

文章编号: 1001-411X(2002)01-0016-04

荔枝果皮褐变过程中花色素苷含量的变化及测定

张昭其¹, 庞学群², 段学武¹, 季作梁¹

(1 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 对荔枝果皮花色素苷含量与果皮褐变的关系进行了研究, 详细比较了荔枝上两种花色素苷的测定方法, 结果表明: 随着采后荔枝果皮褐变指数的升高, 果皮花色素苷含量显著下降, 两者呈现很好的负相关。盐酸甲醇法测定褐变荔枝果皮的花色素苷含量时存在较大的干扰, 主要原因是盐酸甲醇将不溶于水的褐色物质也提取了出来, 褐色物质的盐酸甲醇溶液在 530 nm 处有较强烈的光吸收, 干扰了花色素苷的测定结果。

关键词: 荔枝; 花色素苷; 果皮褐变; 花色素苷含量测定

中图分类号: S667.3

文献标识码: A

荔枝果皮鲜红, 果肉晶莹剔透, 风味独特, 在国内及国际市场上极具竞争力。但荔枝采后果皮极易褪色与褐变, 这是限制荔枝长期贮运、导致荔枝货架寿命短和降低荔枝商品价值的主要因素。荔枝果皮的红色色素为花色素苷^[1]。李棠察等^[2]推测荔枝果皮褐变的主要原因可能在于花色素苷的褪色或变色, 林植芳等^[3]采用盐酸甲醇法测定了荔枝褐变前后花色素苷含量的变化, 发现花色素苷含量在果皮完全褐变后仅下降了 10%, 从而认为荔枝果皮褐变与花色素苷含量变化无关。Underhill 等^[4]发现荔枝采后果皮 pH 值逐渐升高, 而花色素苷的颜色变化依赖于介质 pH 值高低, 因此认为荔枝果皮褐变与其 pH 值的升高密切相关, 而与其含量变化无关。张昭其等^[5]发现浸酸能恢复轻度褐变的荔枝果实的红色, 但不能恢复严重褐变的荔枝果实的红色, 因此推测前期的可逆褐变与花色素苷褪色或变色有关, 后期严重不可逆褐变仍然存在花色素苷的降解。目前荔枝果皮花色素苷的测定方法主要是盐酸甲醇法, 蒋跃明推测荔枝果皮产生的褐色物质可能对花色素苷的测定结果有干扰(私人通讯)。pH 差示法是植物化学研究中经常采用的测定植物组织花色素苷含量的方法, 本文用该方法测定了荔枝果皮褐变过程中花色素苷含量的变化, 并与盐酸甲醇法作了比较, 以进一步确定花色素苷含量与果皮褐变的关系, 为深入研究荔枝果皮褐变机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

荔枝品种淮枝(*Litchi chinensis* Soon. cv. Huaizhi),

采自广州市从化, 红熟后采收并立即运回实验室, 用 0.5 g/L 施保功(德国艾格福公司生产, 咪唑类杀菌剂)浸泡 2 min, 置于室温无包装条件下放置(用于观察褐变程度和测定果皮花色素苷含量)。

1.2 方法

(1) 果皮褐变程度评价: 参照 Scott 等^[6]的方法确定荔枝果皮褐变级数, 以不少于 30 个的荔枝果实计算褐变指数。褐变指数 = $\sum(\text{褐变级数} \times \text{果数}) / \text{总果数}$, 其中, 1 级果为全红, 5 级果为全褐。

(2) pH 差示法测定花色素苷含量: 参照 Wrolstad 等^[7]的方法。取 5 g 果皮切碎, 用 $\varphi=1\%$ HCl 多次浸提, 直至果皮褪至无红色, 过滤, 并定容至 100 mL, 取 1 mL 浸提液, 分别用 0.4 mol/L pH1.0 KCl-HCl 的缓冲液和 0.4 mol/L pH5.0 柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液稀释至 5 mL, 混匀后, 用蒸馏水作对照, 在 510 nm 下测定光密度值(D)。

每克鲜质量果皮花色素苷含量(mg/g) = $\Delta D \times 5 \times 0.1 \times 1\,000 \times 445.2 / (29\,600 \times 5)$, 其中, $\Delta D = D(\text{pH}1.0) - D(\text{pH}5.0)$; 5 为稀释倍数; 0.1 为浸提液体积(L); 445.2 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子质量; 29 600 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔比吸收系数($\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); 5 为果皮鲜质量。另外, 为了与盐酸甲醇法进行比较, 以 $\Delta D \times 5$ 表示花色素苷的相对含量。

(3) 盐酸甲醇法测定果皮花色素苷的相对含量: 取 5 g 果皮, 切碎, 用 $\varphi=1\%$ 的盐酸甲醇多次浸提, 直至果皮无红色, 过滤, 并定容至 100 mL, 分别测定提取液在 530 和 600 nm 下的光密度值 D 。参照林植芳等^[3]的方法, 以 $D_{530\text{ nm}} - D_{600\text{ nm}}$ 表示花色素苷的相

收稿日期: 2001-08-22

作者简介: 张昭其(1965-), 男, 副研究员, 硕士。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39900102); 广东省自然科学基金资助项目(980165)

1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

对含量; 参照 Underhill 等^[4]的方法, 以 $D_{530\text{ nm}}$ 高低表示花色素苷的相对含量。

(4)测定褐色物质对盐酸甲醇法测定花色素苷含量的干扰: 选取全红果、半红果、全褐果, 按(3)法用盐酸甲醇提取果皮花色素苷, 将提取液在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用减压旋转蒸发仪将甲醇除去, 过滤并用 $\varphi=1\%$ 的盐酸冲洗, 将滤液定容至原体积; 另用 $\varphi=1\%$ 的盐酸甲醇溶解褐色沉淀, 并定容至原体积。测定上述两种溶液的 D_{530} 。

(5)波长扫描: 用岛津 UV-240IPC 紫外可见分光光度计分别对(4)中全红果的花色素苷的盐酸提取液和全褐果的褐色沉淀的盐酸甲醇溶液进行 $400\sim600\text{ nm}$ 波长扫描, 测定它们的可见光谱曲线。

2 结果与分析

2.1 荔枝采后褐变过程中果皮花色素苷含量的变化
如图 1 所示, 采后准枝果实在常温和无包装条件下, 其褐变指数迅速增加, 即 1 d 后开始褐变, 4 d 后已完全褐变, 用 pH 差示法测得的果皮花色素苷含量迅速下降, 从起始的 $(0.169\pm0.020)\text{ mg/g}$ 降至 $(0.057\pm0.024)\text{ mg/g}$ ($P<0.05$), 褐变指数与花色素含量呈显著的负相关($r^2=0.0976$, 如图 2), 可见荔枝果皮褐变与花色素苷含量的关系非常密切。

2.2 盐酸甲醇法与 pH 差示法测定荔枝果皮花色素苷含量的比较
用盐酸甲醇法测定荔枝果皮花色素苷含量, 无论是参照 Underhill 等的方法测定 $D_{530\text{ nm}}$, 还是参照林植芳等的方法测定 $D_{530\text{ nm}}-D_{600\text{ nm}}$, 都只能用吸光度

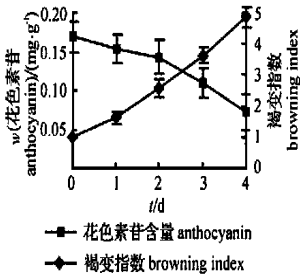


图 1 荔枝褐变过程中果皮花色素苷含量、褐变指数的变化
Fig. 1 The change of anthocyanin content and browning index during lychee pericarp browning

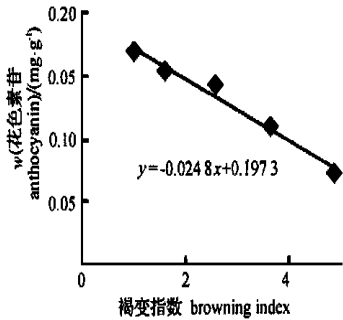


图 2 荔枝褐变过程中花色素苷含量与褐变指数的相关性
Fig. 2 Relationship between browning index and anthocyanin degradation

的改变代表花色素苷的相对含量。从表 1 可看出, 对于不同褐变程度的荔枝果皮, 用盐酸甲醇法测得其花色素苷含量均无显著下降, 与 Underhill 等^[4]和林植芳等^[3]报道的结果一致; 而用 pH 差示法测得的花色素苷含量则与果皮褐变程度呈现很好的相关性。

表 1 盐酸甲醇法与 pH 差示法测定荔枝果皮花色素苷含量的比较
Tab. 1 Comparison of the determination of lychee pericarp anthocyanin content measured by pH-differential method and HCl-methanol method respectively

不同褐变程度的果实 fruit with different browning degree	pH 差示法 pH-differential method $\Delta D\times 5$	盐酸甲醇法 HCl-methanol method	
		$D_{530\text{ nm}}$	$D_{530\text{ nm}}-D_{600\text{ nm}}$
鲜红果 red fruit	$1.106\pm0.103\text{a}$	$1.292\pm0.125\text{a}$	$1.119\pm0.120\text{a}$
半褐果 half-red fruit	$0.417\pm0.114\text{b}$	$1.262\pm0.143\text{a}$	$1.084\pm0.150\text{a}$
全褐果 browning fruit	$0.289\pm0.093\text{c}$	$1.256\pm0.103\text{a}$	$1.056\pm0.112\text{a}$

1) 表中同列不同字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著 ($n=3$)

2.3 褐色物质对盐酸甲醇法测定花色素苷含量的干扰
用旋转蒸馏仪去除花色素苷提取液中的甲醇, 发现有褐色沉淀析出, 过滤并用 $\varphi=1\%$ HCl 冲洗沉淀, 其滤液为红色, 鲜红果的滤液红色较深, 而全褐果的滤液红色较浅。收集这些褐色沉淀物质, 溶于 $\varphi=1\%$ 盐酸甲醇, 溶液为棕褐色, 全褐果的溶液棕褐

色较深, 而鲜红果的溶液棕褐色较浅。将上述溶液定容至原体积, 测定其 530 nm 的光密度值 D 。结果发现, 鲜红果滤液的 $D_{530\text{ nm}}$ 远比全褐果的高, 与表 1 中用 pH 差示法测得 $D(\text{pH}1.0)-D(\text{pH}5.0)$ 的趋势一致; 褐色物质溶于 $\varphi=1\%$ 盐酸甲醇后的 $D_{530\text{ nm}}$, 全褐果的远比鲜红果的高, 趋势与 pH 差示法的相反, 而盐酸甲醇提取液的 $D_{530\text{ nm}}$, 3 种荔枝果皮之间无显著

差异.

另外, 滤液的 $D_{530\text{ nm}}$ 与褐色物质的盐酸甲醇溶液的 $D_{530\text{ nm}}$ 之和与果皮盐酸甲醇提取液的 $D_{530\text{ nm}}$ 有一定的数量关系. 可溶于 $\varphi=1\%$ HCl 的滤液部分的 $D_{530\text{ nm}}$ 与可溶于 $\varphi=1\%$ 盐酸甲醇的褐色物质的 $D_{530\text{ nm}}$ 之和约等于盐酸甲醇果皮提取液 $D_{530\text{ nm}}$. 根据花色素苷水溶性的特征, 可以推测, 溶于 $\varphi=1\%$

HCl 的红色部分(滤液)是花色素苷, 在褐变后含量显著下降; 而不溶于 $\varphi=1\%$ HCl 但可溶于 $\varphi=1\%$ 盐酸甲醇的褐色物质不可能是花色素苷, 在褐变后显著上升. 因此, 用盐酸甲醇法测定褐变前后荔枝果皮花色素苷的含量无显著下降的原因, 是 $\varphi=1\%$ 盐酸甲醇在提取花色素苷的同时也将不溶于水、但溶于甲醇的褐变产物提取了出来.

表 2 褐色物质对盐酸甲醇法测定花色素苷含量的干扰
Tab. 2 Interfering of brown compounds with the determination of lychee pericarp anthocyanin

不同褐变程度的果实 fruit with different browning degree	果皮盐酸甲醇提取液 HCl-methanol extract of lychee pericarp ($D_{530\text{ nm}}$)	去甲醇后的红色滤液 red filtrate after removal of methanol ($D_{530\text{ nm}}$)	褐色沉淀的盐酸甲醇溶液 solution of browning precipitate in HCl-methanol ($D_{530\text{ nm}}$)
鲜红果 red fruit	1.292±0.125a	0.932±0.157a	0.189±0.049a
半褐果 half-red fruit	1.262±0.143a	0.405±0.097b	0.637±0.106b
全褐果 browning fruit	1.256±0.103a	0.099±0.056c	1.043±0.127c

1) 表中同列不同字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著 ($n=3$)

2.4 褐色物质的盐酸甲醇溶液的波长扫描

从图 4 可知, 花色素苷的盐酸甲醇溶液的吸收峰在 530 nm 处, 因此, 常用 $D_{530\text{ nm}}$ 代表花色素苷含量, 而褐色物质的盐酸甲醇溶液在 450~550 nm 范围有较强烈的吸收, 从而干扰了花色素苷含量的测定结果. 这就解释了采用盐酸甲醇法测定褐变前后荔枝果皮的花色素苷含量时, 花色素苷含量无显著降低的原因, 也说明, 在含褐色干扰物质时, 花色素苷含量测定不宜采用盐酸甲醇提取测定法.

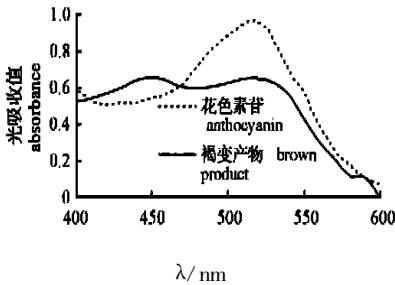


图 3 荔枝花色素苷的盐酸提取液和褐变产物的盐酸甲醇提取液的可见光谱

Fig. 3 The visible spectra of lychee anthocyanin in $\varphi=1\%$ HCl and browning product in $\varphi=1\%$ HCl methanol

3 讨论

荔枝果皮大量存在的红色色素是花色素苷, 主要有矢车菊素-3-芸香二糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷和锦葵素-3-葡萄糖苷^[1]. 早在 1960 年, Akamine 就推测荔枝果皮褐变主要是由于 PPO 催化氧化花色素苷形成了一种称作“类黑精”(Melenin)的物质. 但林植芳等^[3]测定了采后荔枝果皮的几种色素变化, 发现荔枝果皮褐变后花色素苷含量仅下降 10%, 从而认为荔枝果皮褐变与花色素苷的含量变

化无关. Underhill 等^[4]对荔枝果皮褐变、果皮 pH 值与果皮颜色的关系进行了进一步的研究, 发现荔枝果皮的颜色与花色素苷含量的相关性较差, 但与果皮 pH 值高度相关; 发现果实浸碱后果皮变褐, 浸酸后又恢复红色, 颜色变化过程中花色素苷含量几乎无变化, 从而认为荔枝果皮颜色变化主要依赖于 pH 值, 而与含量无关. 张昭其等^[5]却发现, 虽然浸酸处理可恢复轻度褐变的荔枝果皮的红色, 但不能恢复严重褐变荔枝果皮的红色, 暗示花色素苷的降解参与了果皮褐变.

花色素苷(Anthocyanin)是一类水溶性黄烷类植物色素, 在低 pH 值下比较稳定, 呈红色, 随着 pH 值的升高逐渐褪色直至紫黑色. 本文采用植物化学中经典的 pH 差示法^[7]测定花色素苷含量, 即根据花色素苷在 pH1.0 时呈红色, 在 pH5.0 褪色的这一特性, 测定 $\Delta D=D(\text{pH}1.0)-D(\text{pH}5.0)$, 从而消除了一些在 pH5.0 下不褪色、非花色素苷类的物质对测定结果的干扰. 结果表明在荔枝果皮褐变过程中, 花色素苷含量明显下降, 与果皮褐变指数呈显著的负相关. 可见, 荔枝果皮褐变过程涉及到花色素苷的降解, 即花色素苷的降解参与了荔枝果皮的褐变.

为了进一步比较盐酸甲醇法与 pH 值差示法在测定荔枝果皮花色素苷含量上的区别, 本文也参照林植芳等^[3]、Underhill 等^[4]的方法, 测定了全红果、半红果和全褐果果皮的花色素苷含量, 结果发现三者花色素苷含量无显著变化, 而用 pH 差示法测定的, 却有显著差异. 产生不同结果的主要原因在于花色素苷的提取方法不一样. 本文的结果表明, 盐酸甲醇在提取花色素苷的同时, 也将不溶于水、但溶于甲醇的褐色产物提取出来, 褐变产物在 530 nm 处亦有较

强烈的吸收,从而干扰了花色素苷含量的测定.虽然荔枝在褐变过程中花色素苷含量逐渐下降,但由于褐变物质逐渐增加,因此,反映在测定结果上则是荔枝果皮褐变前后花色素苷含量无显著差异.从扫描曲线中也可看出,非水溶性的褐色物质的盐酸甲醇溶液,在 450~550 nm 范围都有较强烈的光吸收,严重干扰了花色素苷的测定结果.而 pH 差示法在不提取非水溶性的褐色物质的前提下,还排除了一些水溶性非花色素苷类的物质对测定结果的干扰,测定结果更可靠,笔者认为,在含褐色干扰物质时,花色素苷含量的测定不宜采用盐酸甲醇法,而应采用 pH 差示法.在 pH 差示法中,荔枝花色素苷在 pH1.0 下为红色,且较稳定,从另一个侧面说明浸酸处理是保持荔枝采后果皮红色、防止褐变的一种有效的方法.

参考文献:

[1] LEE H S, WICKER L. Anthocyanin pigments in the skin of

lychee fruit[J]. J Food Sci, 1991, 56 (2): 466—483.
[2] 李棠察, 蔡书芬, 俞永标. 温度和数种不同处理对荔枝贮藏寿命的影响[J]. 中国园艺, 1983, 29(3): 46—52.
[3] 林植芳, 李双顺, 张东林, 等. 采后荔枝果皮色素、总酚及有关酶活性的变化[J]. 植物学报, 1988, 30(1): 40—45.
[4] UNDERHILL S J R, CRITCHLEY C. Anthocyanin decolourisation and its role in lychee pericarp browning[J]. Aus J Exp Agric, 1994, 34: 115—122.
[5] 张昭其, 庞学群, 季作梁, 等. 采后荔枝果皮褐变的研究[J]. 热带作物学报, 1997, 18(2): 123—126.
[6] SCOTT K J, BROWN B I, CHAPLIN G R, et al. The control of rotting and browning of litchi fruit by hot benomyl and plastic film[J]. Scientia Horticulturae, 1982, 16 (3): 253—262.
[7] WROLSTAD R E, CULBERTSON J D, CORNWELL C, et al. Detection of adulteration blackberry juice concentrates and wines[J]. Journal Association of Official Analytical Chemists, 1982, 65: 1417—1423.

Change of Anthocyanin Content and It's Determination During Lychee Pericarp Browning

ZHANG Zhao-qi¹, PANG Xue-qun², DUAN Xue-wu¹, JI Zuo-liang¹

(1 College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
2 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Lychee pericarp browning index increased while the content of anthocyanins decreased with storage time, and there was a good correlation between pericarp anthocyanin content and browning index when the pH—differential method was used as the analytic method. However, there was no obvious change in the content of anthocyanins while the fruit browned when the acidific methanol method was used. To confirm the correlationship between pericarp browning and anthocyanins content, these two methods was compared. Besides anthocyanins, acid methanol also extracted the brown compounds, which were insoluble in water and interfered with the detemination. According to the solubility of anthocyanins in water, $\varphi=1\%$ HCl was used as the extract solution in the pH—differential method, which would not extract the brown compounds. Additionally pH differential method could eliminate the interference of other compounds with the de-termination.

Key words: lychee; anthocyanins content; pericarp brwoning; detemination of anthocyanin content

【责任编辑 柴 焰】