铅沉淀反应: 取色素稀释液 5ml, 逐滴加入饱和中性醋酸铅溶液, 产生蓝紫色沉淀, 并随饱和中性醋酸铅加入量的增多, 沉淀增多, 表明该色素成分中含酚基; (3)  $\text{FeCl}_3$  显色反应: 取色素稀释液 5ml, 加入 1%  $\text{FeCl}_3$ , 色素溶液振荡后变黄褐色, 是化合物中含酚羟基的特征反应。

很多花色苷的研究采用高效液相色谱法、薄层层析法、光谱分析法, 但近来 ESI/MS 被证明是更有力

的鉴定工作提供了相对更可靠的手段, 但仪器价格昂贵, 不能大范围推广应用, 所以一些经典的方法和手段(柱层析、薄层层析等)的作用依然很重要。

### 4 血橙中花色苷种类的研究

许多研究表明血橙花色苷中矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3(6"-丙二酰)-葡萄糖苷是主要成分<sup>[10-13]</sup><sup>[23]</sup>。Silke Hillebrand et al 采用 HPLC 分离制备, ESI/MS 和 NMR 进行结构分析, 还分离出了 6 种其它花色苷: 矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷, 飞燕草素-3-葡萄糖苷, 矢车菊素-3-槐糖苷, 飞燕草素-3(6"-丙二酰)葡萄糖苷, 甲基花青素-3(6"-丙二酰)葡萄糖苷, 矢车菊素-3-(6"-二乙二酰)葡萄糖苷<sup>[12]</sup>。Paola Dugo et al 首次检测出了另外两种花色苷矢车菊素-3-芸香苷、3'-甲花翠素-3(6"-丙二酰)葡萄糖苷。可以看出血橙花色苷中矢车菊素是主要的糖苷配基, 其次是飞燕草素, 甲基花青素, 3'-甲花翠素, 没有发现天竺葵色素, 锦葵色素糖苷配基。糖主要是葡萄糖, 其次还有鼠李糖、槐糖、芸香糖等<sup>[10]</sup>。

另外, 据报道 Florida 血橙中矢车菊素-3(6"-丙二酰)葡萄糖苷含量高达 44.8%, 其次是矢车菊素-3-葡萄糖苷(33.6%)。而 Italian 血橙主要是矢车菊素-3-葡萄糖苷, 及四种少量的酰化矢车菊衍生物, 之后在 Italian 血橙中又发现了一种主要的花色苷矢车菊素-3-鼠李糖苷, 但 Florida 血橙中并未发现<sup>[11]</sup>。

### 5 血橙中花色苷性质的研究

由于花色苷的高反应活性, 花色苷容易降解, 形成无色或褐色化合物。许多因素影响花色苷的稳定性, 包括温度、pH、氧、酶、辅色素、金属离子、抗坏血酸、二氧化硫、糖和它们的降解产物。在加热杀菌和贮藏过程中, 果汁极易失去鲜亮的红色, 发生褐变, 因此, 血橙一般不被果汁加工厂制成果汁商业出售。

Krifi et al. 研究血橙中花色苷降解发现其在 -18 °C 下能保存少许天, 在 4 °C、氮气下能保存 12 个月<sup>[24]</sup>。Aysegil Kyrca et al. 确定了在不同温度下贮藏和加热时, 血橙中花色苷降解的动力学参数<sup>[25]</sup>。Maccarone et al 研究了血橙中花色苷的稳定性, 发现微波杀菌、添加酒石酸或谷胱甘肽会改善其稳定性, 同时, 还发现花色苷同芸香苷和咖啡酸络合表现出很高的稳定性<sup>[26]</sup>。

针对于花色苷抗氧化特性, 大量的流行病学研究证明食物中的花色苷和植物多酚对人类许多疾病有预防和治疗作用。E Arena et al 采用 ABTS 法测定血橙总抗氧化(TAA)活性, 在加工过程中 TAA 会降低; 用 TEAC 法分析等价抗氧化能力, 即抗坏血酸, 羟基苯乙炔酸

和花色苷对TAA的贡献度,认为抗坏血酸是主要的因素,占70%,其次是羟基苯乙炔酸和花色苷<sup>[27]</sup>。在加热杀菌过程中,亚油酸酶促过氧化反应的抑制作用明显增强,但对OH·和DPPH·的清除能力会下降<sup>[28]</sup>。苏学素等也发现同未杀菌的血橙原汁比,杀菌汁TAA损失率为23%,超滤澄清汁仅为10%左右,这可能与VC和花色苷含量损失有关<sup>[29]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 徐娟,邓秀新.柑橘类果实汁胞的红色现象及其呈色色素[J].果树学报,2002,19(5):307-313.
- [2] 陈良珠.血橙在江南的适应性[J].浙江柑橘,1985,(3):27-29.
- [3] Mazza G, Miniati E. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains[M]. CRC Press, Boca Raton, 1993.
- [4] 王璋,等.食品化学[J].北京:中国轻工业出版社,2000.288-292.
- [5] Luigi Mondello, et al. Determination of anthocyanins in blood orange juices by HPLC analysis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000, 23: 191-195.
- [6] Di Giacomo A, et al. Il succo del le arance pigmentate italiane[J]. Essenze Deriv Agrum, 1989, 59: 273-289.
- [7] Rapi sarda P, et al. A simple and reliable method for determining anthocyanins in blood orange juices[J]. Agrochimica, 1994, 38: 157-164.
- [8] Tri fi rò, et al. Caratterizzazio ne del succo di arancia rossa refrigerato ottenuto non da concentrato[J]. Essenze Deriv Agrum, 1996, 66: 267-278.
- [9] Paolo Rapi sarda, Fabiana Fanel la, Emanuel e Maccarone. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 2249-2252.
- [10] Paola Dugo, et al. Characterization of the anthocyanin fraction of sicilian blood orange juice by micro-HPLC-ESI/MS[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 1173-1176.
- [11] Hyoun g S Lee. Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed budd blood orange (*Citrus sinensis*) [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 1243-1246.
- [12] Silke Hil lebrand, Michael Schwarz, Peter Winterhalter. Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins from blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) Juice[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 7331-7338.
- [13] Lee H S, et al. Chemical characterization by liquid chromatography of Moro Blood orange juices[J]. J Food Compos Anal, 1990, (3): 9-19.
- [14] Peter Bridle, Cristina García-Viguera. Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC[J]. Food Chemistry, 1997, 59(2): 299-304.
- [15] Bálint Berente, et al. Improvement of the HPLC analysis of anthocyanins in red wines by use of recently developed columns[J]. Fresenius J Anal Chem, 2001, 371: 68-72.
- [16] 王振宇,杨谦,等. CO<sub>2</sub>超临界—超声波联用技术萃取花色苷工艺[J].东北林业大学学报,2005,33(1):83-84.
- [17] 王振宇,杨谦,等.酶法制备花色苷的研究[J].中国甜菜糖业,2004,(4):26-30.
- [18] 孙中武.植物化学[M].东北林业大学出版社,2001.
- [19] Bate-Smith E C. Paper chromatography of anthocyanin and related substances in petal extracts[J]. Nature, 1948, 161: 535-538.
- [20] Partridge, et al. Filter-paper partition chromatography of sugar[J]. J Biochem, 1948, (42): 238-240.
- [21] Harborne J B. Spectral methods of characterizing anthocyanins[J]. Biochem J, 1958, 70: 22.
- [22] Zapsalis C, Francis F. Cranberry anthocyanins[J]. J Food Sci, 1965, 30: 396-399.
- [23] Maccarone E, et al. Cyandi n-3-(6"-malonyl)-glucoside. An important anthocyanin of blood orange juice[J]. Ital J Food Sci, 1998, 10: 367-372.
- [24] Kri fi B, et al. Degradation of anthocyanins from blood orange juices[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2000, 35: 275-283.
- [25] Ayşeg il K ырca, Bekir Cemer ođ lu. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate[J]. Food Chemistry, 2003, 81: 583-587.
- [26] Maccarone E, Maccarone A, Rapi sarda P. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice[J]. J Food Sci, 1985, 50(4): 901-904.
- [27] E. Arena B Fallico, E Maccarone. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage[J]. Food Chemistry, 2001, 74: 423-427.
- [28] R Lo Scalzo, et al. Effect of thermal on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice[J]. Food Chemistry, 2004, 85: 41-47.
- [29] 苏学素,等.超滤对血橙果汁中抗氧化成分及总抗氧化能力的影响[J].农业工程学报,2004,20(2):185-188.



#### 信息

## 我国研制成功“有机磷农药降解酶制剂”

中国农业科学院宣布,一项新技术成果“有机磷农药降解酶制剂”,近日在我国研制成功。这种新型的、具有完全自主知识产权的科研创新成果,能够有效降解有机磷农药、彻底除去农产品的农药残留。据介绍,该成果已在中试水平上(3吨发酵罐)确立了利用基因工程酵母菌生产有机磷降解酶的稳定的发酵工艺,其发酵方法简单易行,发酵原料易得,技术指标优越,为有机磷降解酶的产业化奠定了基础。据悉,该制剂有望在2006年投入生产,到2007年底,预计可生产1404吨“比亚”降解酶,可以解决125万吨蔬菜水果的残留农药降解问题。