

遗传算法优化双水相法 提取葡萄皮渣花色苷工艺及其组分分析

许丹妮¹, 杨海玲², 范丽丽^{2,*}, 潘月林³

(1. 广西民族师范学院化学与生物工程学院, 广西崇左 532200;

2. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530001;

3. 崇左市蕙之源健康科技有限责任公司, 广西崇左 532200)

摘要:以葡萄皮渣为原料,采用双水相法提取其中的花色苷并鉴定花色苷组分。在单因素实验的基础上,通过遗传算法优化双水相法提取葡萄皮渣花色苷的工艺;利用高效液相色谱-质谱联用鉴定葡萄皮渣花色苷提取物中花色苷组分。结果表明:双水相法提取葡萄皮渣花色苷的最佳工艺为:乙醇体积分数40%、硫酸铵质量分数26%、pH3.0、料液比1:38 g/mL,在此条件下花色苷得率(3.05 ± 0.07) mg/g。经鉴定发现葡萄皮渣花色苷提取物含有2种花色苷组分,分别为飞燕草-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-葡萄糖苷,其纯度分别为90.16%和92.41%。研究结果为天然花色苷提取提供一种新的提取方式,并为进一步开发花色苷功能性食品提供依据。

关键词:双水相提取,葡萄皮渣,花色苷,工艺,组分

Optimization of Extraction Process and Component Analysis of Anthocyanins from Grape Pomace in Aqueous Two-phase Extraction with Genetic Algorithm

XU Danni¹, YANG Hailing², FAN Lili^{2,*}, PAN Yuelin³

(1. College of Chemical and Biological Engineering, Guangxi Normal University for Nationalities, Chongzuo 532200, China;

2. College of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

3. Chongzuo Huizhiyuan Health Technology Co., Ltd., Chongzuo 532200, China)

Abstract: The anthocyanins were extracted from grape pomace by aqueous two-phase extraction. Genetic algorithm was employed to optimize the extraction process of anthocyanins from grape pomace based on single factor experiment. HPLC-MS was used to identify the anthocyanins components of the extracts from grape pomace obtained under the optimal combination of process parameters. The optimum extracting parameters to achieve the highest the yield of anthocyanins of (3.05 ± 0.07) mg/g from grape pomace by aqueous two-phase method was obtained under an ethanol concentration of 40%, ammonium sulfate mass fraction of 26%, pH of 3.0, solid-to-liquid ratio of 1:38 g/mL. Under these conditions, the yield of anthocyanins was (3.05 ± 0.07) mg/g. The anthocyanins extracts from grape pomace mainly contained two anthocyanins components in terms of delphinium-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside, and their purities were 90.16% and 92.41%, respectively. The results of natural anthocyanins extraction would provide a new way and basis for further development of functional food.

Key words: aqueous two-phase extraction; grape pomace; anthocyanins; process; components

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2021)04-0168-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050279

引文格式: 许丹妮, 杨海玲, 范丽丽, 等. 遗传算法优化双水相法提取葡萄皮渣花色苷工艺及其组分分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 168-174, 193.

XU Danni, YANG Hailing, FAN Lili, et al. Optimization of Extraction Process and Component Analysis of Anthocyanins from Grape Pomace in Aqueous Two-phase Extraction with Genetic Algorithm[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 168-174, 193. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

收稿日期: 2020-05-25

作者简介: 许丹妮(1983-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 药食同源资源的开发与利用, E-mail: 330686394@qq.com.

* 通信作者: 范丽丽(1982-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 中药药效筛选与药膳研究, E-mail: gdh687898@163.com.

基金项目: 2017年度广西壮族自治区中青年教师基础能力提升项目“山黄皮叶、艾叶辅助发酵制作麦酱的现代工艺研究(2017KY0843)”; 2018年度崇左市科技计划项目“民间秘方外用抗菌制剂的现代工艺研究(崇科FA2018018)”。

截至2017年,其在全球范围内的种植葡萄面积达到了760万公顷,其中一半以上的葡萄被用于酿造葡萄酒^[1]。在葡萄酒的酿造过程中会产生大量的葡萄皮渣废物(约占葡萄重量的20%~30%),每年在全球各地的酒厂中产生约900万吨的葡萄皮渣^[2]。而在葡萄皮渣中仍然残留着大量的生活活性物质,其中花色苷的含量十分可观,但在酒厂中,绝大部分葡萄皮渣都以废物的形式被处理掉,增加了企业的成本,同时也是对自然资源的一种浪费,处理不当会造成环境污染。因此,如何利用先进的提取技术从葡萄皮渣中提取花色苷是当前研究的热点。

花色苷作为最重要的活性成分之一,具有抗氧化、抗肿瘤和预防心脑血管疾病等功效^[3]。目前溶剂提取法是花色苷提取的主要方式,该方法操作简单,但效率低、溶剂消耗量大^[4]。为克服溶剂提取的缺陷,一些新的提取方式被提出,如微波辅助提取^[5]、超声辅助提取^[6]、超高压辅助提取^[7]、酶法辅助提取^[8]及超临界CO₂提取^[9]等,但这些方式提取条件苛刻,需要昂贵的设备,无形中增加了企业成本。近年来,双水相提取法作为新的提取分离方式,因操作简单、成本低、溶剂易回收、生物亲和力好、效率高及易于放大生产等优点而备受人们关注,已被广泛应用于食品、化工和制药等领域^[10]。但该技术应用在花色苷提取方面的研究较少,目前关于利用双水相法提取葡萄皮渣花色苷鲜见报道。

鉴于此,本研究利用双水相法提取葡萄皮渣花色苷。通过单因素实验探究乙醇体积分数、硫酸铵质量分数、pH、料液比和提取时间对花色苷得率的影响;然后通过遗传算法优化花色苷的提取工艺;利用高效液相色谱-质谱联用鉴定最优工艺参数组合下获得的葡萄皮渣花色苷提取物中花色苷组分,以期为花色苷进一步开发和综合利用提供重要的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

葡萄皮渣 2019年11月15日收集于广西崇左天等县许氏葡萄园酿酒基地;矢车菊素-3-葡萄糖苷标准品(纯度≥99.5%) 美国诺威公司;乙腈、甲酸、无水乙醇、盐酸、氯化钾、硫酸铵和醋酸钠(均为分析纯) 广州市宏州化工有限公司;AB-8大孔树脂 天津允开树脂科技有限公司。

Agilent 1100 高效液相色谱、Agilent 1290 高效液相色谱-G6500 四级杆飞行时间质谱联用仪 美国Agilent公司;DD-6R 离心机 济南千司生物技术有限公司;R1050 旋转蒸发器 巩义市科瑞仪器有限公司;UV-6300 双光束紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;HWS 电热恒温水浴锅 上海力辰仪器科技有限公司;FA2104 电子分析天平 北京澎昆博远科贸发展有限责任公司;FC-27AS-E 真空冷冻干燥机 河北国辉实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理 葡萄皮渣经挑选、除杂,然后置于真空冷冻干燥机中冻干,过40目筛,密封避光置于-18℃冰箱中备用。

1.2.2 葡萄皮渣花色苷双水相提取 参考Li等^[11]制备乙醇-硫酸铵双水相体系,称取一定量的硫酸铵置于锥形瓶中,加入一定体积的去离子水使其充分溶解,然后用质量浓度1 mol/L HCl调至所需pH,再加入一定比例的乙醇,均匀混合后,静止形成双水相。在前期预实验的基础上,称取5 g葡萄皮渣加入上述形成的双水相体系中,然后置于35℃恒温振荡器中,振荡提取一定时间后,待两相分配达到平衡后,收集上相溶液,并将提取液置于离心机中以7000 r/min离心15 min,取离心后的上清液,将一部分上清液定容于50 mL容量瓶中,测定花色苷得率;另取上清液以2 BV/h流速通过已活化的AB-8大孔树脂柱(2.6 cm×60 cm),上样结束后,依次用蒸馏水、40%、60%、80%酸化乙醇(0.05%醋酸)洗脱,收集60%乙醇洗脱液,将其在35℃旋转蒸发仪减压浓缩、真空冷冻干燥,制得葡萄皮渣花色苷提取物(Anthocyanins extracts from grape skin, AEGS)。

1.2.3 花色苷提取方式对比 分别参考Monrad等^[12]、Liazid等^[5]、Sancho-Galan等^[6]和Dinkova等^[8]方法对花色苷进行溶剂提取、微波提取、超声提取和酶法提取,对比以上4种提取方式及本文的双水相提取对花色苷得率的影响,为提取方式的选择提供依据。

1.2.4 花色苷得率测定 参考于泽源等^[13]的测定方法,测定不同提取条件花色苷得率,由式(1)计算样品中花色苷得率。

$$c = \left\{ \left[(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \text{pH}_{1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \text{pH}_{4.5} \right] \times M_w \times \text{DF} \times 1000 \times V \right\} / (\varepsilon \times l \times m) \quad \text{式(1)}$$

式中:c为花色苷得率,mg/g;A为吸光度;DF为稀释倍数;M_w为矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子质量;ε为矢车菊素-3-葡萄糖苷的消光系数;m为黑加仑果粉的质量,g。

1.2.5 单因素实验 在1.2.3研究结果的基础上,选择双水相法作为提取葡萄皮渣花色苷的方法,操作同1.2.3。以5 g葡萄皮渣为提取对象,研究乙醇体积分数、硫酸铵质量分数、pH、料液比和提取时间5个因素对葡萄皮渣花色苷得率的影响。

乙醇体积分数的影响。固定硫酸铵质量分数为24%、pH为3.0、料液比为1:40 g/mL和提取时间为60 min,研究乙醇体积分数为30%、35%、40%、45%和50%时对花色苷得率的影响。

硫酸铵质量分数的影响。固定乙醇体积分数为40%、pH为3.0、料液比为1:40 g/mL和提取时间为60 min,研究硫酸铵质量分数为20%、22%、24%、26%和28%时对花色苷得率的影响。

pH的影响。固定乙醇体积分数为40%、硫酸铵质量分数为24%、料液比为1:40 g/mL和提取时间为60 min,研究pH为2.0、2.5、3.0、3.5和4.0时对花色苷得率的影响。

料液比的影响。固定乙醇体积分数为40%、硫酸铵质量分数为24%、pH为3.0和提取时间为60 min,研究料液比为1:20、1:30、1:40、1:50和1:60 g/mL时对花色苷得率的影响。

提取时间的影响。固定乙醇体积分数为40%、

硫酸铵质量分数为 24%、pH 为 3.0 和料液比为 1:40 g/mL, 研究提取时间为 20、40、60、80 和 100 min 时对花色苷得率的影响。

1.2.6 响应面法试验 依据单因素实验结果, 选取乙醇体积分数(X_1)、硫酸铵质量分数(X_2)、pH(X_3)和料液比(X_4)为实验因素, 以花色苷得率(Y)为响应值, 进行 4 因素 3 水平的 Box-Behnken 组合实验, 实验因素与水平设计如表 1 所示。

表 1 实验设计因素与水平
Table 1 Experimental design factors and levels

水平	因素			
	X_1 乙醇 体积分数 (%)	X_2 硫酸铵 质量分数 (%)	X_3 pH	X_4 料液比 (g/mL)
-1	35	22	2.5	1:30
0	40	24	3.0	1:40
1	45	26	3.5	1:50

采用响应面分析法得到的二次回归模型如式(2)所示:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i,j=1}^4 b_{ij} X_i X_j \quad \text{式(2)}$$

式中: b_0 为截距回归系数; b_i 为线性回归系数; b_{ii} 为二次项的回归系数; b_{ij} 为交互项的回归系数; X_i 、 X_j 为自变量。

1.2.7 遗传算法设计 依据单因素实验结果, 选取乙醇体积分数、硫酸铵质量分数、pH 和料液比 4 个因素为决策变量, 即:

$$X = X(X_1, X_2, X_3, X_4) \quad \text{式(3)}$$

初始实验点 $\bar{X}(0)$ 作为输入向量, $\bar{X}(t)$ 作为第 t 次迭代时, 求得的花色苷得率取极值时所对应的实验点 X 作为可行点, 然后求 $\bar{X}(t)$ 的梯度, 如式(4)所示:

$$\left. \frac{d\bar{Y}}{d\bar{X}} \right|_{\bar{X} = \bar{X}(t)} \quad t = \in [0, 1, 2, \Lambda] \quad \text{式(4)}$$

如 $\bar{X}(t)$ 满足式(5), 表明迭代终止。

$$\left| \frac{d\bar{Y}}{d\bar{X}} \right|_{\bar{X} = \bar{X}(t)} = 0 \quad t \in [1, 2, 3\Lambda] \quad \text{式(5)}$$

则最优解(输入向量): $\bar{X}^* = \bar{X}(t)$, 对应的 \bar{Y}^* 为最优值, 即为最佳的输出向量。

遗传算法优化的约束条件: 选择各因素水平的上下限, 花色苷得率最优的约束条件如下式所示:

$$\begin{cases} 35\% \leq X_1 \leq 45\% \\ 22\% \leq X_2 \leq 26\% \\ 2.5 \leq X_3 \leq 3.5 \\ 1:30 \leq X_4 \leq 1:50 \end{cases} \quad \text{式(6)}$$

1.2.8 高效液相色谱(HPLC)分析 样品处理: 分别准确称取 1.0 mg 在最优工艺下获得的 AEGS, 用体积分数 0.1% HCl-甲醇溶液将其配制成 0.1 mg/mL 的样品溶液, 用于 HPLC 分析。

色谱条件: Agilent-1100 C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm, 2.6 μ m); 流动相 A 和流动相 B 分别为体积分数 20% 甲酸和乙腈: 水: 甲酸(体积比)为 56.5:40:3.5 组成的体系; 洗脱程序: 15% B(0 min)~40% B

(10 min)~60% B(15 min)~75% B(25 min)~90% B(30 min)~15% B(40 min); 检测波长为 520 nm。依据峰面积归一法计算所得组分的纯度, 如式(7)所示。

$$w_i(\%) = \frac{f_i A_i}{\sum f_i A_i} \quad \text{式(7)}$$

式中: w_i 为待测组分 i 的峰面积百分数; f_i 为校正因子; A_i 为待测组分 i 的峰面积。

1.2.9 液质(HPLC-MS)分析 液质条件参考谭佳琪等^[7]测定超高压提取桑葚花色苷组分条件。

1.3 数据处理

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行显著性分析; 采用 Matlab R2018b 软件优化双水相提取葡萄皮渣花色苷的工艺参数; 采用 Design Expert ver 8.0 软件设计 Box-Behnken 组合实验; 采用 Origin 9.0 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 提取方式的选择

不同提取方式对葡萄皮渣花色苷得率的影响结果如图 1 所示。由图 1 可知, 溶剂提取法所得的花色苷得率显著低于其它四种提取方式($P < 0.05$)。酶法提取所得花色苷得率同样显著低于微波辅助提取、超声辅助提取和双水相提取($P < 0.05$)。分析可能原因是酶在提取过程中容易受外界条件的影响而造成酶活性降低, 从而降低提取效果。微波辅助提取和超声辅助提取所得花色苷得率均显著低于双水相提取($P < 0.05$), 而两者之间无显著差别($P > 0.05$), 分析其原因是两种提取方式均能破坏植物细胞壁, 降低花色苷由内向外的传递阻力, 从而提高花色苷得率。双水相提取法中无机盐和有机相之间的作用力有助于花色苷溶解, 同时增加花色苷在溶剂中的扩散系数, 从而提取花色苷得率。因此, 后续实验采用双水相法提取葡萄皮渣花色苷。

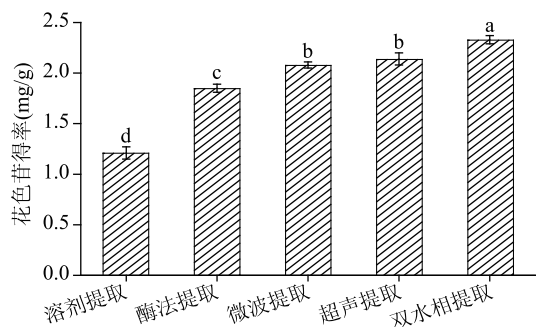


图 1 不同提取方式对葡萄皮渣花色苷得率的影响

Fig.1 Effect of different extraction methods on the yield of anthocyanins from grape pomace

2.2 单因素对葡萄皮渣花色苷得率的影响

双水相法提取葡萄皮渣花色苷的单因素实验, 其结果如图 2 所示。由图 2A 可知, 当乙醇体积分数在 30%~40% 范围内, 花色苷得率随乙醇体积分数增加呈现显著增加的趋势($P < 0.05$), 乙醇体积分数在 40% 时, 花色苷得率取得最大值(2.36 ± 0.07) mg/g。其原因是随乙醇体积分数增加使得上相中的有机相

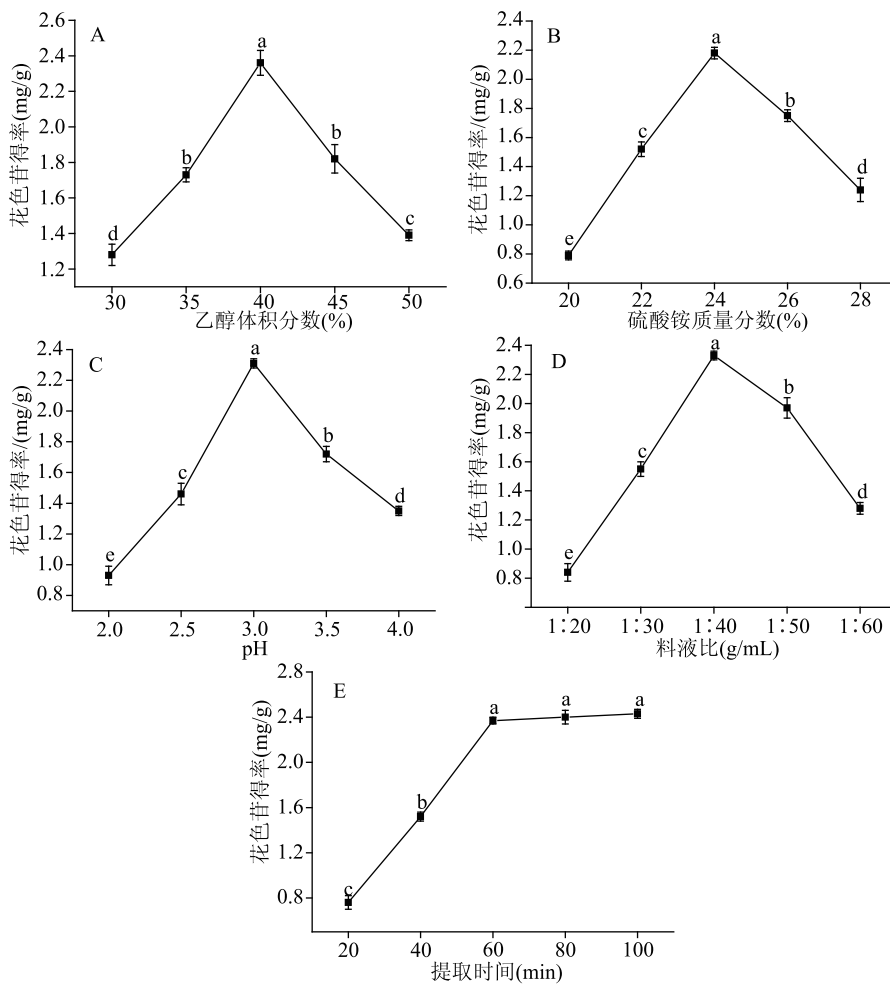


图2 不同实验因素对葡萄皮渣花色苷得率的影响

Fig.2 Effects of different experimental factors on the yield of anthocyanins from grape pomace

注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

增加,萃取能力增加,有助于花色苷的提取^[14]。当乙醇体积分数过高时,上相会溶解醇溶性杂质、色素等,降低花色苷溶解度,导致花色苷得率降低^[15-16]。因此,乙醇体积分数选择在35%、40%、45%三个水平进行组合实验。

由图2B可知,当硫酸铵质量分数在20%~24%范围内,随硫酸铵质量分数增加花色苷得率呈现显著增加的趋势($P < 0.05$)。其原因是随硫酸铵质量分数增加,夺水能力越强,造成上相有机相中水分降低,有机相极性增强,使得花色苷溶解度和扩散系数增加,更易使花色苷由内向外扩散,提高花色苷得率^[17]。但当硫酸铵质量分数超过24%时,花色苷得率随硫酸铵质量分数增加呈现显著降低的趋势($P < 0.05$)。其原因是随硫酸铵质量分数增加上下两相逐步达到饱和状态,随后继续增加硫酸铵质量分数会使上相中的花色苷转移到下相^[18];另外过量的硫酸根离子导致表面张力增加,使得花色苷吸附在两相界面,导致花色苷得率降低^[19]。因此,硫酸铵质量分数选择在22%、24%、26%三个水平进行组合实验。

由图2C可知,当pH在2.0~3.0范围内,花色苷得率随pH增加呈现显著增加的趋势($P < 0.05$),当pH3.0时,花色苷得率取得最大值(2.31 ± 0.03) mg/g。

其原因是在pH为3.0时,花色苷以红色黄盐阳离子形式存在,其结构稳定,提取效果较好^[20]。但当pH超过3.0时,随pH的增加花色苷得率显著降低($P < 0.05$)。其原因是随pH增加花色苷结构发生改变,从而使花色苷得率降低^[21]。因此,pH选择在2.5、3.0、3.5三个水平进行组合实验。

由图2D可知,花色苷得率随料液比增加呈现先显著增加后显著降低的趋势($P < 0.05$),当料液比在1:40 g/mL时,花色苷得率取得最大值(2.33 ± 0.03) mg/g。其原因可能是随料液比增加溶剂渗透并扩散到葡萄皮细胞内,细胞内外浓度梯度逐渐增加,浓度梯度作为花色苷传质动力^[22];另外溶剂在葡萄皮细胞内破坏疏水键,使得花色苷向溶剂中扩散速率增加,有助于花色苷由内向外扩散,增加花色苷得率^[23]。但当料液比继续增加超过1:40 g/mL时,花色苷得率显著降低($P < 0.05$)。这可能是由于固液界面存在传质极限,细胞内外浓度梯度差趋于零,体系已经达到饱和状态,过量溶剂不但稀释花色苷,而且也会给后续花色苷分离纯化增加难度。综上料液比选择在1:30、1:40、1:50 g/mL三个水平进行组合实验。

由图2E可知,花色苷得率随提取时间延长先呈

现显著增加的趋势($P < 0.05$),后呈无显著变化的趋势($P > 0.05$)。其原因是在提取初期,花色苷在较大的浓度梯度下,容易从细胞内扩散的周围溶剂中,使得花色苷得率显著增加。随后进一步延长提取时间,由于上相中花色苷浓度与葡萄皮细胞中花色苷浓度趋于一致,提取液中花色苷达到饱和状态,故进一步延长提取时间对花色苷得率无显著影响^[24]。因此提取时间确定为 60 min,后续不再进行优化提取时间。

2.3 响应曲面法试验结果

2.3.1 模型建立与显著性检验 通过遗传算法优化双水相法提取葡萄皮渣花色苷最佳工艺条件,所得的实验方案和结果见表 2。以花色苷得率(Y)为响应值,对实验所得的数据进行多元回归拟合分析,得到葡萄皮渣花色苷得率对乙醇体积分数(X_1)、硫酸铵质量分数(X_2)、pH(X_3)和料液比(X_4)的回归模型如式(8)所示。

表 2 响应曲面法实验设计及结果
Table 2 Experimental design and results
of response surface methodology

编号	X_1	X_2	X_3	X_4	花色苷得率 (mg/g)
1	-1	-1	0	0	1.89
2	1	-1	0	0	1.88
3	-1	1	0	0	2.77
4	1	1	0	0	2.79
5	0	0	-1	-1	1.81
6	0	0	1	-1	2.52
7	0	0	-1	1	1.86
8	0	0	1	1	1.81
9	-1	0	0	-1	2.10
10	1	0	0	-1	1.99
11	-1	0	0	1	1.82
12	1	0	0	1	1.79
13	0	-1	-1	0	1.99
14	0	1	-1	0	2.69
15	0	-1	1	0	2.03
16	0	1	1	0	2.81
17	-1	0	-1	0	1.85
18	1	0	-1	0	2.24
19	-1	0	1	0	2.28
20	1	0	1	0	1.86
21	0	-1	0	-1	1.80
22	0	1	0	-1	2.75
23	0	-1	0	1	1.81
24	0	1	0	1	2.54
25	0	0	0	0	2.80
26	0	0	0	0	2.79
27	0	0	0	0	2.79
28	0	0	0	0	2.80
29	0	0	0	0	2.69

$$Y = 2.77 + 0.41X_2 + 0.072X_3 - 0.11X_4 - 0.38X_1^2 -$$

$$0.32X_2^2 - 0.47X_4^2 - 0.20X_1X_3 - 0.19X_3X_4 \quad \text{式(8)}$$

对回归方程系数进行显著性检验,结果如表 3 所示。

为验证式(8)的可靠性及各实验因素对花色苷得率的影响程度,对表 2 中的数据分析,其结果如表 3 所示。由表 3 可知,数学模型中 F 值为 46.67, P 值小于 0.0001,决定系数 R^2 为 0.9790,结果表明经响应面建立的数学模型极显著;此外该模型的失拟项 P 值为 0.0864,结果表明所得实验数据与模型拟合较好。采用 F 值大小评价实验因素对响应值的影响程度, F 值大小与因素对响应值的影响程度呈正相关。由表 3 知, $F(X_1) = 0.29$ 、 $F(X_2) = 274.17$ 、 $F(X_3) = 8.24$ 和 $F(X_4) = 20.61$,即各因素对花色苷得率的影响顺序为硫酸铵质量分数(X_2) > 料液比(X_4) > pH(X_3) > 乙醇体积分数(X_1),且料液比和硫酸铵质量分数对花色苷得率的影响达到极显著水平。

响应曲面的坡度陡峭程度能反应实验因素对响应值影响的强弱,响应曲面相对平缓,说明实验因素对响应值影响作用较小;响应曲面越陡峭,说明实验因素对响应值影响作用越大。

利用等高线图来判断因素交互作用对响应值的影响程度是否显著。当等高线图形为椭圆时,表示因素交互作用显著影响响应值变化;当等高线图形为圆形时,表示因素交互作用对响应值变化无显著影响^[25]。图 3 反应各实验因素交互作用对花色苷得率的影响。

由表 3 方差分析结果可知, X_1X_2 、 X_1X_4 、 X_2X_3 和 X_2X_4 的交互作用均对花色苷得率无显著影响($P > 0.05$),故在此不做分析。 X_1X_3 和 X_2X_4 的交互作用均能极显著影响花色苷得率($P < 0.001$)。由图 3a 可知,花色苷得率均随 pH 和乙醇体积分数增加呈现先增加后降低的趋势,花色苷在中心点时能取得最大值。由图 3c 可知,随 pH 和料液比增加花色苷得率呈现先增加后降低的趋势,花色苷在中心点时能取得最大值。由图 3b 和图 3d 的等高线图可以看出, X_1X_3 和 X_2X_4 交互作用的等高线图均呈现椭圆。表明上述实验因素之间的交互作用均显著影响花色苷得率,该结果与方差分析的结果一致。

2.3.2 双水相法提取葡萄皮渣花色苷的工艺参数优化 利用 Matlab R2018b 软件中的遗传算法优化工具箱进行优化双水相提取葡萄皮渣花色苷的工艺,当迭代 86 次时,葡萄皮渣花色苷得率取得最大值,此时乙醇体积分数(X_1)、硫酸铵质量分数(X_2)、pH(X_3)和料液比(X_4)水平编码分别为 -0.0451、1.0000、0.1716、-0.1517,即试验水平分别为 39.77%、26%、3.09 和 1:38.48 g/mL,在此条件下,所得花色苷含量理论值为 3.19 mg/g。遗传算法 M 文件运行结果如图 4 所示。

2.3.3 实验验证 采用遗传算法优化获得双水相法提取葡萄皮渣花色苷工艺参数为:乙醇体积分数 39.77%、硫酸铵质量分数 26%、pH3.09 和料液比 1:38.48 g/mL,花色苷得率理论值 3.19 mg/g。

为验证遗传算法的可靠性,结合实际情况,将上

表3 双水相提取葡萄皮渣花色苷回归模型系数的显著性

Table 3 Significance of regression model coefficient of anthocyanins extracted from grape pomace by aqueous two-phase extraction

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	4.89	14	0.35	46.67	<0.0001 **
X ₁	2.133E-0.003	1	2.133E-0.003	0.29	0.6016
X ₂	2.05	1	2.05	274.17	<0.0001 **
X ₃	0.062	1	0.062	8.24	0.0123 *
X ₄	0.15	1	0.15	20.61	0.0005 **
X ₁ ²	0.95	1	0.95	126.58	<0.0001 **
X ₂ ²	0.034	1	0.034	4.50	0.0523
X ₃ ²	0.67	1	0.67	89.94	<0.0001 **
X ₄ ²	1.41	1	1.41	189.18	<0.0001 **
X ₁ X ₂	2.250E-0.003	1	2.250E-0.003	0.030	0.8648
X ₁ X ₃	0.16	1	0.16	21.94	0.0004 **
X ₁ X ₄	1.600E-0.003	1	1.600E-0.003	0.21	0.6508
X ₂ X ₃	1.600E-0.003	1	1.600E-0.003	0.21	0.6508
X ₂ X ₄	0.011	1	0.011	1.47	0.2447
X ₃ X ₄	0.15	1	0.15	19.82	0.0005 **
残差	0.10	14	7.478E-0.003		
失拟项	0.096	10	9.577E-0.003	4.29	0.0864
误差	8.920E-0.003	4	2.230E-0.003		
总和	4.99	28			

$R^2 = 0.9790$ C.V. = 0.8867

注: * 为差异显著 ($P < 0.05$); ** 为差异极显著 ($P < 0.01$)。

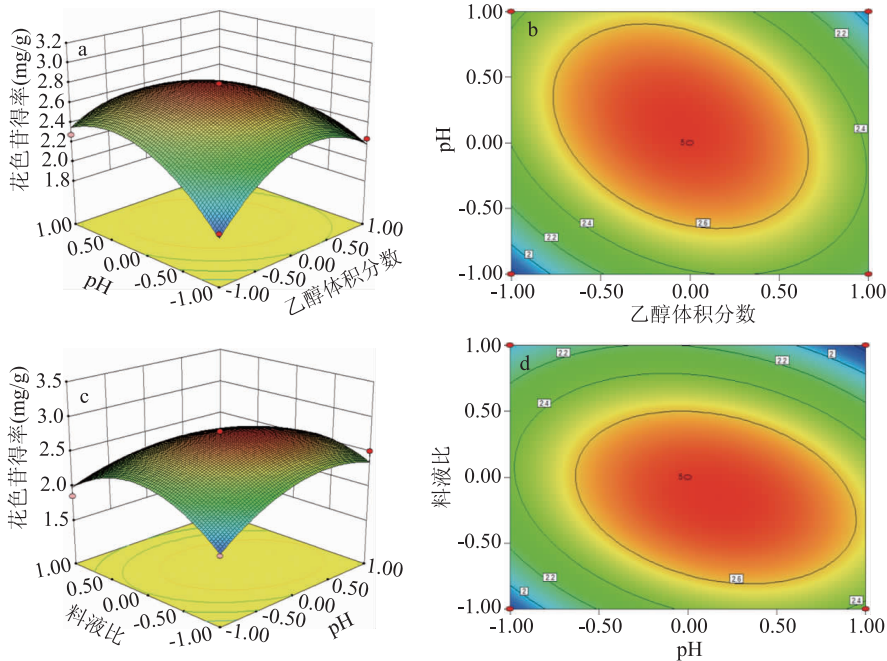


图3 各实验因素交互作用的响应面和等高线图

Fig.3 Response surface and contour plots of interaction of experimental factors

述工艺参数修正为:乙醇体积分数 40%、硫酸铵质量分数 26%、pH3.0 和料液比 1:38 g/mL,在此条件下花色苷得率实验值 (3.05 ± 0.07) mg/g,实验值和理论值的相对误差为 4.39%。进一步证明采用遗传算法优化双水相法提取葡萄皮渣花色苷工艺参数是可行的。

2.4 HPLC 检测分析

采用 HPLC 对 AEGS 中花色苷组分进行检测分

析,其结果如图 5 所示。

由图 5 可知,AEGS 中含有 2 个峰,峰分离效果好,表明 AEGS 中含 2 种花色苷组分(组分 I 和组分 II),组分 I 和组分 II 分别对应图 5 中的 1 号峰和 2 号峰。1 号峰和 2 号峰均无杂峰,表明组分 I 和组分 II 为单一花色苷组分。依据式(7)计算组分 I 和组分 II 的纯度分别为 90.16% 和 92.41%。

表4 葡萄皮渣花色苷种类鉴定结果

Table 4 Identification of anthocyanins in grape pomace

峰号	保留时间 (min)	峰面积	分子离子 [M ⁺](m/z)	分子碎片 (m/z)	丢失碎片 (m/z)	化合物
1	13.72	25.71	465.1	303.1	162	飞燕草素-3-葡萄糖苷
2	22.00	49.36	449.1	287.2	162	矢车菊素-3-葡萄糖苷

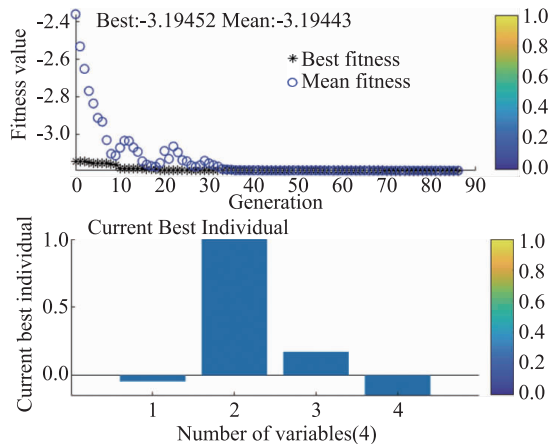


图4 遗传算法优化结果

Fig.4 Results optimized by the genetic algorithm

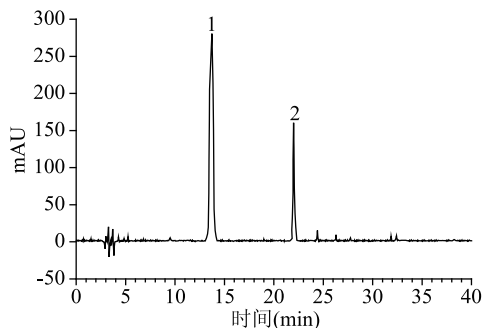


图5 葡萄皮渣花色苷粗提物的 HPLC 色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of crude extracts of anthocyanins from grape pomace

2.5 HPLC-MS 检测分析

为进一步研究花色苷组分,利用 HPLC-MS 对组分 I 和组分 II 进行鉴定。两者的质谱图如图 6 所示。

由表 4 可知,组分 I 的出峰时间为 13.72 min,图 6a 中组分 I 的一级质谱中,其分子离子峰 [M⁺] 为 465.2,同时检测到分子碎片为 m/z 303.3,大量研究已经证实 m/z 303 为飞燕草素的特征离子。丢失碎片为分子离子去除分子碎片所得的值,经计算组分 I 所丢失碎片为 162,分子量 162 可能是失去葡萄糖和半乳糖。该研究结果与薛宏坤等^[26]研究桑葚花色苷和 Nicoue 等^[27]研究野生蓝莓花色苷中的飞燕草-3-葡萄糖苷的质谱信息相一致。因此,组分 I 被鉴定为飞燕草-3-葡萄糖苷。由表 4 可知,组分 II 出峰时间为 22.00 min,图 6b 中组分 II 的一级质谱中,其分子离子峰 [M⁺] 为 449.1,同时检测到分子碎片为 m/z 287.1,大量研究已经证实分子碎片 m/z 287 是矢车菊素的特征离子,经计算组分 II 所丢失碎片也为 162,同组分 I 推测一样,分子量 162 可能是失去

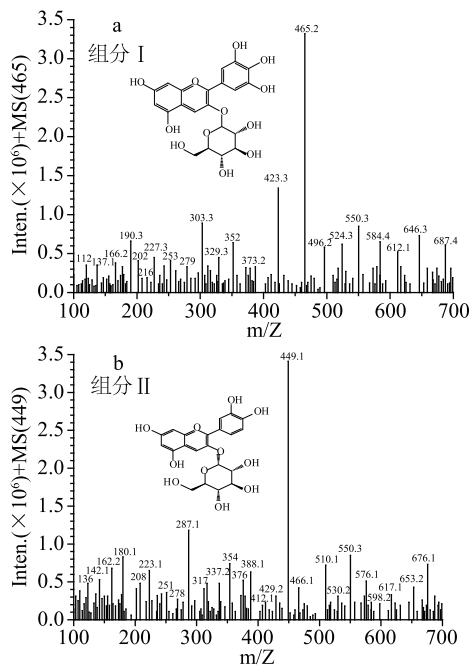


图6 花色苷组分质谱图

Fig.6 Mass spectrogram of anthocyanins components

葡萄糖和半乳糖。Cerezo 等^[28]和 Zhang 等^[29]分别在鉴定卡马罗萨草莓和荔枝果皮中花色苷中矢车菊素-3-葡萄糖苷的质谱信息相一致。因此,组分 II 为矢车菊素-3-葡萄糖苷。

3 结论

本文通过遗传算法优化双水相法提取葡萄皮渣花色苷的工艺,其最优工艺参数为:乙醇体积分数 40%、硫酸铵质量分数 26%、pH3、料液比 1:38 g/mL 和提取时间 60 min,在此条件下花色苷得率(3.05 ± 0.07) mg/g。经鉴定发现葡萄皮渣花色苷提取物含有 2 种花色苷组分,分别为飞燕草-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-葡萄糖苷,其纯度分别为 90.16% 和 92.41%。综上双水相法提取葡萄工业废渣中的花色苷是一种高效、经济、环保的方法,同时为进一步开发和应用花色苷提供较好的物质基础。

参考文献

- [1] Peixoto C M, Dias M I, Alves M J, et al. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties [J]. Food Chemistry, 2018, 253, 132-138.
- [2] Wu Z H, Wu A, Dong J, et al. Grape skin extract improves muscle function and extends lifespan of a drosophila model of parkinson's disease through activation of mitophagy [J]. Experimental Gerontology, 2018, 113, 10-17.
- [3] Viskelis P, Anisimoviene N, Rubinskiene M, et al. Physical

(下转第 193 页)

4636-4644.

[21] 罗俊霞, 赵建波, 刘伟, 等. 农产品质量安全快速检测试剂盒评价方法研究[J]. 农产品质量与安全, 2019, (2): 62-66.
 [22] 李涛, 孙宁宁, 刘海静, 等. 水产品中氯霉素快速检测产品的验证性评价及分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(11): 2596-2601.
 [23] 李菊, 谢建军, 王璐, 等. 基于质量评价的孔雀石绿快检

试剂盒筛选策略[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(3): 875-882.
 [24] 刘欢, 郭萌萌, 李晋成, 等. 免疫胶体金快速检测水产品中孔雀石绿残留的质量分析和评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1675-1682.
 [25] 史海莹, 姜洁, 翟洪杰, 等. 吊白块快检试剂盒分析与评价[J]. 食品科技, 2012, 37(8): 290-292.

(上接第 174 页)

properties, anthocyanins and antioxidant activity of blackcurrant berries of different maturities[J]. Journal of Food Agriculture & Environment, 2010, 8(2): 159-162.
 [4] 王继萍, 柏广新, 李劲然, 等. 溶剂萃取法提取蓝莓中花色苷[J]. 分析化学, 2012, 40(12): 1952-1953.
 [5] Liqid A, Guerrero R F, Cantos E, et al. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins[J]. Food Chemistry, 2011, 124(3): 1238-1243.
 [6] Sancho-galan P, Amores-arrocha A, Jimenez-cantizano A, et al. Ultrasound - assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. 'Tempranillo' winemaking lees[J]. Journal of Grapevine Research, 2019, 58(5): 39-47.
 [7] 谭佳琪, 王瑜, 孙旗, 等. 桑葚花色苷超高压提取工艺优化及其组分分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(21): 152-158.
 [8] Dinkova R, Heffels P, Shikov V, et al. Effect of enzyme - assisted extraction on the chilled storage stability of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) anthocyanins in skin extracts and freshly pressed juices[J]. Food Research International, 2014, 65: 35-41.
 [9] 秦公伟, 韩豪, 丁小维, 等. 蓝莓果渣中花色苷的超临界二氧化碳萃取工艺优化[J]. 应用化工, 2019, 48(1): 109-112, 117.
 [10] Liu X L, Mu T H, Sun H G, et al. Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2013, 141: 3034-3041.
 [11] Li Z G, Teng H, Xiu Z L, et al. Aqueous two - phase extraction of 2,3 - butanediol from fermentation broths using an ethanol/ammonium sulfate system [J]. Process Biochemistry, 2010, 45: 731-737.
 [12] Monrad J K, Howard L R, King J W, et al. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(7), 4014-4021.
 [13] 于泽源, 赵剑辉, 李兴国, 等. 大孔树脂-中压柱层析联用分离纯化蓝莓花色苷[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 118-123.
 [14] Zheng X Z, Xu X W, Liu C H, et al. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions [J]. Separation and Purification Technology, 2013, 104: 17-25.
 [15] Kerio L C, Wachira F N, Wanyoko J K, et al. Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification[J]. Food Chemistry, 2012, 131(1), 31-38.
 [16] Aryanti N, Wardhani D H, Wasi A, et al. Extraction

characteristics of anthocyanin from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces by ultrasound-assisted extraction [J]. Advanced Science Letters, 2017, 23(6): 5626-5628.
 [17] 薛宏坤, 刘成海, 刘钊, 等. 响应面法和遗传算法-神经网络模型优化微波萃取蓝莓中花青素工艺[J]. 食品科学, 2018, 39(16): 280-288.
 [18] 陈姗姗, 王丹, 张超, 等. 紫甘薯花色苷在双水相萃取体系中的分配特性[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 76-79.
 [19] 翟硕, 张海悦, 于润美, 等. 响应面优化双水相提取黑豆皮花色苷工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(24): 24-31.
 [20] 赵慧芳, 王小敏, 阎连飞, 等. 黑莓果实中花色苷的提取和测定方法研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(5): 176-179.
 [21] 李楠, 曾永明, 王国振, 等. 超声辅助酶法提取薰衣草花色苷及其热降解动力学[J]. 食品工业科技, 2020, 41(1): 150-157.
 [22] Bendahou A, Dufresne A, Kaddami H, et al. Isolation and structural characterization of hemicelluloses from palm of *pHoenix dactylifera* l [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(3): 601-608.
 [23] 卢鹏飞, 高志强, 孙敏, 等. 响应面法优化超声波辅助提取黑小麦花色苷的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(4): 69-76.
 [24] 于海鑫, 张秀玲, 高诗涵, 等. 紫苏叶花色苷微波辅助提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业, 2019, 40(10): 51-55.
 [25] Khazaei K M, Jafari S M, Ghorbani M, et al. Optimization of anthocyanin extraction from saffron petals with response surface methodology [J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(7): 1993-2001.
 [26] 薛宏坤, 李鹏程, 钟雪, 等. 高速逆流色谱分离纯化桑葚花色苷及其抗氧化活性[J/OL]. 食品科学: 1-12 [2020-03-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20191209.1629.002.html>.
 [27] Nicoue E E, Savard S, Belkacemi K. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: Extraction and identification[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(14): 5626-5635.
 [28] Cerezo A B, Cuevas E, Winterhalter P, et al. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry [J]. Food Chemistry, 2010, 123(3): 574-582.
 [29] Zhang Z, Xue P, Yang C, et al. Purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp[J]. Food Chemistry, 2004, 84(4): 601-604.