

红龙草色素的提取工艺优化及其稳定性研究

杨佩斯, 董乐*, 叶宇海 (泉州师范学院海洋与食品学院, 福建泉州 362000)

摘要 [目的]优化红龙草色素提取工艺,并研究其稳定性。[方法]以红龙草全草为材料,通过单因素试验和正交试验优化红龙草色素提取工艺,并对提取的红龙草色素稳定性进行研究。[结果]红龙草色素的最佳提取条件:超声时间 30 min,料液比 1:55(g:mL), α -淀粉酶:纤维素酶为 3:1,即在溶液中按比例加入 0.2% 纤维素酶和 0.6% α -淀粉酶。光照、pH、过氧化氢、亚硫酸钠、苯甲酸、山梨酸、金属离子 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 对色素稳定性具有一定的影响。[结论]该研究可为红龙草色素的开发利用提供参考。

关键词 红龙草;色素;正交试验;稳定性

中图分类号 TS202.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)10-0097-04

Study on the Extraction Process Optimization and Stability of Pigment from *Altemanthera Ficoidea* cv. *Ruliginosa*

YANG Pei-si, DONG Le*, YE Zi-hai (College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian 362000)

Abstract [Objective] To optimize the extraction process of *Altemanthera Ficoidea* cv. *Ruliginosa* pigment and study its stability. [Method] By single-factor and $L_9(3^4)$ orthogonal experiment, extraction conditions of pigment from *Altemanthera Ficoidea* cv. *Ruliginosa* were optimized, and the effects on the stability of pigment were investigated. [Result] The results showed that the optimum technological conditions of the extraction of pigment from *Altemanthera Ficoidea* cv. *Ruliginosa* were distilled water for extraction agents, 30 min for extraction time, 1:55 (g:mL) for the ratio of the solid and liquid, 1:3 for the ratio of cellulose to alpha amylase, namely adding 0.2% cellulose and 0.6% alpha amylase into solution. Light, pH, H_2O_2 , sulfurous acid, benzoic acid, sorbic acid, metal ions including Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} and Fe^{3+} had effects on the stability of pigment. [Conclusion] The study can provide reference for development and utilization of *Altemanthera Ficoidea* cv. *Ruliginosa* pigment.

Key words *Altemanthera Ficoidea* cv. *Ruliginosa*; Pigment; Orthogonal experiment; Stability

食用色素是指能使食品着色的添加剂,按来源分为合成色素和天然色素 2 类^[1]。研究表明,大部分合成色素对人体有不同程度的伤害,而天然色素具有较高的安全性,有的天然色素还具有一定的营养和药理保健作用^[2]。因此,在消费者日益追求食品安全性的大环境下,食用天然色素正逐步占据食用色素的主体地位。

红龙草(*Altemanthera Ficoidea* cv. *Ruliginosa*)属苋科,叶色紫红至紫黑色,头状花序密聚成粉色小球,无花瓣。茎为假二歧分枝,中部具有髓,茎秆汁液为紫红色。原种产南美,在世界上热带、亚热带各地多有栽培。红龙草叶色鲜艳,具有提取天然色素的基础。笔者以红龙草全草为材料,优化其色素的提取工艺,并分析色素的稳定性影响因素,为红龙草色素的开发利用提供参考。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 原料。红龙草,采自福建省泉州师范学院理工楼前花圃。

1.1.2 主要仪器。HH-4 型恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;KQ-600 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;GZX-9240MBE 型数显鼓风干燥箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;UVmini-1240 型紫外可见分光光度计,日本岛津;TDL-500B 型低速大容量离心机,上海安亭科学仪器有限公司;FA2104N 型电子分析天平,上海菁海仪器有限公司;

PHSJ-4A 型实验室 pH 计,上海精密科学仪器有限公司。

1.1.3 主要试剂。纤维素酶、 α -淀粉酶等购于厦门泰京生物科技有限公司;亚硫酸钠、过氧化氢、氯化钠、氯化钾、硫酸镁、氯化锌、硫酸铜、氯化铁、氯化钙、苯甲酸、山梨酸等试剂,均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 红龙草原料处理。将新鲜采摘的红龙草清洗干净放入烘箱内,60℃ 干燥 12 h 至恒重,将干燥好的红龙草粉碎后过 40 目筛,放入袋中,于冰箱中低温存放备用。

1.2.2 红龙草色素提取的工艺流程。粉碎的红龙草 1.000 g → 加水到一定料液比 → 按一定百分比加入纤维素酶和 α -淀粉酶 → 混匀 → 45℃ 条件下超声波提取 30 min → 离心 → 取色素上清液 → 定容 → 稀释 → 测定吸光度值。

1.2.3 最大吸收波长的选择。准确称量 1.000 g 红龙草粉末于锥形瓶中,按一定的料液比加蒸馏水,分别加入终浓度为 0.2% 的纤维素酶和 0.3% α -淀粉酶,在 45℃ 条件下超声辅助提取 30 min,室温下再提取 2 h。离心后取上清液,在 400~600 nm 波段内扫描,测定其吸收光谱,选择可见光区最大吸光峰所对应的波长作为试验中红龙草色素提取液的测定用波长^[3]。

1.2.4 红龙草色素提取的单因素试验。

1.2.4.1 超声时间的选择。准确称量 5 份 1.000 g 的红龙草粉末于锥形瓶中,按一定的料液比加蒸馏水,分别加入终浓度为 0.2% 的纤维素酶和 0.3% 的 α -淀粉酶,置于 45℃ 条件下分别超声辅助提取 5、10、20、30、40 min,在 4000 r/min 条件下离心后取上清液,用容量瓶定容至 100 mL。以蒸馏水为参比,在测定波长处测定色素溶液的吸光度值^[4-5]。

1.2.4.2 料液比的选择。准确称量 5 份 1.000 g 的红龙草

基金项目 福建省科技厅农业引导性项目(2015N0014);福建省生物学省级重点学科建设项目。

作者简介 杨佩斯(1993—),男,贵州黔西人,本科生,专业:生物技术。
* 通讯作者,教授,硕士,从事食品加工与安全研究。

收稿日期 2017-01-20

粉末于锥形瓶中,加入蒸馏水,使其料液比分别为 1:30、1:40、1:50、1:60、1:70(g:mL),分别加入终浓度为 0.2% 的纤维素酶和 0.3% α -淀粉酶,置于 45 °C 条件下超声辅助提取 30 min,在 4 000 r/min 条件下离心后取上清液,用容量瓶定容至 100 mL。以蒸馏水为参比,在测定波长处测定色素溶液的吸光度值^[6]。

1.2.4.3 酶比例的选择。准确称量 5 份 1.000 g 的红龙草粉末于锥形瓶中,按一定的料液比加蒸馏水,加入终浓度为 0.2% 的纤维素酶。以纤维素酶为标准,使溶液中 α -淀粉酶与纤维素酶的比例分别为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1。置于 45 °C 条件下超声辅助提取 30 min,在 4 000 r/min 条件下离心后取上清液,用容量瓶定容至 100 mL。以蒸馏水为参比,在测定波长处测定色素溶液的吸光度值^[7]。

1.2.5 $L_9(3^4)$ 正交试验。根据超声时间、料液比和复合酶比例的单因素试验,以蒸馏水为提取溶剂,设计 4 因素 3 水平正交试验,并将因素 D 空项作为方差分析的误差处理的一部分,对试验结果进行直观分析和方差分析,确定红龙草色素的最佳提取工艺^[5,8],正交试验因素水平设计见表 1。

表 1 红龙草色素提取正交试验因素水平

Table 1 Factor and level of orthogonal test for pigment extraction from *Altemanthera Ficoidea* cv. *Ruliginosa*

水平 Level	因素 Factor			
	超声时间(A) Ultrasonic time//min	料液比(B) Solid-liquid ratio	酶比例(α -淀粉 酶:纤维素酶)(C) Enzyme ratio	空列(D) Blank column
1	25	1:45	2.5:1	
2	30	1:50	3.0:1	
3	35	1:55	3.5:1	

1.2.6 验证试验。在正交试验确定的最佳条件下进行红龙草色素的提取,3 次重复,结果取平均值。

1.2.7 红龙草色素稳定性的研究。

1.2.7.1 光照对色素稳定性的影响^[9-10]。分别取 3 份 20 mL 同浓度的红龙草色素溶液于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至 100 mL,分别置于避光、太阳光、紫外光条件下密封静置 2 h 后,测定最大吸收波长处的吸光度值,分析光照对红龙草色素稳定性的影响。

1.2.7.2 pH 对色素稳定性的影响^[11]。准确称量 10 份 10 mL 同浓度的红龙草色素溶液于锥形瓶中,稀释。用 pH 计调节色素溶液的 pH,使色素溶液的 pH 分别为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11,置于室温条件下密封静置 2 h。观察、记录不同 pH 条件下的红龙草色素溶液颜色变化。

1.2.7.3 氧化剂、还原剂对色素稳定性的影响^[12]。准确称量 10 份 10 mL 同浓度的红龙草色素溶液于锥形瓶中,稀释。分别按一定的比例加入氧化剂和还原剂溶液,置于室温条件下密封静置 2h。观察并记录色素溶液在不同浓度氧化剂和还原剂中颜色的变化,并测定吸光度值。

1.2.7.4 食品添加剂对色素稳定性的影响^[13]。分别配制含有一定浓度梯度的苯甲酸、山梨酸的色素浸提液,密封后置于室温条件下静置 2 h。观察、记录添加不同浓度食品添加

剂的色素溶液的颜色变化,并测定吸光度值。

1.2.7.5 金属离子对色素稳定性的影响^[14]。精密量取 10 份 10 mL 同浓度的红龙草色素溶液于锥形瓶中,稀释。分别加入浓度为 0.02 mol/L 的 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^+ 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 金属离子,在避光条件下静置提取 2 h,与原溶液相比较,观察并记录色素溶液颜色的变化。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的选择 由图 1 可知,红龙草色素水溶液在波长 550 nm 处有特征吸收峰,因此确定红龙草色素的测定波长为 550 nm。

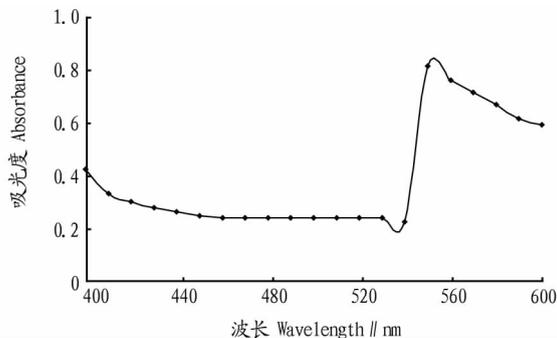


图 1 红龙草色素的紫外可见光谱

Fig. 1 UV Vis Spectrum of pigment from *Altemanthera Ficoidea* cv. *Ruliginosa*

2.2 单因素试验结果

2.2.1 超声时间对色素提取效果的影响。由图 2 可知,在一定范围内,随着超声时间的增加,色素提取液的吸光度增大。当超声时间在 10~20 min 和 30~40 min 时,色素提取液的吸光度相对稳定,但在 30~40 min 时色素的吸光度较大,同时考虑酶作用时所需条件,因此,确定红龙草色素提取的超声时间为 30 min。

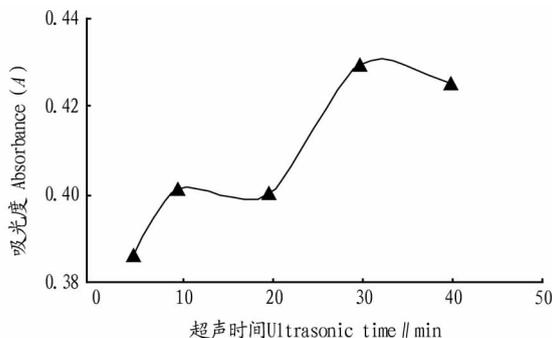


图 2 超声时间对色素提取效果的影响

Fig. 2 Effects of ultrasonic time on pigment extraction

2.2.2 料液比对色素提取效果的影响。由图 3 可知,在一定范围内,随着料液比中溶剂用量的增加,色素溶液吸光度越高,当料液比为 1:50(g:mL)时,吸光度达到最大值。此后当料液比中溶剂用量继续增加时,吸光度则随着降低,色素的提取率逐渐降低。因此,确定红龙草色素提取的料液比为 1:50(g:mL)。

2.2.3 复合酶比例对色素提取效果的影响。由图 4 可知,在一定范围内,随着 α -淀粉酶与纤维素酶比例的增大,吸

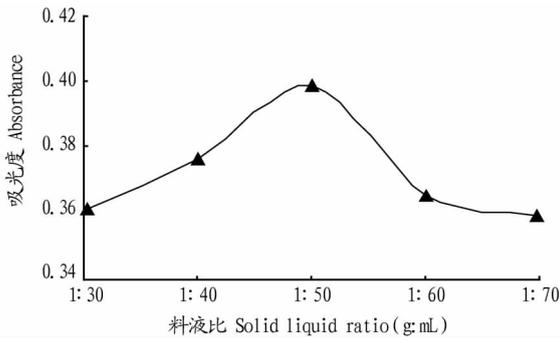


图3 料液比对色素提取效果的影响

Fig. 3 Effects of solid-liquid ratio on pigment extraction

光度越高,当 α -淀粉酶与纤维素酶比例为3:1时,吸光度达到0.579。此后当 α -淀粉酶与纤维素酶比例继续增大时,吸光度则没有明显变化,色素的吸光度趋于稳定。因此,确定红龙草色素提取的 α -淀粉酶与纤维素酶比例为3:1。

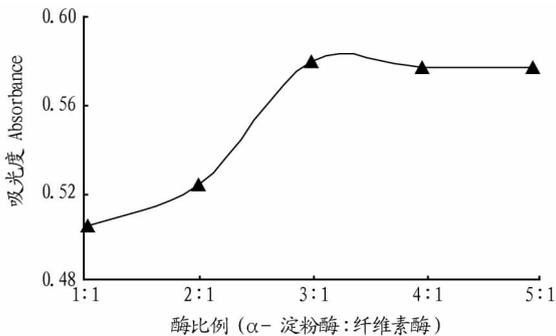


图4 复合酶比例对色素提取效果的影响

Fig. 4 Effects of complex enzyme ratio on pigment extraction

2.3 正交试验结果分析 根据单因素试验的结果,以超声时间、料液比、酶比例为3个因素进行红龙草色素提取的正交试验,结果见表2。

表2 红龙草色素提取 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 2 The results of $L_9(3^4)$ orthogonal test for pigment extraction from *Altemanthera ficoidea* cv. *Ruliginosa*

试验号 Test No.	因素 Factor				吸光度 Absorbance
	A	B	C	空列 Blank column	
1	1	1	1	1	0.509
2	1	2	2	2	0.583
3	1	3	3	3	0.581
4	2	1	2	3	0.580
5	2	2	3	1	0.531
6	2	3	1	2	0.628
7	3	1	3	2	0.556
8	3	2	1	3	0.549
9	3	3	2	1	0.562
\bar{K}_1	0.558	0.547	0.532	0.539	
\bar{K}_2	0.578	0.556	0.576	0.591	
\bar{K}_3	0.560	0.594	0.554	0.567	
R	0.021	0.042	0.019	0.055	

由表2可知,料液比对红龙草色素提取影响最大,其次是超声时间,酶比例影响最小。方差分析显示,料液比、超声时间、酶比例对色素提取率的影响具显著性($F_A = 17.854, F_B$

$= 54.07, F_C = 9.98$)。红龙草色素提取的最佳条件是 $A_2B_3C_2$,即在提取时超声时间为30 min,料液比为1:55 (g:mL), α -淀粉酶与纤维素酶比例为3:1。

2.4 正交试验结果的验证试验 验证试验表明,采用优化的工艺条件提取时,色素提取溶液的吸光度值为0.635,大于所有正交试验中所得结果,表明采用此工艺条件提取红龙草色素是可行的。

2.5 红龙草色素的稳定性

2.5.1 光照对色素稳定性的影响。 试验得出,在自然光、紫外光、避光条件下,红龙草色素的吸光度值分别为0.496、0.617、0.619。因此可知,在光照条件下,红龙草色素的吸光度值相对于避光条件下有较大幅度的降低,表明红龙草色素在光照条件下的稳定性较差,而紫外光的照射对色素的稳定性影响不大。

2.5.2 pH对色素稳定性的影响。 从表3和图5可知,色素在pH 5~8时稳定,pH在2~4时,色素颜色由橘黄色变为殷红色,pH在9~11时,色素颜色由殷红色变为棕褐色。因此,色素在弱酸或弱碱条件下比较稳定,而在强酸强碱性条件下色素的稳定性降低。因此,红龙草色素适合在弱酸或弱碱条件下使用,应避免在强酸强碱性条件下保存、使用。

表3 pH对色素稳定性的影响

Table 3 Effects of pH on pigment stability

pH	色素颜色 Pigment color	pH	色素颜色 Pigment color
2	橘红色	7	枣红色
3	橘黄色	8	枣红色
4	殷红色	9	殷红色
5	枣红色	10	红褐色
6	枣红色	11	棕褐色

2.5.3 氧化剂、还原剂对色素稳定性的影响。 由于氧化剂、还原剂对色素的颜色影响不大,因此用测定溶液的吸光度值来反映其对色素溶液的影响。从图6~7可知,随着氧化剂浓度的增加,溶液中色素比较稳定,吸光度值略有下降但变化不大。随着还原剂浓度的增加,色素溶液的吸光度值在一定范围内波动,没有明显的变化。由此可见,在低浓度的还原剂和氧化剂中,红龙草色素相对比较稳定。

2.5.4 金属离子对色素稳定性的影响。 由图8可知,添加 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 时,溶液颜色与最大吸收峰没有变化, Zn^{2+} 时颜色变浅,但影响不明显,说明 Zn^{2+} 对色素有减色作用; Cu^{2+} 使色素浸提液出现棕绿色浑浊; Ca^{2+} 使色素浸提液的颜色变深,说明 Ca^{2+} 对色素有增色作用。 Fe^{3+} 使色素溶液颜色变为褐色浑浊。因此在红龙草色素加工、保存、使用及运输过程中应避免与 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 接触。

2.5.5 常用食品添加剂对色素稳定性的影响。 由图9可知,色素的色泽受低浓度的苯甲酸溶液影响较大,呈橙色,色素较稳定。

由图10可知,不同浓度的山梨酸对红龙草色素的影响不明显。这与詹福建等^[15]的研究结果一致。

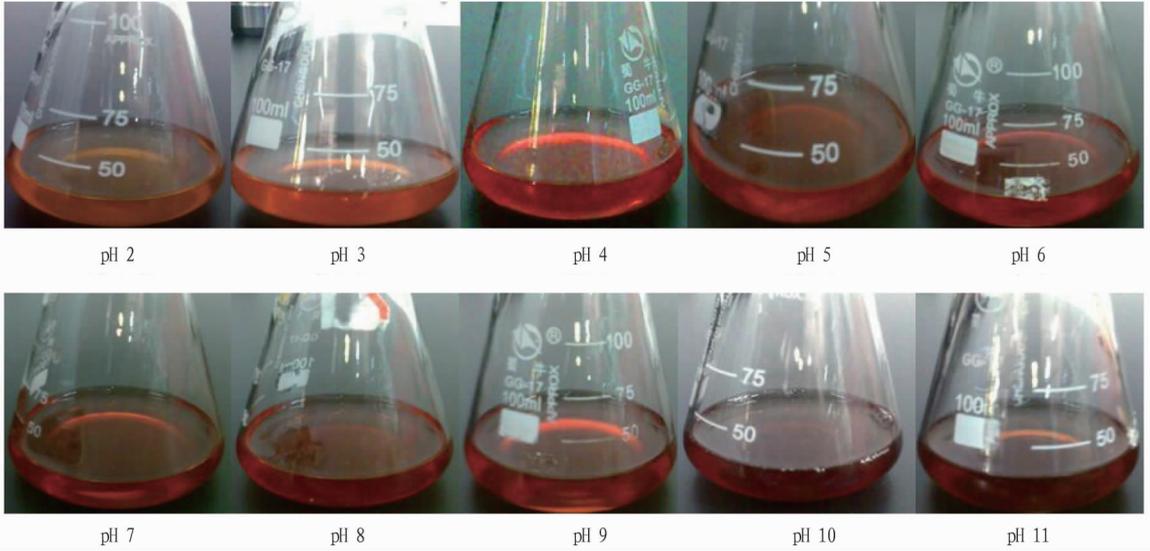


图5 pH对色素稳定性的影响

Fig.5 Effects of pH on pigment stability

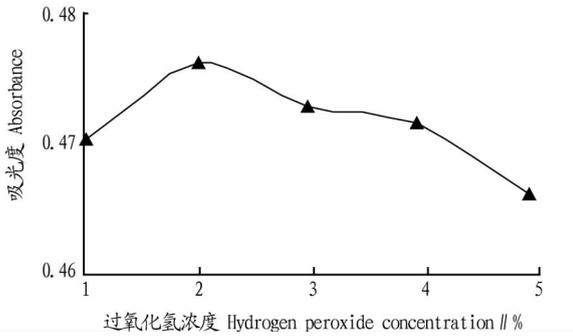


图6 过氧化氢对色素溶液稳定性的影响

Fig.6 Effects of hydrogen peroxide concentration on pigment

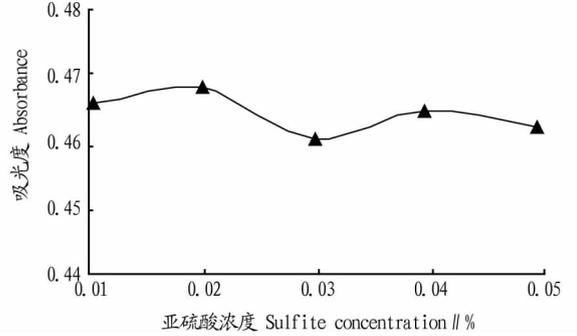


图7 亚硫酸浓度对色素溶液稳定性的影响

Fig.7 Effects of sulfite concentration on pigment solution

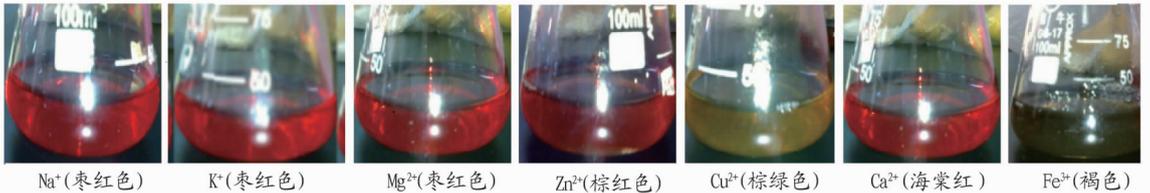


图8 金属离子对色素稳定性的影响

Fig.8 Effects of metal ion on pigment stability

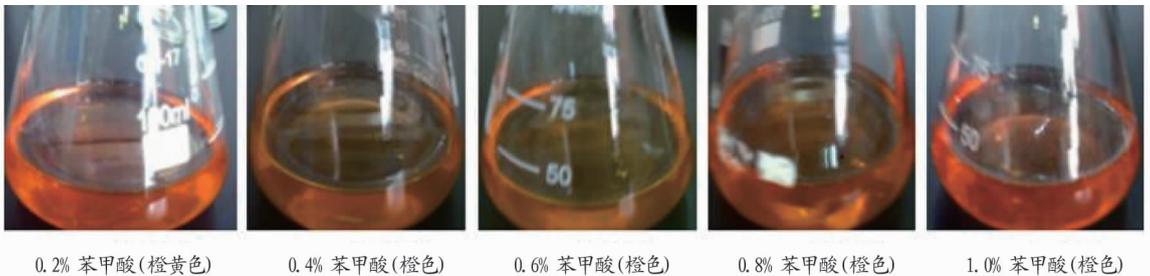


图9 苯甲酸对色素稳定性的影响

Fig.9 Effects of benzoic acid on pigment stability

3 结论

及分析得出了红龙草色素的最佳提取条件为超声时间

以红龙草为原料,以水为溶剂提取色素,通过正交试验

(下转第117页)

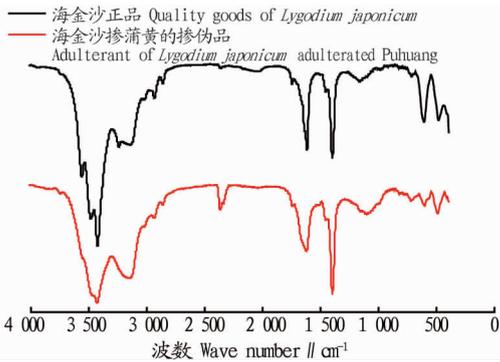


图2 海金沙正品与其掺蒲黄的掺伪品的 FT-IR 光谱

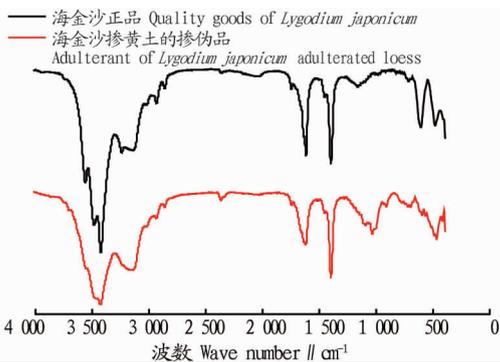
Fig. 2 FT-IR spectra of quality goods of *Lygodium japonicum* and its adulterant adulterated Puhuang

图3 海金沙正品与其掺黄土的掺伪品的 FT-IR 光谱

Fig. 3 FT-IR spectra of quality goods of *Lygodium japonicum* and its adulterant adulterated loess

3 讨论

利用 FT-IR 法在给定的条件下测定海金沙正品及其掺伪品的 FT-IR 光谱图,得到各海金沙样品的红外光谱图基本一致,海金沙的黄土掺伪品与海金沙的蒲黄掺伪品的红外吸收图谱与海金沙的红外吸收图谱存在明显差别。该试验方法的精密度、重复性及稳定性考察合格,测定结果准确,操作简便、易行,可用于鉴别海金沙正品及其掺伪品。

参考文献

- [1] 余希成,卢俊.超临界 CO₂ 萃取海金沙中黄酮的研究[J].食品研究与开发,2007,28(12):33-35.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:294.
- [3] 侯晓苹,王沪荣.海金沙掺伪品鉴别 2 例[J].陕西中医,2013,34(11):1545-1546.
- [4] 李瑞,李魁.海金沙掺伪的鉴别[J].医药前沿,2014(6):376-377.
- [5] 贾荷丽,查道成.海金沙掺伪的鉴别检验[J].亚太传统医药,2012,8(7):36-37.
- [6] 刁克俭.海金沙的掺伪鉴别[J].湖北中医杂志,2012,34(2):69-70.
- [7] 赵鹏辉,巩江,高昂,等.海金沙的鉴别及药学研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(14):8380-8381.
- [8] 袁晓林.海金沙与炒蒲黄的鉴别[J].天津药学,2012,24(4):23-24.
- [9] 方彩飞.近红外光谱法对海金沙掺伪情况的定量分析[J].亚太传统医药,2012,8(2):47-48.
- [10] 余驰,刘爱萍.红外光谱法对海金沙掺伪情况的定量分析[C]//中国药理学杂志.岛津杯第九届全国药物分析优秀论文评选交流会论文集.广州:中国药学会,2009.
- [11] 徐海星,刘小平,张成伟.中药材海金沙的红外光谱鉴别[J].武汉理工大学学报,2006,28(2):137-140.
- [12] 徐海星,刘小平,瞿国义,等.中药材海金沙 X 射线衍射 Fourier 指纹图谱鉴定[J].中药材,2006,29(2):123-126.
- [13] 赵花荣,王晓燕,陈冠华,等.利用傅里叶变换红外光谱法鉴定小麦品种[J].光谱学与光谱分析,2004,24(11):1338-1341.

(上接第 100 页)

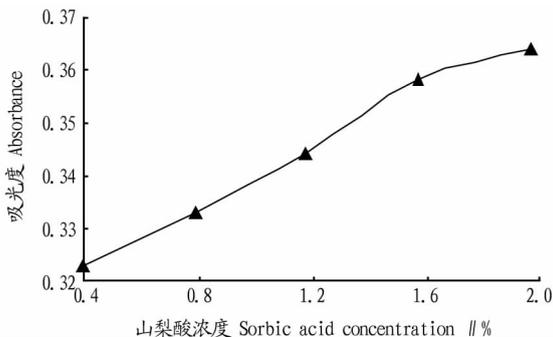


图10 山梨酸浓度对色素溶液的影响

Fig. 10 Effects of sorbic acid concentration on pigment solution

30 min, 料液比 1:55 (g: mL), α -淀粉酶与纤维素酶比例 3:1。

红龙草色素的稳定性试验表明,红龙草色素光稳定性较差,在弱酸至弱碱 (pH 5~8) 条件下稳定,低浓度的氧化剂溶液对色素有较好的护色效果,低浓度的还原剂溶液中色素的耐还原性较好,添加食品添加剂苯甲酸时无影响,添加食品添加剂山梨酸时有助于对色素的保护,金属离子 Na⁺、Mg²⁺、K⁺ 对色素几乎没有影响,Zn²⁺ 对色素有减色的作用,Cu²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺ 对色素有较大影响。因此在红龙草色素加工、保存、使用及运输过程中应避免与 Cu²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺ 接触。

参考文献

- [1] 刘德良.红苋草色素提取工艺及稳定性研究[J].湖北农业科学,2012,51(1):143-146.
- [2] 郑华,张弘,张忠和.天然动植物色素的特性及其提取技术概况[J].林业科学研究,2003,16(5):628-635.
- [3] 赵昶灵,陈俊愉,刘雪兰,等.理化因素对梅花‘南京红须’花色色素颜色呈现的效应[J].南京林业大学学报(自然科学版),2004,28(2):27-32.
- [4] 顾文秀,谢为明,夏文水,等.超声波提取乌饭树叶色素及其稳定性的研究[J].林产化学与工业,2005,25(4):74-78.
- [5] 李桂新,杨志孝,孙兆武.牵牛花色素的超声提取及稳定性研究[J].山东农业大学学报(自然科学版),2004,35(2):205-207.
- [6] 李和生,王鸿飞.桑椹红色素的提取工艺及其稳定性研究[J].食品科技,2002(3):51-52.
- [7] 徐忠,薄凯.千日红花色苷的酶法提取及纯化研究[J].食品与发酵工业,2006,32(8):139-141.
- [8] 蔡金星,刘秀凤,李兆蒙,等.以微波-超声波法提取草莓色素及其理化性质的研究[J].食品与发酵工业,2003,29(5):69-72.
- [9] 崔蕊静,李凤英,李春华.黑豆皮红色素提取及其稳定性因素分析[J].中国粮油学报,2004,19(1):48-51.
- [10] 盛锋,付蕾,李长城,等.连翘花黄色素的提取及其对光稳定性的研究[J].食品与发酵工业,2002,28(2):66-70.
- [11] 于加平.藿香色素的提取及稳定性研究[J].北方园艺,2011(24):35-37.
- [12] 吕晓玲,王玉平,周平等.甜菜红色素主要成分抗氧化能力[J].食品研究与开发,2009,30(6):39-43.
- [13] 王玲,邓敏姬.紫甘薯天然红色素的提取及其稳定性研究[J].食品科技,2011,36(4):179-183.
- [14] 彭子模,惠寿年,李进,等.玫瑰花红色素及其稳定性研究[J].西北植物学报,1999,19(2):349-353.
- [15] 詹福建,巫光宏,黄卓烈,等.红龙草红色素稳定性的研究[J].植物资源与环境学报,2006,15(2):60-62,67.