

文章编号:1673-1689(2007)04-0046-05

黑果小檗红色素的提取与食用安全性

滕云, 张进

(信阳农业高等专科学校 园艺林学系, 河南 信阳 464000)

摘 要:以黑果小檗果实为实验材料提取红色素,并对色素中有害微量元素含量进行检测,对色素的食用安全性进行了毒理学研究。结果表明:黑果小檗红色素可能带入到饮料中的有害微量元素砷、铅、汞、铜均低于相关的国家食品卫生标准。急性毒理实验表明,该色素属于无毒物。其小鼠骨髓细胞微核和精子畸形试验均为阴性,未显示出致突变性。该色素可作为食用色素开发利用。

关键词:黑果小檗;红色素;提取;食用安全性

中图分类号:TS 202.3

文献标识码:A

Research on the Abstraction of Red Pigment of *Berberis heteropoda* Schrenk and its Edible Safety

TENG Yun, ZHANG Jin

(Horticulture and Forestry Department, Xinyang Agricultural College, Xinyang 464000, China)

Abstract: The fruits of *Berberis heteropoda* Schrenk were used as experimental material to extract the red pigment. The harmful trace elements in this pigment were tested. And the edible safety was studied by the methods of toxicology. The results indicated that the harmful trace elements Which may be brought into cold drink by pigment were lower than requirements of relevant National Standard on food safety. According to the result of acute toxicity test in mice, the *Berberis heteropoda* Schrenk red pigment had not toxicity. Bone marrow cell micronucleus test and mice sperm abnormality test had negative results and there was no mutagenicity. So it suggested that this pigment could be used as edible pigment.

Key words: *Berberis heteropoda* Schrenk; red pigment; extraction; edible safety

黑果小檗(*Berberis heteropoda* Schrenk)为小檗科落叶灌木,其茎皮及根含小檗碱,果实为小檗实,性平,可健胃、清热解暑、生津止渴。而且,黑果小檗果实含葡萄糖、果糖、苹果酸、胡萝卜素及色素类等物质^[1-2]。可见,黑果小檗果实具有一定的保健功效。长期以来在民间,黑果小檗果实被哈萨克

族和维吾尔族民众晾干后煮水饮用。但从规模化应用上讲,其目前基本上处于未被开发利用的状态,对其作为植物色素开发利用的研究更少。为此,作者对黑果小檗红色素的提取及食用安全性作了初步研究,以为其开发利用提供理论依据。

收稿日期:2006-08-29.

作者简介:滕云(1974-),女,河南信阳人,理学硕士,助教.主要从事植物资源开发与利用. Email: tengyun1224@

163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本实验所用材料为小檗科小檗属黑果小檗的果实,为野生种,采自新疆乌鲁木齐南山。实验所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

参照文献[3-4]。

1.2.1 黑果小檗红色素提取的实验室流程 黑果小檗成熟果实→清洗→晾干→粉碎→浸提→过滤→离心→浓缩→冷冻干燥。

1.2.2 提取方法

1) 浸提剂的选择:准确称取15份经粉碎处理后的黑果小檗果实1g,分别放入15个容积为50 mL的三角瓶中,并依次加入乙酸、丙酮、苯、石油醚、氯仿、四氯化碳、乙醚、甲醇、乙酸乙酯、水和质量分数20%、40%、60%、80%、100%的乙醇各30 mL。在室温下浸提24 h,然后分别过滤各提取液并定容。以蒸馏水为参比,测其516 nm波长处最大吸光度值,并加以比较分析。

2) 浸提温度、浸提时间及浸提剂用量的选择:采用正交法设计试验组合,按正交表 $L_{16}(4^5)$ 对提取温度、提取时间及浸提剂用量3个因子4个水平进行试验,选出最佳提取条件。

1.2.3 色素的吸收光谱图 采用721型分光光度计对黑果小檗色素液在400~600 nm范围内进行扫描,作出吸收光谱图。

1.2.4 有害微量元素含量测定 参照文献[5]。

1) 铜的测定:根据GB/T 5009.13—1996,采用石墨炉原子吸收光谱法进行测定。

2) 铅的测定:根据GB/T 5009.12—1996,采用石墨炉原子吸收光谱法进行测定。

3) 汞的测定:根据GB/T 5009.17—1996,采用冷原子吸收光谱法进行测定。

4) 砷的测定:根据GB/T 5009.11—1996,采用硼氢化物还原比色法进行测定。

1.2.5 色素毒理学检测 参照文献[6-10]。

1) 急性毒性试验:根据GB15193.3—2003,采用寇氏法测定 LD_{50} 。将50只“昆明白”小鼠,体重在18~22 g,随机分成5组,雌雄各半。并将受试物分为5个对数等距的剂量组,给小白鼠空腹一次灌胃,观察两周,计算 LD_{50} 。

2) 小鼠骨髓细胞微核试验:根据GB15193.5—2003,选择“昆明白”小鼠,体重在25~30 g,随机分

成雌雄各5组,每组5只。设3个剂量组(高剂量:(1/2) LD_{50} = 8.5 g/kg,中剂量:(1/4) LD_{50} = 4.25 g/kg,低剂量:(1/8) LD_{50} = 2.125 g/kg),一个阴性对照组(灌以蒸馏水),一个阳性对照组(灌以环磷酰胺40 mg/kg)。经口灌胃色素水溶液,采用30 h给受试物法,即两次给受试物间隔24 h,第二次给受试物后6 h,颈椎脱臼处死动物,取胸骨骨髓制片,计数1 000个PCE(小鼠骨髓嗜多染红细胞)中含微核的PCE数,进行统计学处理。

3) 小鼠精子畸形试验:根据GB15193.7—2003,选择“昆明白”小鼠,体重在25~30 g,每组随机抽取5只雄性小鼠,经口灌胃色素水溶液。设3个剂量组(高剂量:(1/2) LD_{50} = 8.5 g/kg,中剂量:(1/4) LD_{50} = 4.25 g/kg,低剂量:(1/8) LD_{50} = 2.125 g/kg),一个阴性对照组(灌以蒸馏水),一个阳性对照组(灌以环磷酰胺40 mg/kg)。每天染毒一次,连续5 d,第35天取样制片。每只小鼠计数1 000个精子,统计精子畸形数,计算畸形率,进行统计学处理。

2 结果与分析

2.1 提取方法

2.1.1 浸提剂的选择 结果表明黑果小檗红色素不溶于丙酮、苯、石油醚、氯仿、四氯化碳、乙醚、乙酸乙酯等极性溶剂,而溶于水、乙醇、乙酸和甲醇。其中质量分数80%的乙醇的浸提液的吸光度值最大,颜色鲜红,效果最好,因此选用质量分数80%的乙醇作浸提剂。

2.1.2 浸提温度、浸提时间及浸提剂用量的选择

由表1中R值可以看出,各因素指标对实验结果的重要性次序为 $A > C > B$;表2方差分析表明,提取温度是影响黑果小檗红色素提取的主要因素,是影响色素提取率的显著因子。提取温度在45℃和65℃下两者提取率相差较小,由于温度过高会影响色素结构,因此选择45℃为最佳提取温度。提取时间和浸提剂用量为非显著因子,综合考虑,提取温度45℃、提取时间1 h、浸提剂用量25 mL/g(每1 g黑果小檗干果实添加25 mL浸提剂)的组合作为黑果小檗红色素的最佳提取条件。

上述条件提取的色素液经过滤,离心,浓缩,冷冻干燥,得红黑色粉末状色素,用于以下实验。

2.2 色素的吸收光谱图

由图1可知,黑果小檗红色素在可见光区516 nm处有一最大吸收峰。

表1 $L_{16}(4^5)$ 正交表试验结果
Tab.1 Results of $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment

实验号	A 提取温度	B 提取时间	C 浸提剂用量	空白	空白	吸光度值
1	1(25℃)	1(1 h)	1(20 mL/g)	1	1	0.781
2	1(25℃)	2(2 h)	2(25 mL/g)	2	2	0.750
3	1(25℃)	3(3 h)	3(30 mL/g)	3	3	0.783
4	1(25℃)	4(4 h)	4(35 mL/g)	4	4	0.700
5	2(45℃)	1(1 h)	2(25 mL/g)	3	4	0.914
6	2(45℃)	2(2 h)	1(20 mL/g)	4	3	0.902
7	2(45℃)	3(3 h)	4(35 mL/g)	1	2	0.789
8	2(45℃)	4(4 h)	3(30 mL/g)	2	1	0.824
9	3(65℃)	1(1 h)	3(30 mL/g)	4	2	0.840
10	3(65℃)	2(2 h)	4(35 mL/g)	3	1	0.791
11	3(65℃)	3(3 h)	1(20 mL/g)	2	4	0.890
12	3(65℃)	4(4 h)	2(25 mL/g)	1	3	0.912
13	4(85℃)	1(1 h)	4(35 mL/g)	2	3	0.556
14	4(85℃)	2(2 h)	3(30 mL/g)	1	4	0.741
15	4(85℃)	3(3 h)	2(25 mL/g)	4	1	0.522
16	4(85℃)	4(4 h)	1(20 mL/g)	3	2	0.682
K_1	3.014	3.091	3.255	3.223	2.918	$T=12.377$
K_2	3.429	3.184	3.098	3.020	3.061	
K_3	3.433	2.984	3.188	3.170	3.153	
K_4	2.501	3.118	2.836	2.964	3.245	
R	0.932	0.200	0.419	0.259	0.327	

注:各实验组合的提取液原液均稀释相同倍数后测定其吸光度值。

表2 方差分析
Tab.2 Variance analysis

变差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值
A	0.146 299 437 5	3	0.048 766 479 2	11.347 03 [*]
B	0.005 196 937 5	3	0.001 732 312 5	0.403 076
C	0.025 334 437 5	3	0.008 444 812 5	1.964 948
误差	0.025 786 375 0	6	0.004 297 729 2	
总和	0.202 613 937 5	15		

^{*} $\alpha=0.05$

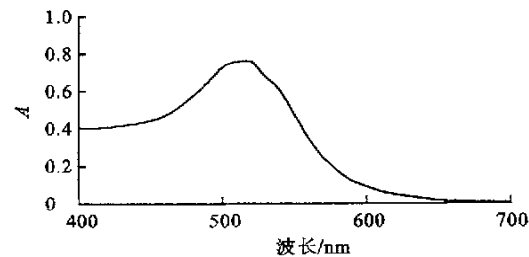


图1 黑果小檗色素水溶液可见光区域内的吸收光谱
Fig.1 The spectrum of Berberis heteropoda Schrenk pigment in water

2.3 有害微量元素含量测定
其结果见表3。

表3 黑果小檗红色素固体样品中有害微量元素含量
Tab.3 The content of the harm trace elements in solid pigment

有害微量元素	指标/(mg/kg)
砷(As)	0.031
铜(Cu)	<0.1
汞(Hg)	0.16
铅(Pb)	0.027

参照国家冷冻饮品和碳酸饮料卫生标准(见表4)。

从黑果小檗果实中提制的黑果小檗红色素,应用于饮料中所带入的有害微量元素应低于国家冷

冻饮品和碳酸饮料卫生标准,以具备食用安全性。

表 4 冷冻饮品和碳酸饮料卫生标准(GB2759.1—2003,GB2759.2—2003)

Tab. 4 The sanitation standard of the cold drink and carbonated beverage(GB2759.1—2003,GB2759.2—2003)

项 目	指标/(mg/L)
砷(As)	<0.2
铜(Cu)	<5
汞(Hg)	<0.01
铅(Pb)	<0.3

注:汞含量按鲜乳中允许量计(GB2762—2005)。

因为黑果小檗红色素可用于各种冷饮食品中,若以黑果小檗红色素使用量 2 g/L 计,则添加到饮

料中的色素带入量可计算得如下结果:砷的最大质量浓度 0.062 μg/L<0.2 mg/L;铜的最大质量分数 0.2 μg/kg<5 mg/L;汞的最大质量分数 0.32 μg/kg<0.01 mg/L;铅的最大质量分数 0.054 μg/kg<0.3 mg/L。

2.4 黑果小檗红色素的毒理学研究

2.4.1 急性毒理实验 按寇氏法计算,黑果小檗红色素 LD₅₀ 为 17.0 g/kg。参照国家急性毒性剂量分级,可以认为黑果小檗红色素是无毒物。

2.4.2 小鼠骨髓细胞微核试验 由表 5 可知,该色素各剂量组与阴性对照组无显著差异(P>0.05);同时,阴性对照组与阳性对照组有极显著差异(P<0.01);无剂量一效应关系。表明该色素未引起小鼠骨髓细胞微核率增高。

表 5 色素对小鼠骨髓细胞微核畸变率的影响

Tab. 5 Effect of the pigment on the mice's bone marrow cell micronucleus

动物性别	受试物	剂量	动物数/只	受检细胞数/个	含微核细胞数/个	微核率/%	P 值
雄	色素液	(1/2)LD ₅₀	5	5×1 000	13	2.6	> 0.05
	色素液	(1/4)LD ₅₀	5	5×1 000	10	2	> 0.05
	色素液	(1/8)LD ₅₀	5	5×1 000	12	2.4	> 0.05
	蒸馏水	0	5	5×1 000	11	2.2	
	环磷酰胺	40	5	5×1 000	115	23	<0.01
雌	色素液	(1/2)LD ₅₀	5	5×1 000	12	2.4	> 0.05
	色素液	(1/4)LD ₅₀	5	5×1 000	10	2	> 0.05
	色素液	(1/8)LD ₅₀	5	5×1 000	12	2.4	> 0.05
	蒸馏水	0	5	5×1 000	13	2.6	
	环磷酰胺	40	5	5×1 000	121	24.2	<0.01

2.4.3 小鼠精子畸形试验 结果见表 6。

表 6 色素对小鼠精子畸形率的影响

Tab. 6 Effect of the pigment on the mice's sperm abnormality

剂量	动物数/只	检查精子数	精子畸形数	精子畸形率/%	P 值
(1/2)LD ₅₀	5	5×1 000	120	2.4	> 0.05
(1/4)LD ₅₀	5	5×1 000	110	2.2	> 0.05
(1/8)LD ₅₀	5	5×1 000	114	2.28	> 0.05
阴性对照组	5	5×1 000	115	2.3	
阳性对照组	5	5×1 000	396	7.92	<0.01

由表 6 可知,该色素各剂量组与阴性对照组无显著差异(P>0.05);同时,阴性对照组与阳性对照

组有极显著差异(P<0.01);无剂量一效应关系。表明该色素未引起小鼠精子畸形率增高。

以上毒理学试验表明:黑果小檗红色素属于无毒物,其小鼠骨髓细胞微核、精子畸形试验均为阴性,未显示出致突变性。加之在民间,黑果小檗果实长期以来被哈萨克族和维吾尔族民众食用,未发现有中毒现象。由此推断,黑果小檗红色素具有食用安全性,可以考虑用作天然食用色素开发利用。

3 结 语

1) 黑果小檗红色素最佳提取条件为:质量分数 80%的乙醇为浸提剂,提取温度 45℃,提取时间 1 h,浸提剂用量 25 mL/g(每 1 g 黑果小檗干果实添加 25 mL 浸提剂)。

2) 黑果小檗红色素如以使用量 2 g/L 计,应用于饮料中所带入的有害微量元素砷、铜、汞、铅的量均远低于国家冷冻饮品和碳酸饮料卫生标准,具有食用安全性。

3) 急性毒性试验表明,黑果小檗红色素 LD₅₀ 为 17.0 g/kg,属于无毒物。其小鼠骨髓细胞微核、

精子畸形试验均为阴性,未显示出致突变性,具有食用安全性。

4) 黑果小檗果实富含红色素,同时又具有一定的医疗保健功能,用作原料提取色素产品,是一种较为理想的天然食用色素资源,具有很大的开发利用潜力。

参考文献(References):

- [1] 刘斌心. 沙漠植物志(第一卷)[M]. 北京:科学出版社,1985:514.
- [2] 新疆维吾尔自治区卫生厅. 维吾尔药材标准[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993:24-26.
- [3] 吕海英,彭子模,张瑾. 新疆重瓣榆叶梅花食用色素的提取方法[J]. 生物学杂志,2003,20(2):40-41.
LU Hai-ying, PENG Zi-mo, ZHANG Jin. Research on natural pigment of prunus *Triloba lindl* of Xinjiang[J]. *Journal of Biology*, 2003, 20(2):40-41. (in Chinese)
- [4] 霍文兰. 桑果红色素的提取及性能[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(1):74-79.
HUO Wen-lan. Extraction of red pigment from mulberry and its stability[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(1):74-79. (in Chinese)
- [5] 彭子模,高雁,彭宇. 新疆鸡冠花食用色素粗成分与有害微量元素含量的测定[J]. 新疆师范大学学报:自然科学版,2003,22(4):39-42.
PENG Zi-mo, GAO Yan, PENG Yu. The measurement on rough components and harm trace elements of edible pigment of flower of *Celosia cristata* L of Xinjiang[J]. *Journal of Xingjiang Normal University(Natural Sciences Edition)*, 2003, 22(4):39-42. (in Chinese)
- [6] 李进,彭宇,彭子模,等. 鸡冠花食用色素安全性的研究[J]. 生物技术,2004,14(3):43-45.
LI Jin, PENG Yu, PENG Zi-mo, et al. Research on safety of edible pigment of flower of *Celosia cristata* L[J]. *Biotechnology*, 2004, 14(3):43-45. (in Chinese)
- [7] 庄桂东,顾军,迟玉森. 海带生物有机碘的急性毒理学评价研究[J]. 食品工业科技,2003,24(12):87-88.
ZHUAGN Gui-dong, GU Jun, CHI Yu-sen. Study on the toxicology of biological organic iodine in kelp[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2003, 24(12):87-88. (in Chinese)
- [8] 杨严俊,周建新. 活性蛋黄抗体的毒性试验[J]. 无锡轻工大学学报:食品与生物技术,2004,23(3):36-40.
YANG Yan-jun, ZHOU Jian-xin. Test of acute and chronic toxicity of egg-yolk antibody IgY[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2004, 23(3):36-40. (in Chinese)
- [9] 杨荣,陆瑛,曾诚,等. 塔拉豆荚粉对小鼠急性毒性和致突变作用研究[J]. 昆明医学院学报,2005,26(2):29-31.
YANG Rong, LU Ying, ZENG Cheng, et al. Study of acute toxicity and mutagenicity of tara in mice[J]. *Academic Journal of Kunming Medical College*, 2005, 26(2):29-31. (in Chinese)
- [10] 同继红,董捷,苏忆兰,等. 蜂王浆复合胶囊的毒理学研究[J]. 食品科学,2005,26(8):411-417.
YAN Ji-hong, DONG Jie, SU Yi-lan, et al. Toxicological assessment of royal jelly complex capsule on animal[J]. *Food Science*, 2005, 26(8):411-417. (in Chinese)

(责任编辑:秦和平,朱明)