

龙葵果花色苷的提取工艺研究

腾飞,赵福杰,郑洪亮,王 萍*

(东北林业大学林学院,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:目的:筛选提取龙葵果花色苷的最佳溶剂,运用响应面法优化其提取工艺。方法:选取 14 种溶剂对龙葵果进行提取,分析不同提取物中总酚、黄酮和花色苷的得率与抗氧化性之间的相关性。在单因素的基础上,运用全因子实验设计、最陡爬坡实验和中心组合实验设计进行响应面分析。结果:60% 乙醇为最佳提取溶剂,其中总酚、黄酮和花色苷的得率分别为 (1.99 ± 0.03) 、 (1.02 ± 0.01) 、 (0.82 ± 0.02) mg/g。其对 $ABTS^{\cdot+}$ 和 $\cdot OH$ 的清除率分别为 $88.18\% \pm 0.59\%$ 和 $82.45\% \pm 0.59\%$,总抗氧化能力为 (5.45 ± 0.06) mmol/L $FeSO_4$ 当量。总酚、黄酮和花色苷的得率与抗氧化性之间的相关性大小为:总酚 > 黄酮 > 花色苷。最佳提取工艺条件为 pH 1.0,温度 $29^{\circ}C$,时间 85.5min,料液比 1:25,在此条件下进行龙葵果花色苷的提取,花色苷得率为 (0.86 ± 0.05) mg/g。结论:利用响应面法确定的最佳条件合理,实验预测值与实际值偏差较小,该工艺可应用于龙葵果中花色苷的提取。

关键词:龙葵,花色苷,提取,抗氧化,响应面

Study on the optimal extraction conditions of anthocyanin from the fruit of *Solanum nigrum* L.

TENG Fei, ZHAO Fu-jie, ZHENG Hong-liang, WANG Ping*

(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective: The best solvent to extract anthocyanins from *Solanum nigrum* L. fruits and the optimal extraction condition were obtained. Methods: 14 kinds of solvents were chosen to extract. The correlation between yield of total phenols, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity was analyzed. Based on the single-factor test analysis, the full factorial design, steepest ascent design and central composite design for response surface analysis were applied. Results: 60% ethanol was the best solvent to extract anthocyanins from *Solanum nigrum* L. fruits. The content of total phenols, flavonoids and anthocyanins from 60% ethanol extract was (1.99 ± 0.03) mg/g, (1.02 ± 0.01) mg/g, (0.82 ± 0.02) mg/g, respectively. The $ABTS^{\cdot+}$ and $\cdot OH$ scavenging activity was up to $88.18\% \pm 0.59\%$, $82.45\% \pm 0.59\%$, respectively. The ferric reducing antioxidant capacity of the extracts was (5.45 ± 0.06) mmol/L equivalent to $FeSO_4$. The correlation between yield and antioxidant activity: total phenols > flavonoids > anthocyanin. The best extraction technology of anthocyanins from *Solanum nigrum* L. was as follows: pH 1.0, temperature $29^{\circ}C$, time 85.5min and liquid-solid ratio 1:25. On this extraction condition, the content of *Solanum nigrum* L. anthocyanins was (0.86 ± 0.05) mg/g. Conclusion: The obtained model was credible and could be used for extraction of anthocyanins from *Solanum nigrum* L. fruits.

Key words: *Solanum nigrum* L.; anthocyanins; extraction; antioxidant; response surface methodology

中图分类号:TS201.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2014)07-0240-07

龙葵 (*Solanum nigrum* L.) 为茄科茄属一年生草本植物^[1]。别名黑星星、野葡萄、苦葵等,常见于路边、田间、荒地,植株高约 30~60cm。龙葵全草含苷类甙体生物碱、龙葵多糖、矿物质、维生素、色素、氨基酸、皂苷等,而主要药用成分为生物碱和甙类多糖^[2]。国内外大量研究表明龙葵具有抗肿瘤,抗菌和抗病毒,调节神经和内分泌的作用。刘颖等报道龙葵总生物碱包括澳洲茄碱、澳洲茄边碱和 β -澳洲茄边碱^[3],而 Loganayaki 等认为其中包括 2 种甙体类寡糖苷和 3 种甙体糖苷^[4]。李健等人研究了龙葵多糖对小鼠荷宫颈癌

(U14)生长的抑制及对荷瘤小鼠免疫调节作用。结果显示龙葵多糖具有抑制腹水型肿瘤 U14 生长、延长荷瘤小鼠存活时间的作用,进而调节细胞因子的分泌而发挥其抗肿瘤作用^[5]。目前的研究大多集中在对龙葵生物碱和多糖的研究,对龙葵果花色苷的研究尚未见报道。本研究选取多种溶剂对龙葵果进行提取,并且分析总酚、黄酮和花色苷的得率与抗氧化性之间的相关性。之后在单因素的基础上利用响应面分析法对龙葵果花色苷的提取工艺进行了优化,为龙葵果花色苷的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

成熟龙葵果 采自哈尔滨郊区;2-脱氧-D-核

收稿日期:2013-08-09 * 通讯联系人

作者简介:腾飞(1990-),女,硕士,研究方向:功能食品。

糖, TPTZ, 没食子酸, Folin-酚试剂和 ABTS 试剂 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

HR2004 榨汁机 飞利浦电子香港有限公司; RE-53A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; SHB-4 循环水多用真空泵 宁波杜甫仪器厂; 722S 可见分光光度计 上海精密实验仪器有限公司; WD-2102A 全自动酶标仪 郑州南北仪器设备有限公司; PHS-26 数显 pH 计 上海精密实验仪器有限公司; HHS 型电热恒温水浴锅 北京博迅实业有限公司医疗设备厂; TDL-5-H 台式低速离心机 上海星科科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 提取方法 参考文献^[6,10] 采用溶剂萃取法。取 10.0g 新鲜龙葵果按料液比 1:20 (m/v) 分别加入水、甲醇、20%~100% 乙醇, 20%~100% 丙酮, 正丁醇、乙酸乙酯, 用榨汁机均匀打碎, 在 20℃ 恒温水浴锅中浸提 2h, 4000r/min 离心 5min, 取上层清液 40℃ 减压旋转蒸发将溶剂旋出, 得到提取液, 定容至相同体积备用。

1.2.2 龙葵提取物体外抗氧化活性测定

1.2.2.1 清除 ABTS⁺·能力测定 实验方法参照文献^[11]并略有改动。把 ABTS 母液用 PBS (0.2mol/L pH 7.4) 稀释成 ABTS 工作液, 要求 ABTS 工作液的吸光值减去相应的 PBS 吸光值 A₇₃₄ 为 0.700 ± 0.050。96 孔板的每个检测孔中加入 200μL ABTS 工作液。空白对照孔中加入 10μL 蒸馏水或 PBS 等适当溶液; 样品检测孔内加入 10μL 各种样品溶液, 轻轻混匀。室温孵育 6min 后测定 A₄₀₅。清除率计算公式:

$$RSA(\%) = 1 - (A_1 - A_2) / A_3 \times 100$$
 式(1)

式中, A₁-样品检测孔; A₂-对照组检测孔; A₃-空白检测孔。

1.2.2.2 清除·OH 能力测定 对羟基自由基的清除作用采用生成硫代巴比妥酸法来测定, 用 2-脱氧-D-核糖作底物, 参考 Suksomtip 等^[12] 方法, 利用公式计算清除率。

1.2.2.3 总还原能力测定 标准曲线建立: FRAP 工作液的制备: 分别取 2.5mL TPTZ (用 40mmol/L HCl 配制成浓度为 10mmol/L 的溶液), 25mL 醋酸 (300mmol/L, pH3.6), 2.5mL FeCl₃·6H₂O (20mmol/L), 混合, 即得工作液。配制 FeSO₄ 浓度分别为 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5mmol/L。在 96 孔板中加入 20μL 各稀释液, 然后加入 180μL 的 FRAP 工作液, 37℃ 下反应 4min, 于 593nm 波长下测吸光值, 以吸光值为纵坐标, FeSO₄ 浓度为横坐标, 绘制标准曲线^[11]。龙葵提取物总还原能力测定: 在 96 孔板中依次加入 20μL 待测的样液, 然后加入 180μL 的 FRAP 工作液, 37℃ 下反应 4min, 于 593nm 波长下测定吸光值, 根据标准曲线计算出样品的总抗氧化能力, 将总还原能力表示为 FeSO₄ 的浓度 (mmol/L)。

1.2.3 龙葵提取物中总酚、黄酮和花色苷的含量测定

1.2.3.1 Folin-ciocalteu 法测定总酚含量 标准曲线的建立: 参照文献^[13] 的方法。龙葵提取物中总酚含量的测定: 移取 1.0mL 龙葵提取液, 按照标准曲线

的测定方法操作, 测定吸光值, 由标准曲线求出稀释液中总酚的浓度, 然后用下式计算得率。

$$\text{得率}(\text{mg/g}) = \frac{c \times v}{m}$$
 式(2)

式中, c-由标准曲线计算得到的总酚含量 (mg/mL); m-原料质量 (g); v-提取液的体积 (mL)。

1.2.3.2 黄酮含量的测定 标准曲线的建立: 参照文献^[14] 的方法。龙葵提取物中黄酮含量的测定: 取一定浓度的龙葵提取物溶液 2mL 于 25mL 具塞试管, 按照标准曲线的测定方法操作, 测定吸光值, 由标准曲线求出稀释液中总黄酮的浓度, 然后用公式(2) 计算得率。

1.2.3.3 pH 示差法测定花色苷含量 分别移取配制好的龙葵提取液 1.0mL, 用 pH1.0、4.5 的缓冲溶液定容到 10mL。达平衡后 (pH1 为 50min, pH4.5 时为 80min) 分别在 510、700nm 处测定吸光值^[15]。用 pH 示差法计算溶液中花色苷得率如下:

$$\text{花色苷得率}(\text{mg/g}) = (A/\epsilon L) \times M \times DF \times V/W$$

式中: A-吸光度, A = (A_{510nm pH10} - A_{700nm pH10}) - (A_{510nm pH45} - A_{700nm pH45}); ε-矢车菊花素-3-葡萄糖苷的消光系数, 26900; DF-稀释因子; M-矢车菊-3-葡萄糖苷的分子量, 449.2; V-最终体积, mL; W-产品重量, mg。

1.2.4 花色苷提取的单因素实验 取 10g 成熟龙葵果, 以 60% 乙醇为提取溶剂, 依次对其进行 pH、提取温度、提取时间及料液比的单因素实验。

1.2.4.1 pH 对花色苷提取的影响 称取 10g 成熟龙葵果, 在 60% 乙醇、料液比 1:20、提取温度 20℃、提取时间 120min 的条件下, 考察 pH 为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 时对花色苷提取的影响。

1.2.4.2 提取温度对花色苷提取的影响 称取 10g 成熟龙葵果, 在 60% 乙醇、料液比 1:20、提取时间 120min、pH2.0 条件下, 考察温度为 20、30、40、50、60、70℃ 对花色苷提取的影响。

1.2.4.3 提取时间对花色苷提取的影响 称取 10g 成熟龙葵果, 在 60% 乙醇、料液比 1:20、提取温度 20℃、pH2.0 条件下, 考察提取时间为 20、40、60、80、100、120min 对花色苷提取的影响。

1.2.4.4 料液比对花色苷提取的影响 称取 10g 成熟龙葵果, 在 60% 乙醇、提取温度 20℃、pH2.0、提取时间 100min 的条件下考察料液比为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 时对花色苷提取的影响。

1.2.5 析因实验设计 在单因素实验的基础上, 对 pH、提取温度、提取时间和料液比 4 个因素做全因子实验设计, 其水平编码表见表 1^[16]。

表1 因素水平编码表

Table 1 Factors and levels in the experimental design

因素	水平	
	-1	1
pH(X ₁)	1.0	3.0
温度(℃, X ₂)	20	30
时间(min, X ₃)	80	120
料液比(m/v, X ₄)	1:20	1:30

表3 不同溶剂提取物中3种酚类活性物质得率和抗氧化活性

Table 3 The antioxidant activity and the contents of the active ingredients from *Solanum nigrum* L.fruits

溶剂	ABTS ⁺ · 清除率(%)	·OH 清除率(%)	FRAP (FeSO ₄ mmol/L)	总酚 (mg/g)	黄酮 (mg/g)	花色苷 (mg/g)
水	68.64 ± 1.13	69.47 ± 1.13	4.31 ± 0.00	1.75 ± 0.02	0.81 ± 0.01	0.50 ± 0.01
甲醇	87.55 ± 0.23	80.01 ± 0.37	4.98 ± 0.12	1.86 ± 0.03	0.96 ± 0.02	0.84 ± 0.04
正丁醇	40.82 ± 0.33	33.65 ± 0.33	3.26 ± 0.17	1.20 ± 0.01	0.77 ± 0.02	0.73 ± 0.01
乙酸乙酯	30.18 ± 0.18	36.54 ± 0.86	0.72 ± 0.04	0.59 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.42 ± 0.03
20% 乙醇	76.15 ± 1.83	81.49 ± 1.83	4.65 ± 0.03	1.86 ± 0.01	0.95 ± 0.02	0.64 ± 0.03
40% 乙醇	84.85 ± 1.45	79.81 ± 1.45	5.25 ± 0.05	1.86 ± 0.01	0.99 ± 0.01	0.80 ± 0.03
60% 乙醇	88.18 ± 0.59	82.45 ± 0.59	5.45 ± 0.06	1.99 ± 0.03	1.02 ± 0.01	0.82 ± 0.02
80% 乙醇	90.12 ± 2.95	54.81 ± 2.95	5.53 ± 0.12	1.96 ± 0.01	0.98 ± 0.01	0.81 ± 0.02
100% 乙醇	66.60 ± 0.11	34.13 ± 0.11	5.22 ± 0.02	1.67 ± 0.00	0.91 ± 0.01	0.81 ± 0.01
20% 丙酮	54.56 ± 0.27	76.44 ± 0.27	3.49 ± 0.03	1.88 ± 0.01	0.91 ± 0.02	0.44 ± 0.01
40% 丙酮	61.65 ± 0.80	77.64 ± 0.80	4.69 ± 0.03	1.87 ± 0.03	0.99 ± 0.02	0.68 ± 0.04
60% 丙酮	86.57 ± 0.97	84.62 ± 0.96	5.38 ± 0.08	1.91 ± 0.02	1.01 ± 0.03	0.81 ± 0.03
80% 丙酮	75.19 ± 0.49	54.09 ± 0.48	5.09 ± 0.24	1.88 ± 0.03	1.00 ± 0.01	0.89 ± 0.01
100% 丙酮	54.99 ± 2.64	36.30 ± 2.64	4.89 ± 0.11	1.76 ± 0.01	0.92 ± 0.01	0.79 ± 0.02

实验共有20个实验点,其中16个为分析因子,4个为零点。零点实验进行4次,以估计误差。

1.2.6 最陡爬坡实验设计 最陡爬坡实验能最快逼近最大响应区域,确定中心组合实验的中心点,保证响应面分析结果的准确有效性。根据全因子实验设计结果,利用多元一次方程回归系数的符号和大小,设计显著因素的最陡上升路径,以实验值变化的梯度方向为爬坡方向,根据各因素效应值的大小确定变化步长,有效逼近最大理想区域^[16]。

1.2.7 中心组合实验设计(CCD) 以全因子实验筛选的两个显著因素,结合最陡爬坡实验确定的实验水平根据中心旋转组合设计(CCD)法进行响应面分析,实验设计见表2。

表2 中心组合实验因素水平编码表

Table 2 Factors and levels
in the central composite design

因素	水平				
	-1.41	-1	0	1	1.41
温度(℃)(X ₂)	25	26	29	32	33
时间(min)(X ₃)	78	80	85	90	92

1.2.8 数据分析 每个处理进行3次重复,取平均值,采用Design-export 8.0软件进行实验设计及响应面分析,Excel和SPSS19.0进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同溶剂提取物中3种酚类活性物质得率及其抗氧化活性

实验得到的标准曲线如下:

总酚含量标准曲线为 $y = 4.4076x - 0.0014$, $R^2 = 0.9989$

y :吸光值, x :没食子酸含量(mg)。

黄酮标准曲线为 $y = 1.325x - 0.0056$, $R^2 = 0.9997$

y :吸光值, x :芦丁含量(mg)。

由标准曲线计算总酚、黄酮和花色苷的含量及

其抗氧化性做表,见表3。

由表3可知,乙醇、丙酮的提取效果明显优于其他溶剂,最佳提取溶剂为60%乙醇,其中总酚、黄酮和花色苷最大得率分别为 1.99 ± 0.03 、 1.02 ± 0.01 和 (0.82 ± 0.02) mg/g,表明龙葵3种酚类活性物质易溶于极性溶剂。随着乙醇浓度的不断增大,活性成分得率逐渐增大,当乙醇浓度增大到60%时,活性成分得率最大,然而浓度继续增大,得率反而下降。龙葵3种酚类活性物质在乙醇和丙酮中溶解性较好,因为乙醇和丙酮对龙葵中果胶、蛋白质和糖类物质有沉降作用,使提取物黏度变小,有利于活性物质溶出,但溶剂浓度过高时,会增加龙葵中脂类物质溶出,阻碍活性物质溶解,从而导致总酚、黄酮、花色苷得率减小。

由表3可知,不同溶剂提取物对ABTS⁺·和·OH清除率的趋势基本相同,并且变化趋势比较明显。乙醇和丙酮提取物对ABTS⁺·和·OH均有较好的清除效果,80%乙醇提取物对ABTS⁺·的清除率最大为 $90.12\% \pm 2.95\%$,60%丙酮提取物对·OH的清除率最大为 $84.62\% \pm 0.96\%$ 。在总还原力测定的结果中,80%乙醇提取物的还原力最强为 5.53 ± 0.12 mmol/L FeSO₄ 当量。结果表明60%乙醇、80%乙醇和60%丙酮对龙葵中3种酚类活性物质提取效果较好且提取物的抗氧化性较强,但考虑到溶剂毒性和生产中的经济性选择60%乙醇作为提取溶剂。

2.2 相关性分析

将3种酚类活性物质含量和抗氧化性进行双变量相关性分析,得到含量与抗氧化性指标之间的相关系数 R^2 与显著性,结果见表4。

由表4可知,总酚、黄酮和花色苷三者的得率与抗氧化性之间的相关性大小为:总酚>黄酮>花色苷。并且三者得率大小顺序为:总酚>黄酮>花色苷。由此可知,抗氧化能力主要与活性成分含量呈正相关。

表4 酚类活性成分含量与抗氧化相关性分析
Table 4 The correlation between the active content and antioxidant activity

指标	项目	黄酮得率 (mg/g)	花色苷得率 (mg/g)	总酚得率 (mg/g)
FRAP	相关性(R^2)	0.927	0.614	0.959
	显著性(双侧)	0.000	0.026	0.000
·OH	相关性(R^2)	0.592	-0.017	0.627
	显著性(双侧)	0.033	0.955	0.022
ABTS ⁺	相关性(R^2)	0.834	0.608	0.822
	显著性(双侧)	0.000	0.028	0.001

2.3 花色苷提取的单因素实验

2.3.1 pH对花色苷提取的影响 花色苷在酸性条件下稳定并且呈色效果好,因此采用酸性条件进行提取。由图1可知,提取液pH1.0时得率最大,随着pH不断增大,花色苷得率逐渐降低,说明龙葵花色苷在高酸性条件稳定,提取效果较好。这主要是因为当溶液pH为1.0~3.0时,花色苷主要以红色的黄烺离子存在,性质较稳定,受光和热的影响较小;随着pH的上升,花色苷结构发生变化,被裂解为花色素基元及糖基两部分,导致花色苷稳定性下降;而提取剂的pH过低可能使花色苷的糖基水解,也会导致花色苷的稳定性下降,因此提取液的适宜pH为2.0。

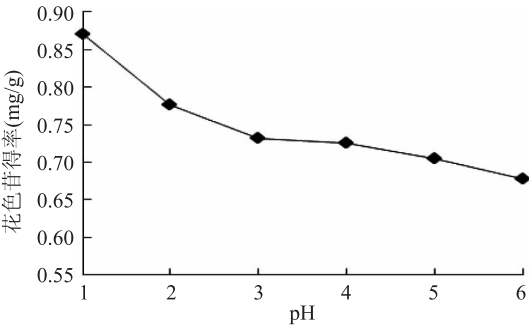


图1 不同提取 pH 对花色苷提取率的影响
Fig.1 Effects of pH values on anthocyanins yield

2.3.2 提取温度对花色苷提取的影响 由图2可以看出,当提取温度为20℃时,得率最大;随着提取温度升高,提取物中花色苷得率开始下降;温度高于50℃时,得率迅速降低。表明龙葵花色苷热稳定性较差,温度高时还原性增强,酚羟基被氧化,颜色发生变化^[17],而使得率降低,因此选择20℃作为花色苷提取温度。

2.3.3 提取时间对花色苷提取的影响 由图3可知,当提取时间为100min时,花色苷得率最大,120min花色苷得率减小是因为随着时间的延长,花色苷的氧化分解逐渐增强。

2.3.4 料液比对花色苷提取的影响 由图4可知,随着料液比增大,龙葵花色苷得率显著增大,当料液比为1:25时,花色苷得率达到最大。较大料液比可降低花色苷在溶剂中的浓度,加快花色苷的溶出速率,然而料液比过大致使花色苷分散性增强,更易氧化分解,所以料液比为1:30花色苷得率反而下降。

2.4 响应面优化龙葵花色苷提取工艺

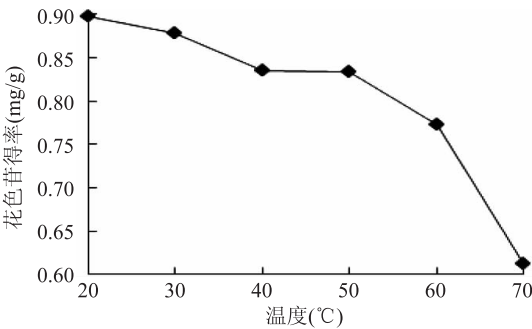


图2 不同提取温度对花色苷提取率的影响
Fig.2 Effects of temperature on anthocyanins yield

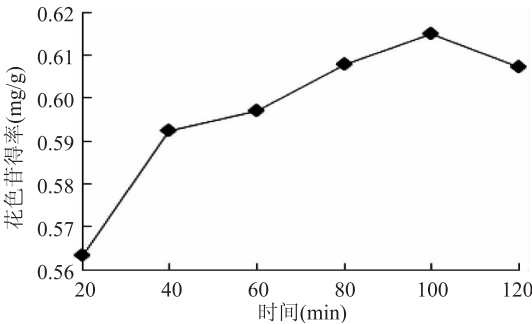


图3 不同提取时间对花色苷提取率的影响
Fig.3 Effects of time on anthocyanins yield

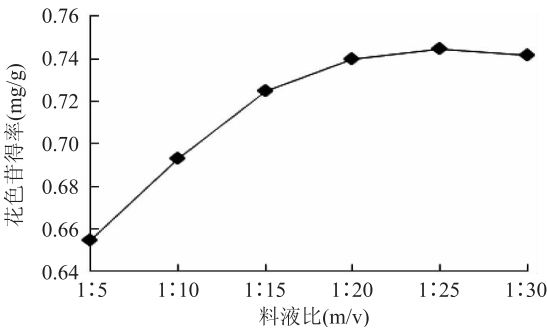


图4 不同料液比对花色苷提取率的影响
Fig.4 Effects of liquid-solid ratio on anthocyanins yield

2.4.1 全因子实验设计结果 实验设计方案及结果见表5,方差分析见表6。将表5的实验结果进行数据拟合,得到一次回归方程:

$$Y = 0.6629 - 0.0061X_1 - 0.0697X_2 + 0.0658X_3 + 0.0093X_4$$
 式(3)

从表6中可知,该模型极显著($p < 0.0001$),决定系数 $R^2 = 0.9145$,说明该模型拟合程度良好。通过 F 值大小可知,该模型中 pH、温度、时间和料液比显著性顺序为:温度 > 时间 > 料液比 > pH。由图5可知,温度和时间两项极显著,是该模型显著项。

2.4.2 最陡爬坡实验结果 根据全因子实验结果可知,提取温度和提取时间为花色苷提取的主要影响因素,由方程(3)可知,提取温度的系数为负,说明实验水平下降对花色苷的提取有积极的影响;提取时间系数为正,说明实验水平上升对花色苷得率有积极的影响。确定提取温度和提取时间的变化步长分别为3℃和5min进行最陡爬坡实验。实验设计及结果见表7。从表7中可看出,第4组实验方案花色苷

表 6 全因子实验因素水平主效应分析

Table 6 Regression analysis of the Pluckett-Burman experimental results

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	0.1490	4	0.0372	40.0994	<0.0001	**
X ₁	0.0006	1	0.0006	0.6331	0.4386	
X ₂	0.0777	1	0.0777	83.6577	<0.0001	**
X ₃	0.0693	1	0.0693	74.6127	<0.0001	**
X ₄	0.0014	1	0.0014	1.4939	0.2405	
残差	0.0139	15	0.0009			
失拟误差	0.0131	12	0.0011	4.0355	0.1387	
纯误差	0.0008	3	0.0003			
总和	0.1629	19				

注:p<0.05 为显著,用*表示;p<0.01 为极显著,用**表示。

得率最高,说明最优点在第 4 组方案附近,即 29℃,85min。

表 5 全因子实验设计及结果

Table 5 Pluckett-Burman design arrangement and corresponding experimental results

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	花色苷得率 (mg/g)
1	-1	-1	-1	-1	0.661
2	1	-1	-1	-1	0.643
3	-1	1	-1	-1	0.531
4	1	1	-1	-1	0.482
5	-1	-1	1	-1	0.758
6	1	-1	1	-1	0.814
7	-1	1	1	-1	0.649
8	1	1	1	-1	0.654
9	-1	-1	-1	1	0.681
10	1	-1	-1	1	0.616
11	-1	1	-1	1	0.564
12	1	1	-1	1	0.562
13	-1	-1	1	1	0.846
14	1	-1	1	1	0.805
15	-1	1	1	1	0.625
16	1	1	1	1	0.642
17	0	0	0	0	0.663
18	0	0	0	0	0.689
19	0	0	0	0	0.673
20	0	0	0	0	0.700

表 7 爬坡实验设计及结果

Table 7 Experimental design and results of the steepest ascent path

实验号	X ₂	X ₃	花色苷得率(mg/g)
1	38	70	0.638
2	35	75	0.691
3	32	80	0.782
4	29	85	0.852
5	26	90	0.836
6	23	95	0.821
7	20	100	0.813

2.4.3 中心组合实验(CCD)结果 基于以上实验结果,以最陡爬坡实验最优值为中心点,通过中心旋转组合设计(CCD)法,进一步确定最佳响应值。中心组合设计及结果见表 8,中心组合实验方差分析见表 9。

表 8 中心组合(CCD)设计及结果

Table 8 Experimental design and results of the central composite design

实验号	X ₂	X ₃	花色苷得率(mg/g)
1	-1	-1	0.703
2	1	-1	0.754
3	-1	1	0.763
4	1	1	0.728
5	-1.41	0	0.752
6	1.41	0	0.718
7	0	-1.41	0.701
8	0	1.41	0.742
9	0	0	0.846
10	0	0	0.853
11	0	0	0.839
12	0	0	0.861
13	0	0	0.854

利用 SAS19.0 软件,对实验数据进行二次多项回归拟合,获得了二次经验模拟方程:

$$Y = 0.4789X_2 + 0.4679X_3 - 0.0014X_2X_3 - 0.0062X_2^2 - 0.0025X_3^2 - 26.0587 \quad \text{式(4)}$$

二次多项模型方差分析确定显著因素,由表 9 的方差分析结果表明,方程差异极显著(p<0.0001),各因素系数均有意义,R²为 0.9783,说明拟合度良好,方程的显著性及可靠性极高。根据以上方程绘制响应面图形,如图 5。

响应面图直观地表现了提取温度和提取时间对花色苷得率的影响,对回归方程求导可以得到模型的极值点。即当温度为 28.8℃,时间为 85.5min,花色苷得率最大,理论最大值为 0.85mg/g。

2.4.4 方程的验证 通过响应面筛选得到的最佳提取条件,即 pH 为 1.0,提取温度为 29℃,提取时间为 85.5min,考虑到原料成本并结合单因素实验,最终选择料液比为 1:25,在此条件下进行龙葵花色苷提取,

表9 中心组合实验方差分析表
Table 9 ANOVA for the second-order polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	0.0460	5	0.0092	63.2231	<0.0001	**
X ₂	0.0001	1	0.0001	0.8834	0.3786	
X ₃	0.0011	1	0.0011	7.2612	0.0309	
X ₂ X ₃	0.0018	1	0.0018	12.6948	0.0092	
X ₂ ²	0.0215	1	0.0215	147.7150	<0.0001	**
X ₃ ²	0.0271	1	0.0271	185.7491	<0.0001	**
残差	0.0010	7	0.0001			
失拟误差	0.0007	3	0.0002	3.5010	0.1288	
纯误差	0.0003	4	0.0001			
总和	0.0471	12				

注: $p < 0.05$ 为显著, 用 * 表示; $p < 0.01$ 为极显著, 用 ** 表示。

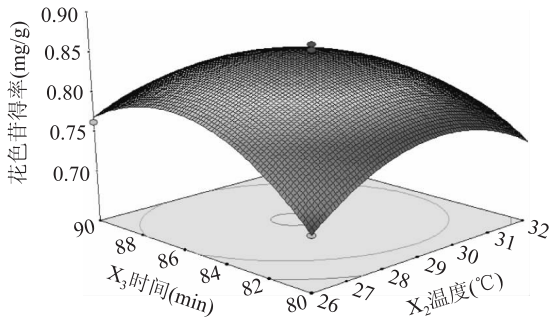


图5 提取温度和提取时间交互作用的响应面
Fig.5 Response surface curves for temperature and time on anthocyanins yield

花色苷得率为 (0.86 ± 0.03) mg/g, 与模型预测值误差仅为 1.2%, 说明预测值较为可靠, 通过实验筛选出来的实验参数能与实际实验拟合。

3 结论

3.1 采用不同溶剂提取龙葵果中 3 种酚类活性成分, 结果显示 60% 乙醇为最佳提取溶剂, 其总酚、黄酮、花色苷得率分别为 (1.99 ± 0.03) 、 (1.02 ± 0.01) 、 (0.82 ± 0.01) mg/g。ABTS⁺·清除率为 $88.18\% \pm 0.59\%$, ·OH 清除率为 $82.45\% \pm 0.59\%$, 总抗氧化能力为 (5.45 ± 0.06) mmol/L FeSO₄ 当量。

3.2 在 pH、提取温度、提取时间和液料比 4 个单因素实验的基础上, 利用中心组合实验 (CCD) 对提取条件进一步优化, 得到最佳提取条件为: pH 1.0, 提取温度 29℃, 提取时间 85.5min, 料液比 1:25。在此条件下进行龙葵花色苷提取, 花色苷得率为 (0.86 ± 0.03) mg/g。因此, 利用响应面分析方法对龙葵果花色苷提取工艺进行优化, 可获得最优的工艺参数, 能有效减少工艺操作的盲目性, 从而为龙葵的精深加工提供理论依据。

参考文献

[1] 刘为为, 刘延庆, 戴小军. 龙葵抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中药材, 2009(3): 462-465.
[2] 季宇彬, 王胜惠, 高世勇, 等. 龙葵活性成分的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2004(6): 637-641.
[3] 刘颖, 张燕玲, 王雁. 从天然植物龙葵中提取生物碱的工

艺研究[J]. 辽宁丝绸, 2003(2): 4-5, 31.
[4] Loganayaki N, Siddhuraju P, Manian S. Antioxidant Activity of Two Traditional Indian Vegetables: Solanum nigrum L and Solanum torvum L[J]. Food Science Biotechnol, 2010, 19(1): 121-127.
[5] 李健, 韩增胜, 李青旺. 龙葵多糖抗肿瘤和免疫调节作用的研究[J]. 安徽农科学, 2008, (33): 14589-14590, 14632.
[6] 李蕊. 野生浆果花色苷提取纯化、结构鉴定及体外抗氧化活性分[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
[7] 符晨星, 贺建华, 侯德兴. 3 种中草药提取物的多酚含量及抗氧化性[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011(1): 97-98.
[8] Cissé M, Bohuon P, Sambe F. Aqueous extraction of anthocyanins from Hibiscus sabdariffa: Experimental kinetics and modeling[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 109: 16-21.
[9] Yu LM, Zhao MM, Wang JS, et al. Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of phenolic extract from pine Pinus[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, 9: 122-128.
[10] 赵文思, 李茜倩. FRAP 法测定大枣枣皮红色素的总抗氧化能力[J]. 郑州大学学报(工学版), 2011(3): 28-30.
[11] Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following imulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake[J]. Food Chemistry, 2011, (28): 4-21.
[12] Suksomtip M, Ukpisdawithid S, Bhusawang P, et al. Phenolic compound content, antioxidant and radical-scavenging properties of methanolic extracts from the seed coat of certain thai tamarind cultivars[J]. Journal of Food Biochemistry, 2010, 34(23): 916-931.
[13] Aspé E, Fernández K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from Pinus radiata Bark[J]. Industrial Crops and Products, 2011, (34): 838-844.
[14] 桂劲松, 韦汉燕, 戴平, 等. 白背叶叶中总黄酮含量的测定[J]. 黑龙江医药科学, 2009(3): 24-25.
[15] Sun J, Yao M, Huang SX, et al. Antioxidant activity of
(下转第 267 页)

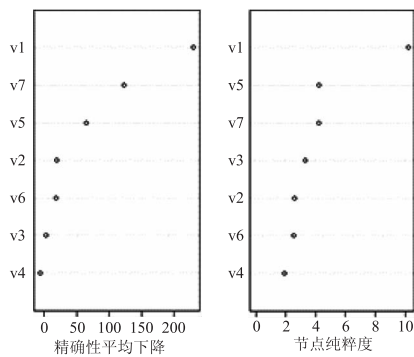


图5 葡萄酒的理化指标对酒外观的重要性

Fig.5 The importance of physical and chemical indicators of wine for the wine's appearance

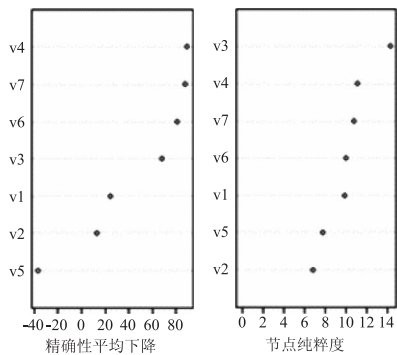


图6 葡萄酒的理化指标对酒香气的重要性

Fig.6 The importance of physical and chemical indicators of wine for the wine's aroma

指标。影响葡萄酒口感的酿酒葡萄主要理化指标是固酸比(V21)、葡萄总黄酮(V13)、苹果酸(V6)、总酚(V11)和pH(V19);影响葡萄酒香气主要理化指标是酒石酸(V5)、DPPH 自由基(V10)、果穗质量(V23)、可滴定酸(V20)、黄酮醇(V15);影响葡萄酒平衡主要理化指标是果穗质量(V23)、酒石酸(V5)、果皮颜色(V28)、褐变度(V9)、pH(V19)。而葡萄酒的理化指标花色苷(v1)、DPPH 半抑制体积(v6)、色泽(v7)、酒总黄酮(v4)是影响葡萄酒的香气、外观、平衡的主要指标。对葡萄酒质量的研究一直以来都

(上接第 239 页)

用[J].中国农业科技导报,2010,12(4):49-55.

[17] P Girard, R B Falconnie, J Bricout, *et al.* β -Carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 41(2):183-191.

[18] B K Lonsane, N P Ghildyal, S Budiatman, *et al.* *Engineering*

(上接第 245 页)

polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C.Smith [J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(2):276-281.

[16] 罗丽,梁琪,张炎,等.响应面法优化超声波辅助提取沙枣果总黄酮工艺[J].食品工业科技,2013,34(5):269-274.

[17] 刘志明,张威威,韩小兰,等.从龙葵果中提取食用红色素及色素稳定性的研究[J].国土与自然资源研究,2006(3):

是利用化学或光谱等检测方法获得一系列参数,然后利用一些简单的统计方法进行研究。由于参数较多,采用简单统计方法研究得到的结果必然有较大偏差且人为主观因素较多。随机森林算法利用机器学习的方法建模,通过模型进行预测能够有效的降低人为因素给葡萄酒质量鉴定精度带来偏差。因此,该方法具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 李运,李记明,姜忠军.统计分析在葡萄酒质量评价中的应用[J].酿酒科技,2009,4:79-80.
- [2] 宋于洋,塔依尔,冯建荣.模糊综合评判在葡萄酒品尝中的应用[J].中外葡萄与葡萄酒,2002,2:35-36.
- [3] 刘延玲.新的 Hopfield 神经网络分类器在葡萄酒质量评价中的应用[J].价值工程,2012(2):181-182.
- [4] 徐海涛.改进的近似支持向量机在葡萄酒质量鉴定中的应用[J].安徽农业科学,2010,38(29):16105-16106.
- [5] K R Kennison, K L Wilkinson, A P Pollnitz, *et al.* The effect of smoke application to field-grown Merlot grapevines at key phenological growth stages on wine sensory and chemical properties [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2011, 17(2):5-12.
- [6] 林翠香.基于数据挖掘的葡萄酒质量识别[D].长沙:中南大学,2010.
- [7] 李记明,贺普超,刘玲.优良品种葡萄酒的香气成分研究[J].西北农业大学学报,1998,26(6):6-9.
- [8] 林勃,林舒哗.基于随机森林算法的葡萄酒品质预测方法[J].莆田学院学报,2012,5:88-89.
- [9] L Breiman. Random Forests [J]. *Machine Learning*, 2001, 45(1):5232-5234.
- [10] 叶圣永,王晓茹,刘志刚,等.基于随机森林算法的电力系统暂态稳定性评估[J].西南交通大学学报,2008(10):574-575.
- [11] 方匡南,吴见斌,朱建平,等.随机森林方法综述[J].统计与信息论坛,2011(3):32-35.
- [12] 林成德,彭国兰.随机森林在企业信用评估指标体系确定中应用[J].厦门大学学报:自然科学版,2007(3):200-201.

aspects of solid-state fermentation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1985, 7:258-265.

[19] Z Aksu, A T Eren. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(9):2985-2991.

89-90.

[18] 常亚飞,陈守文,喻子牛.苏云金素发酵培养基的优化设计[J].中国生物防治,2006,22(3):190-194.

[19] 王永菲,王成国.响应面法的理论与应用[J].中央民族大学学报:自然科学版,2005(3):236-240.

[20] 杨文雄,高彦祥.响应面法及其在食品工业中的应用[J].中国食品添加剂,2005(2):68-71.