

表7 芥末蛋白中氨基酸含量与大豆蛋白、花生蛋白比较

氨基酸种类	序号																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
氨基酸种类	天	苏	丝	谷	甘	丙	胱	缬	蛋	异亮	亮	酪	苯丙	赖	组	色	精	脯
芥末蛋白	8.27	4.60	4.60	20.59	5.70	5.56	0.43	5.13	2.17	4.77	8.87	3.60	5.34	4.17	3.06	0.96	5.95	6.20
大豆蛋白[3]	11.9	3.7	5.5	20.5	4.0	3.9	1.0	4.8	1.1	4.9	7.7	3.7	5.4	6.1	2.5	1.4	7.8	5.3
花生蛋白[3]	12.5	2.5	5.2	20.7	4.2	4.0	1.4	4.5	1.0	4.7	6.7	4.7	5.6	3.0	2.4	1.1	12.6	4.6
FAO/WHO[3]	2.4							4.2	2.2	4.2	4.8		2.8	4.2		1.4		

#### 4 分析与讨论

4.1 通过试验确定了芥末蛋白粉的工艺路线及工艺条件。采用提取芥籽油和油脂后的残渣为原料,用热碱法提取蛋白质,然后在 pH4.1~4.6 沉淀分离,实践证明工艺可行,合理。

芥菜籽不宜直接提取蛋白粉,因芥菜籽含油脂过高,粉碎时易乳化,影响蛋白质的析出,使产率下降。

4.2 在芥末蛋白的提取过程中,由于氧化酶的作用而引起褐变。产品干燥加热时,温度升高,易使产品发生美拉德反应、焦糖化反应等,使色泽变褐或变黑,用还原剂( $\text{NaHSO}_3$ )护色,因  $\text{H}_2\text{SO}_3$  (有效  $\text{SO}_2$ ) 具有强烈的还原性,抑制了酶促褐变,  $\text{SO}_2$  又能与鞣质的酮基结合,抑制了美拉德反应(非酶褐变)的进行。另外在浸提前先用水浸泡一下,除去芥末中的可溶性糖类,可减少美拉德反应和焦糖化反应,降低褐变程度。

4.3 由芥末蛋白粉的氨基酸分析结果可知,在 18 种氨基酸中的 8 种人体必需氨基酸含量不

但丰富,而且很均衡,尤其是赖氨酸含量较高,仅次于大豆蛋白,是一种营养价值较高的蛋白强化剂。

我们研制的芥末蛋白饮料不但没有芥末的异味,而有很好的牛奶风味。另外芥末蛋白添加到肉类食品中,有极好的持水性,不但能保持产品的形状规则和颜色鲜美,并可提高出品率。用于灌肠制品中,可使加热后的灌肠的肠衣容易脱落。芥末蛋白的应用很有发展前途。

#### 参考文献

- 1 中国医学科学院卫生研究所,食品成分表,北京:人民卫生出版社,1983。
- 2 北京市《蛋白质资源的开发与利用》编写组. 蛋白质资源的开发与利用. 北京:轻工出版社,1988。
- 3 陈葆新译. 加工食品的营养价值手册. 北京:轻工出版社,1989。
- 4 周朝勤. 食品科学, 1988. 4:41~44。
- 5 邴伟章. 食品科学, 1987. (3):28~32。

## 萝卜色素的提取及其性质

张志红 陈清轩 中国科学院发育生物学研究所 100080

**摘要** 从“心里美”萝卜中提取出一种天然红色色素。本文研究了该色素的提取工艺及理化性质。依据花色素定性试验、光谱鉴定等方法,初步认为“心里美”萝卜中红色色素的主要成份为天竺葵色素,并通过小鼠急性毒性实验对该色素做出了毒理学评价。

## 引言

萝卜色素是从北京“心里美”萝卜中提取的一种天然红色色素。它属于类黄酮系,主要由花色苷构成。北京“心里美”是中国萝卜 (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* Bailey) 中的秋冬萝卜类型绿色种,为我国普遍栽培的萝卜品种,成本低,来源丰富,并有较高的营养价值。从中提取的红色素安全、无毒,稳定性好,作为一种新型的天然食品色素,有着广阔的应用前景。

### 1 原料和试剂

原料为新鲜、皮薄、果肉紫红的“心里美”萝卜,洗净,去皮,切成薄片备用。

无水甲醇、无水乙醇、浓盐酸、异戊醇、苯、乙醚、冰醋酸等试剂均为国产分析纯。硅胶 G 薄层板 10 cm×20 cm,为江苏福山生化试剂厂生产。

### 2 萝卜色素的提取

#### 2.1 工艺流程

去皮萝卜片→加入 3 倍量的无水乙醇<sup>常温、密闭</sup>浸提 4~10 h→减压抽滤→真空浓缩→喷雾干燥→成品

2.2 提取率为 3.5%~4.7%(以湿重计),回收率在 95%以上。

### 3 萝卜色素的理化性质

3.1 外观:紫红色粉末。

3.2 溶解性:易溶于水;可溶于甲酸、乙酸甲酯等强极性溶剂;不溶于无水甲醇、无水乙醇、丙酮、氯仿、苯、甲苯、乙醚、乙酸乙酯、四氯化碳等极性较小的溶剂。

3.3 薄层层析:将 10%的色素水溶液点样于硅胶 G 薄层板的一端,用无水乙醇:水=1:1 的展层剂在室温条件下上行展开。结果见图 1。

3.4 热稳定性:配制色素的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH 值为 5.0,6.0。经不同的热处理后,在最大吸收波长测其 O.D. 值。结果见表 1。

3.5 光稳定性:将色素溶液置于自然光下,半

年后观察,溶液颜色无明显变化。说明该色素对光的稳定性较强。

3.6 pH 值对萝卜色素的影响:分别配制 5% 的萝卜色素溶液 pH2.2~14.0。观察色素溶液的颜色,并测其在可见光区域内的最大吸收波长  $\lambda_{\max}$ 。常温放置 10 d 后,再观察其颜色变化,测其  $\lambda_{\max}$  的变动。结果见表 2。

从表 2 中看到,该色素在酸性溶液中较稳定,保持其固有颜色, $\lambda_{\max}$  基本不变;而在中性及弱碱性溶液中, $\lambda_{\max}$  向长波方向移动,色素颜色易变化;在强碱性溶液中,色素变为稳定的明黄色。

表 1 不同受热温度对萝卜色素的影响

温度	时间	pH5.0		pH6.0	
		O. D. 520	颜色	O. D. 530	颜色
室温	24h	0.277	粉红	0.235	紫玫瑰
80℃	30min	0.221	稍浅	0.193	稍浅
100℃	30min	0.219	稍浅	0.183	稍浅
121℃	20min	0.222	较上者深	0.192	较上者深

表 2 不同的 pH 值对萝卜色素的影响

pH 值	$\lambda_{\max}$ (nm)	颜色	10d 后的	10d 后
			$\lambda_{\max}$ (nm)	的颜色
2.2	510	桔红	510	桔红
3.0	515	桔红	510	桔红
4.0	510	桔红↓浅	510	桔红↓浅
5.0	无	粉红	无	粉红
6.0	无	粉红	无	粉红↓浅
7.0	550	粉红	无	紫红
8.0	580	紫	590	紫蓝↓深
9.0	580	紫红↓加	600	黄绿中
10.0	580	紫红↓深	610	黄绿
11.0	/	紫蓝	/	黄
12.0	/	黄绿	/	黄
13.0	/	明黄	/	明黄
14.0	/	明黄	/	明黄

### 4 萝卜色素的性质研究及其鉴定

4.1 萝卜色素的纯化:为进一步分析、研究萝卜色素的化学本质,需将上述乙醇提取的色素粗品进行一定的纯化。

4.1.1 层析洗脱:将色素粗品溶于 1% 盐酸化甲醇中,过滤,除去杂质。将滤液点在层析纸上,呈带状。用 n-丁醇:浓盐酸:水=7:2:5 展开。剪取红色带状部分,用 5% 醋酸化甲醇下行

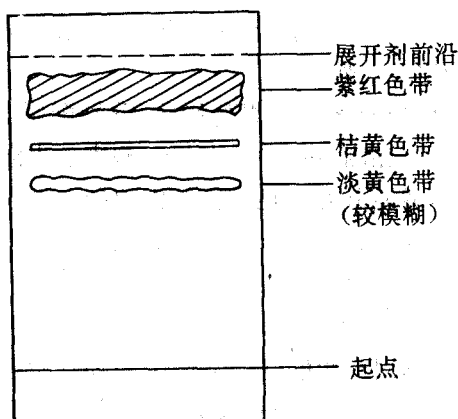


图1 萝卜色素薄层层析图谱(示意图)

洗脱,使花色素苷溶出,再浓缩干燥成固体。

4.1.2 乙醚纯化:将色素粗品置于 0.1% 盐酸化甲醇中溶解,过滤,滤液中加入 3~5 倍的乙醚,充分振荡后,静置于冰箱中,则花色素苷以糖浆状沉淀。将沉淀再次溶于 0.1% 盐酸化甲醇中,得到红色溶液,再加入乙醚。静置后,花色素苷成为粉末状沉淀。将上述操作反复几次,可逐渐提高花色素苷的纯度。

4.1.3 乙醇沉淀:将色素粗品分别用乙醚和乙醇洗涤,倾去洗出液。加入适量的 85% 乙醇,加热溶解,趁热过滤。滤液中加入无水乙醇,室温静置,则出现糖浆状红色沉淀。重新溶于 85% 乙醇后,热过滤,加无水乙醇,析出无规则状红色沉淀,真空干燥,即为花色素苷固体。

4.2 花色素的制备:花色素苷经酸水解后,生成糖和糖苷配基,即花色素。

4.2.1 花色素苷的水解:取花色素苷的层析洗脱液,加入同体积的盐酸后煮沸 3~5 min,离心,除去沉淀。上清液中加入水及少量异戊醇,振荡后静置,则花色素和糖类分别向上层醇相和下层水相移行。

4.2.2 花色素的萃取:在 4.2.1 中分离的醇相中加入 2 倍的水和 4 倍的苯振荡,花色素移向下层(水相)。在水相中再加入少量异戊醇,则花色素移向上层(醇相)。取醇相,真空干燥为固体花色素。

4.3 花色素的定性试验:

4.3.1 盐酸溶液的色调:配制花色素的盐酸溶液(100 ml 中有 4 mg 以上),观察其色调为粉

红。

4.3.2 戊醇-醋酸钠试验:取少量上述盐酸溶液,加入戊醇,振荡后静置。在上层醇相中加入固体醋酸钠,振荡后溶液变混浊,粉红色中略带紫色。放置片刻,溶液变为淡黄色。

4.3.3 氯化铁反应:在 4.3.2 的醇相中加入 1 滴氯化铁(III)溶液。充分振荡,两相不混溶,溶液颜色无变化。

4.3.4 花青素试剂洗提:在少量 4.3.1 的盐酸溶液中,加入环己醇 1 份和甲苯 5 份的混合液,充分振荡后观察,两相中均有颜色。说明洗提不完全。

4.3.5 氧化试验:向 4.3.1 的盐酸溶液中加入其体积一半的 10% 的氢氧化钠溶液后,溶液变为澄清的蓝绿色。通入空气后,溶液无变化。加酸酸化后,溶液恢复为原来的粉红色,说明此花色素稳定。

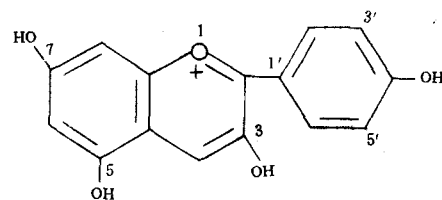


图2 天竺葵色素的结构式

综上所述,依据 Robinson 等 1931 年试验所得的结果<sup>[1]</sup>,初步认为此花色素为天竺葵色素。其结构如图 2。

4.4 花色素的光谱特性:将花色素溶解于 0.01% 盐酸化甲醇中,以 0.01% 盐酸化甲醇作空白对照,测定其可见光区域的吸收光谱(见图 3)。同时测定当在上述花色素溶液中加入极其微量的 5% 氯化铝乙醇溶液时,最大吸收波长的变动(见表 3)。

表3 加入氯化铝前后,花色素  
吸收光谱  $\lambda_{max}$  的变动<sup>[注]</sup>

$\lambda(\text{nm})$	未加氯化铝 时的 O.D. 值	加入氯化铝 后的 O.D. 值
490	0.867	0.886
500	0.895	0.909
510	0.911	0.928
520	0.912	0.932
530	0.878	0.898

[注]:加入氯化铝前后色素溶液的浓度有所改变

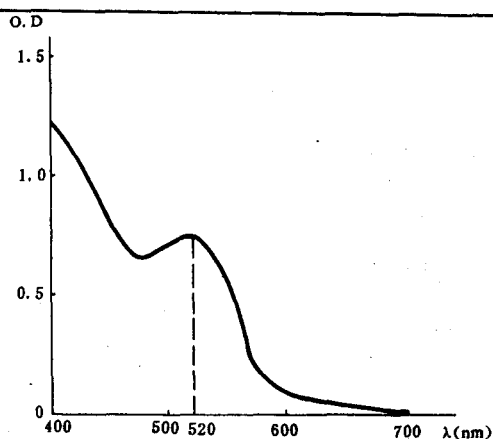


图3 “心里美”萝卜花色素可见光区域的吸收光谱

由表3可以看出,加入氯化铝前后色素溶液的最大吸收波长均为520 nm,即 $\Delta\lambda_{\max}=0$ 。比较 Harborne 1958年测得的结果<sup>[2]</sup>知道,该花色素的光谱特性与天竺葵色素相同,这与定性试验中所得结果一致。

4.5 花色素苷的光谱特性:将花色素苷溶解于0.01%盐酸化甲醇中,以0.01%盐酸化甲醇作空白对照,测定其吸收光谱。

#### 4.5.1 可见光区域:见图4

由图4知,可见光区域最大吸收波长 $\lambda_{\max}=507$  nm, 440 nm处的吸光系数 $E_{440}$ 和可见光部分最大吸光系数 $E_{\max}$ 的比率 $E_{440}/E_{507}=39$  (%)。此比率有助于区别花色素核5位羟基是否被糖基化。根据 Harborne (1958)所获得的有关资料<sup>[2]</sup>,初步确定该花色素苷为5位羟基未被糖基化的天竺葵色素苷。

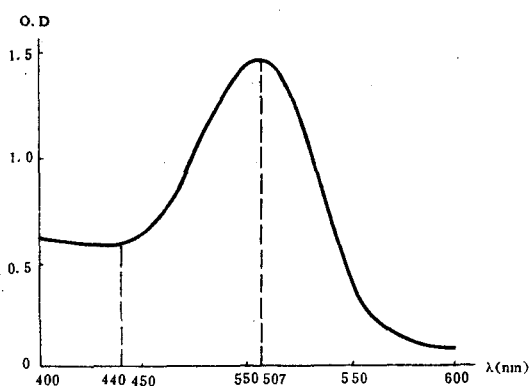


图4 “心里美”萝卜中花色素苷可见光区域的吸收光谱

#### 4.5.2 紫外区域:见图5

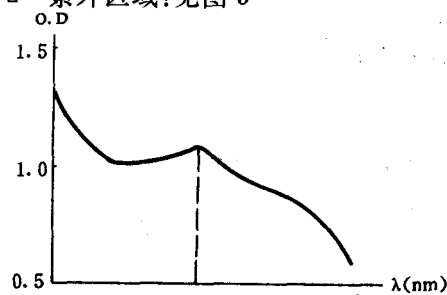
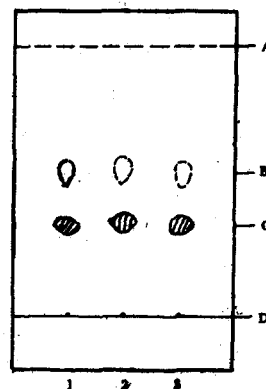


图5 “心里美”萝卜中花色素苷紫外区域的吸收光谱

由图5知,该花色素苷在紫外区域只有1个吸收峰, $\lambda_{\max}=289$  nm。

4.6 花色素苷中结合糖的定性试验:花色素苷水解后,用异戊醇萃取出花色素,大部分糖类则留在下层水相中。取水相,在放有氢氧化钠的干燥器内真空干燥。将其残渣溶于少量水中进行薄层层析。展层后的薄板经干燥后,喷上显色剂于85℃烘烤10 min,即显出色斑。结果见图6。



A. 展开剂前沿 B. 粉红色斑点,  $f=0.53$ ,  $R_f$ 最后褪色 C. 喷淋显色剂后出现的蓝紫色斑点,  $R_f=0.31$  D. 起点

图6 花色素苷中结合糖的薄层层析图谱(示意图)

支持剂:硅胶G

展开剂:n-丁醇:浓盐酸:水=7:2:5

显色剂:4%苯胺丙酮:4%二苯胺丙酮:磷酸=5:5:1

图6中,1,2,3为三个相同样品;B为未水解完全的花色素苷,故喷淋显色剂后斑点褪色;C即为糖显色斑点。根据糖在薄板上的显色反

应及 Rf 值<sup>[3]</sup>,推测花色素苷中结合有葡萄糖。

## 5 萝卜色素的毒性试验

用色素粗品对“昆明白”小鼠进行急性毒性实验。20 只健康小鼠(10♀, 10♂)分成两组。实验前 24 h 停食不停水。实验组(5♀, 5♂)用 50% 的色素生理盐水溶液灌胃,剂量为 12g/kg 体重;对照组(5♀, 5♂)用等量的生理盐水灌胃。实验后即开始喂食。观察 7 d,小鼠无异常表现,未发生死亡。表明  $LD_{50} > 12\text{g/kg}$ 。该色素为实际无毒级,可免做蓄积毒性试验。

## 6 讨论

6.1 色素的提取工艺:本实验分别选用水、50%乙醇、95%乙醇、无水乙醇和无水甲醇作浸提溶剂,并分别对不同的浸提温度、浸提时间、浸提次数及原料与浸提溶剂的比例做了比较试验。结果表明,以无水乙醇作为浸提溶剂无毒、廉价、提取率高、易回收。在常温条件下用 3 倍的无水乙醇浸泡原料,浸提 4~10 h,一次即可将绝大部分色素溶出。若连续生产时,还可进行第二次的浸提,时间可适当缩短,将第二次的提取液作为下一批原料的第一次浸提溶剂。这样,不仅可以降低成本,提高产量,还可节约能源,获得较好的经济效益。

我们认为,这套色素提取工艺,简单经济,方便合理,易于实行。所得产品为纯物理方法制得,除含有色素外,还有大量糖类、有机酸、微量元素及多种维生素等,可直接用于食品生产,能增加食品的风味和营养。

6.2 色素的薄层层析图谱:将乙醇提取的色素展层后,得到的图谱(图 1)中有 3 条色带,可以认为萝卜中所含色素不是单一的,该色素(粗品)为几种色素的混合物。但其中红色素所占的

比例最大。故我们在以后的分离纯化及定性试验中,便只选取了红色素作为研究对象,而忽略了其它。

6.3 色素的热稳定性:考虑到食品生产中,饮料内大多加入柠檬酸,为弱酸性。故配制了柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH5.0, 6.0 作为色素的溶剂,测定其热稳定性。表 1 中所列为纯化后的色素溶液测定的结果。但我们曾观察到:色素粗品溶液受热后,颜色加深,着色力随温度增加呈上升趋势。说明色素混合物对热不敏感,耐热性好。

6.4 色素的性质研究及其鉴定:据以往研究表明<sup>[4]</sup>,在天然状态下,类黄酮以糖苷的形式存在。花色素苷是类黄酮中的红色素,从萝卜中分离出的红色色素即主要由花色素苷构成。花色素苷经酸水解后,生成的花色素种类很多,但目前发现的天然花色素只有 7 种,天竺葵色素是其中之一。

我们对花色素进行的鉴定实验是以往广泛采用的最为有效的定性方法,鉴定结果也是通过与前人实验积累的资料比较而得,因此较为可信。但对于花色素苷中的结合糖,则只能通过其显色反应加以推测。故而要十分确切地定出萝卜色素的化学结构,还有待利用先进的化学分析手段,如红外、质谱、ESR 光谱等,对其进行更进一步的测定。

## 参考文献

- 1 Robinson, G. M., Robinson, R., Biochem. J. 1931, 25, 1687.
- 2 Harborne, J. B., Biochem. J. 1958, 70:22.
- 3 张龙翔等编. 生化实验方法和技术. 北京:人民教育出版社, 1981
- 4 (日)安田 齐著,傅玉兰译. 花色的生理生物化学. 北京:中国林业出版社, 1989.