

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80543

洛神花花青素提取工艺优化及性质研究

吕晨鑫 李杨心慧 杨晋一 耿珑瑶 张 振

(锦州医科大学食品与健康学院, 辽宁 锦州 121000)

摘要: [目的] 优化药食同源材料洛神花中花青素的提取工艺, 并对洛神花花青素的变色机理、稳定性和抗氧化性进行研究。[方法] 采用单因素法和响应面法对花青素的提取工艺进行了优化, 调节花青素溶液酸碱度观察花青素的颜色变化并测定其可见光谱, 从 pH 值、光照环境、温度 3 个方面测定花青素稳定性, 通过体外抗氧化试验测定花青素的抗氧化活性。[结果] 洛神花花青素最佳提取工艺条件: 液料比 10:1 (mL/g)、0.1% 盐酸占比 40%、超声时间 30 min、超声温度 60 °C, 此时花青素提取量为 2.982 mg/g。花青素变色试验表明, 不同酸碱度下花青素的颜色变化不同。花青素稳定性试验表明, 在强酸环境下保存率保持在 85% 以上, 紫外光照射下保存率降至 43% 左右, 70 °C 环境中保存率降至 50% 左右。体外抗氧化试验结果表明, 洛神花花青素质量浓度达到 2.25 mg/mL 时, 对 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟自由基的清除率分别达 77.33%, 74.27%, 91.20%。[结论] 超声辅助酸化法提取洛神花花青素可提高花青素提取率。洛神花花青素具有较强的抗氧化活性且适宜在低温、避光的酸性条件下保存和使用。

关键词: 洛神花; 花青素; 酸化法处理; 超声波辅助提取; 稳定性; 抗氧化活性

Optimisation of the extraction process of anthocyanins from roselle and study of their properties

LU Chenxin LI Yangxinhui YANG Jinyi GENG Longyao ZHANG Zhen

(College of Food and Health, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to optimize the extraction process of anthocyanins from Roselle, a medicinal and food plant, and investigate the discolouration mechanism, stability and antioxidant properties of the extracted anthocyanins. [Methods] The extraction process of was optimized using single-factor approach and response surface methodology, the pH of anthocyanin solution was adjusted to observe color changes and to determine the visible spectra. Stability was assessed in terms of pH, light exposure, and temperature. *In vitro* antioxidant activity was measured through various antioxidant assays. [Results] The optimal extraction conditions for anthocyanins from roselle: liquid to material ratio of 10:1 (mL/g), 0.1% hydrochloric acid as 40%, ultrasonication time of 30 min, and ultrasonication temperature of 60 °C, at which time the anthocyanin extraction was 2.982 mg/g. Anthocyanin discolouration experiments showed different colour changes of anthocyanins at different pH levels. Anthocyanin stability experiments showed that the preservation rate remained above 85% in a strong acid environment, decreased to about 43% under UV irradiation, and decreased to about 50% in a 70 °C environment. *In vitro* antioxidant assays demonstrated that anthocyanins from roselle exhibited significant scavenging activity, with DPPH radicals, ABTS radicals, and hydroxyl radicals reached 77.33%, 74.27%, and 91.20%, respectively, at a concentration of 2.25 mg/mL. [Conclusion] Ultrasound-assisted acidification method extraction of anthocyanins from roselle improves the anthocyanin extraction rate. Anthocyanins from Roselle have strong antioxidant activity and are suitable for storage and use under acidic conditions at low temperatures and protected from light.

Keywords: roselle; anthocyanins; acidification tackle; ultrasound-assisted extraction; stability; antioxidant activity

洛神花 (*Hibiscus sabdariffa* L.), 又称玫瑰茄、红角 具有较高的营养价值^[2]和药用价值^[3]。2023 年, 国家卫生 葵、山茄, 为锦葵科、木槿属一年生或多年生草本植物^[1], 健康委员会和国家市场监督管理总局印发的药食同源物

基金项目: 辽宁省自然科学基金计划项目(博士启动)(编号: 2023-BS-200); 锦州医科大学横向课题(编号: H2023014); 辽宁省教育厅 基本科研项目(重点项目)(编号: LJKZ0802)

通信作者: 张振(1983—), 男, 锦州医科大学副教授, 博士。E-mail: zhangzhen8849@163.com

收稿日期: 2024-06-12 **改回日期:** 2024-11-01

质目录管理规定中明确洛神花为药食同源物质^[4]。

花青素是一种普遍存在于花卉、果蔬及谷类中的多酚类黄酮化合物。洛神花花青素主要集中在洛神花花萼中,其主要成分为飞燕草素-3-*O*-半乳糖苷、矢车菊素-3-*O*-半乳糖苷、飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷、矢车菊素-3-桑布双糖苷与飞燕草素-3-桑布双糖苷^[5]。近年关于洛神花花青素的研究主要围绕在提取工艺、贮藏及利用方式等方面^[6]。

研究拟对超声辅助酸法提取洛神花花青素的工艺进行优化,并对洛神花花青素的颜色变化、稳定性和抗氧化性进行研究,以期洛神花花青素的深入开发和应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

洛神花花萼(鲜样):市售,产地福建;

乙醇(95%):分析纯,生工生物工程(上海)股份有限公司;

盐酸:分析纯,南京化学试剂股份有限公司;

氢氧化钠:分析纯,武汉吉鑫益邦生物科技有限公司;

邻苯二甲酸氢钾、混合磷酸盐:分析纯,上海力辰邦西仪器科技有限公司;

硼酸:分析纯,上海浦春计量仪器有限公司;

抗坏血酸(V_c):分析纯,广州佳途科技股份有限公司;

ABTS 自由基测定试剂盒、羟自由基测定试剂盒:北京百奥莱博科技有限公司;

DPPH 自由基清除能力检测试剂盒:翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

恒温水浴锅:TC-550SD-115型,美国Brookfield公司;

鼓风干燥箱:DHG-9030型,上海一恒科学仪器有限公司;

超声萃取器:JP300型,武汉嘉鹏电子有限公司;

旋转蒸发器:STRIKE 20型,英国Asynt公司;

紫外可见近红外分光光度计:UV-3600i Plus型,岛津企业管理(中国)有限公司;

真空冷冻干燥机:GIPP-03FDA型,上海继谱电子科技有限公司;

多功能酶标仪:Infinite 200 PRO型,帝肯(上海)实验器材有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理 参考陈柯君等^[7]的方法,修改如下:在烘箱中将洛神花花萼于60℃干燥至恒重,用超微粉碎机粉碎,过100目筛去除粗颗粒物并装入塑料袋中,避光

密封保存备用。

1.3.2 洛神花花青素提取 准确称取2g洛神花粉放入锥形瓶中,加入95%的乙醇溶液以及0.1 mol/L的盐酸,200 r/min搅拌15 min,然后将其置于超声波萃取器中,以160 W的功率在特定温度下进行一段时间的提取,过滤,提取液置于锥形瓶中于常温条件下贮藏备用。

1.3.3 花青素提取量的计算 参考王钊等^[8]的方法。准确量取过滤完的花青素提取液2.5 mL放入试管中,定容至25 mL,测定其在535 nm下的吸光度值,按式(1)计算洛神花粉中花青素提取量。

$$Y = \frac{A_{535 \text{ nm}} \times V \times N}{98.2 \times M}, \quad (1)$$

式中:

Y ——花青素提取量,mg/g;

$A_{535 \text{ nm}}$ ——花青素在535 nm处的吸光度;

V ——花青素溶液定容体积,mL;

N ——稀释倍数;

98.2——花青素在535 nm处的平均消光系数;

M ——洛神花粉质量,g。

1.3.4 单因素试验

(1) 液料比对花青素提取量的影响:固定0.1%盐酸占比为40%、超声时间为30 min、超声温度为60℃,液料比分别设置为5:1,10:1,15:1,20:1,25:1(mL/g),研究液料比对洛神花花青素提取含量的影响。

(2) 0.1%盐酸占比对花青素提取量的影响:固定液料比为10:1(mL/g)、超声温度为60℃、超声时间为30 min,0.1%盐酸占比分别设置为10%,20%,30%,40%,50%,研究0.1%盐酸占比对洛神花花青素提取含量的影响。

(3) 超声时间对花青素提取量的影响:固定液料比为10:1(mL/g)、超声温度为60℃、0.1%盐酸占比为40%,超声时间分别设置为15,30,60,90,120 min,研究超声时间对洛神花花青素提取含量的影响。

(4) 超声温度对花青素提取量的影响:固定液料比为10:1(mL/g)、超声时间为30 min、0.1%盐酸占比为40%,超声温度分别设置为40,50,60,70,80℃,研究超声温度对洛神花花青素提取含量的影响。

每个试验设计3组平行。

1.3.5 Box-Behnken试验设计 对比单因素试验结果,分别以超声时间、超声温度、液料比和0.1%盐酸占比为自变量及参数范围,以洛神花花青素提取量为响应值,采用Box-Behnken组合试验设计原理设计试验。

1.3.6 洛神花花青素在不同pH值下的颜色变化及可见光谱分析 参考邹小波等^[9]的方法,修改如下:利用酶标仪测定洛神花花青素在pH 1~12范围内的可见光谱,扫描范围为400~800 nm,并用相机记录不同pH下花青素的颜

色变化。

1.3.7 洛神花花青素稳定性分析

(1) pH 值对花青素稳定性的影响:参考马孟佳等^[10]的方法,修改如下:取 6 份洛神花花青素提取液 2 mL,分别用蒸馏水定容至 10 mL,并用稀盐酸和氢氧化钠调节其 pH 值为 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,避光处静置 1 h。用紫外可见分光光度计于 535 nm 处测定洛神花花青素提取液的吸光度值,计算花青素的提取量并按式(2)计算其保存率,每组样品各平行测定 3 次。

$$R = \frac{Y_1}{Y_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R——花青素保存率,%;

Y_1 ——在一定条件处理后溶液中花青素提取量,mg/g;

Y_0 ——初始时刻溶液中花青素提取量,mg/g。

(2) 光照对花青素稳定性的影响:参考 Ren 等^[11]的方法,修改如下:取 4 份洛神花花青素提取液 2 mL,分别用蒸馏水定容至 10 mL,并于室外强光直射环境、室内自然光环境、紫外光环境、避光环境中静置 1 h。用紫外可见分光光度计于 535 nm 处测定洛神花花青素提取液的吸光度值,计算花青素的提取量并按式(2)计算其保存率,每组样品各平行测定 3 次。

(3) 温度对花青素稳定性的影响:参考孙茂成等^[12]的方法,修改如下:取 8 份洛神花花青素提取液 2 mL,分别用蒸馏水定容至 10 mL,并于 0,10,20,30,40,50,60,70 °C 环境下恒温避光静置 1 h。用紫外可见分光光度计于 535 nm 处测定洛神花花青素提取液的吸光度值,计算花青素的提取量并按式(2)计算其保存率,每组样品各平行测定 3 次。

1.3.8 洛神花花青素抗氧化活性分析

(1) DPPH 自由基清除能力:参考杨红等^[13]的方法,修改如下:将洛神花花青素分别稀释成质量浓度为 1.00,1.25,1.50,1.75,2.00,2.25 mg/mL 的花青素溶液。分别取 2 mL 不同质量浓度的洛神花花青素溶液和 V_c 溶液各加入 0.2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液 2 mL,充分振荡后,在无光直接照射的环境下放置 25 min。以 V_c 为阳性对照,用紫外可见分光光度计于 517 nm 处测定吸光度,每组试验平行测定 3 次。按式(3)计算 DPPH 自由基清除率。

$$C_1 = \left(1 - \frac{A - A_1}{A_0} \right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

C_1 ——自由基清除率,%;

A——加入样品溶液后的吸光值;

A_0 ——空白的吸光值;

A_1 ——未进样时检测器的信号值。

(2) ABTS 自由基清除能力:参考 Sarker 等^[14]的方法,修改如下:将 50 mL 2 mmol/L 的 ABTS 溶液与 200 mL 70 mmol/L 的 $K_2S_2O_8$ 溶液混合,在 4 °C 下放置 12 h,用无水乙醇稀释,使稀释后的混合溶液在 734 nm 处的吸光值为 0.68~0.72。分别取质量浓度为 1.00,1.25,1.50,1.75,2.00,2.25 mg/mL 的洛神花花青素溶液和 V_c 溶液各 0.1 mL,加入 1.9 mL 的 ABTS 自由基溶液,混合均匀后避光静置 10 min,以 V_c 为阳性对照,用紫外可见分光光度计于 734 nm 处测定吸光度,每组试验平行测定 3 次。按式(3)计算 ABTS 自由基清除率。

(3) 羟自由基清除能力:参考杭书扬等^[15]的方法,修改如下:分别吸取 2 mL 不同质量浓度(1.00,1.25,1.50,1.75,2.00,2.25 mg/mL)的洛神花花青素溶液,加入 1 mL 9 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液和 2 mL 9 mmol/L 的 H_2O_2 溶液,混匀,避光静置 10 min,再加入 2 mL 9 mmol/L 的水杨酸乙醇溶液,充分振荡后,在无光直接照射的环境下放置 30 min,以 V_c 为阳性对照,用紫外可见分光光度计于 526 nm 处测定吸光值,每组试验平行测定 3 次。按式(3)计算羟自由基清除率。

1.3.9 花青素的浓缩与贮藏 参考 Lin 等^[16]的方法,修改如下:洛神花花青素提取液于 50 °C 下避光旋转蒸发至浓缩液恒重。打开制冷机待冷阱温度降至 -40 °C 时,将花青素浓缩液置于冷阱中预冻 3 h,然后在压力值 15 Pa、冷阱温度 -60 °C 的条件下干燥 48 h,取干燥物研磨成粉。

1.3.10 数据处理 采用 Design Expert 13 进行 Box-Behnken 试验分析。采用 Excel 2016 软件处理数据,IBM SPSS Statistics 22 进行差异显著性分析。采用 Origin 2023 软件制图。采用 ChemDraw 23 软件绘制分子结构图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 液料比对洛神花花青素提取量的影响 图 1 结果表明,液料比为 5:1~10:1 (mL/g) 时,洛神花花青素提取量随提取溶剂用量的增大而升高;液料比为 10:1~15:1 (mL/g) 时,洛神花花青素含量呈下降趋势。导致这种趋势的原因可能是:提取剂添加量太少时,瓶底有部分洛神花粉末结块堆积,溶剂与物料的接触面积有限,导致洛神花花青素无法全部溶出;当提取溶剂添加到一定比例后,扩大了反应体系中提取溶剂与物料的接触面积,溶剂可以充分、匀速地进入植物细胞中^[17],促使洛神花花青素不断溶出;继续增加溶剂,会使其他可溶性物质溶出量增加^[18],导致花青素提取量下降。综合成本等因素考虑,选取液料比 5:1,10:1,15:1 (mL/g) 进行下一步优化试验。

2.1.2 0.1% 盐酸占比对洛神花花青素提取量的影响 图 2 结果表明,提取液中 0.1% 盐酸占比为 10%~40% 时,洛神

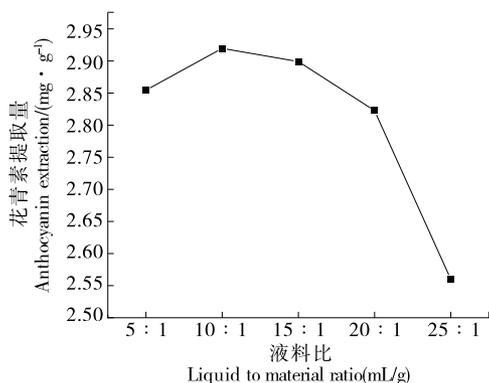


图1 液料比对洛神花花青素提取量的影响

Figure 1 Influence of extraction solvents and materials specific value on anthocyanin from roselle extraction capacity

花花青素提取量不断升高,在40%时达到最大值,为2.971 0 mg/g。提取液中0.1%盐酸占比为40%~50%时,洛神花花青素提取量呈缓慢下降趋势。导致这种趋势的原因可能是:添加0.1%盐酸溶液量太少,对乙醇的酸化不够,不利于洛神花花青素的溶出;0.1%盐酸添加量过大,会使提取环境过度酸化,导致花青素的结构遭到破坏,使花青素提取量降低^[19]。因此,选取0.1%盐酸占比30%,40%,50%进行下一步优化试验。

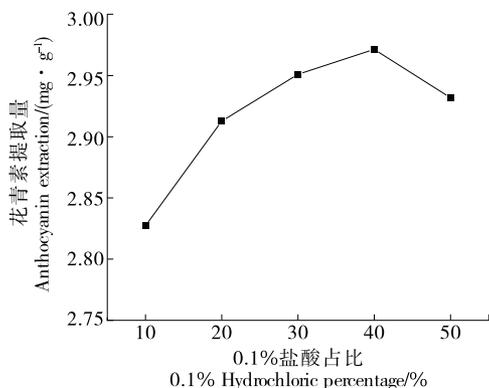


图2 0.1%盐酸占比对洛神花花青素提取量的影响

Figure 2 Influence of 0.1% hydrochloric percentage on anthocyanin from roselle extraction capacity

2.1.3 超声时间对洛神花花青素提取量的影响 图3结果表明,超声时间为15~30 min时,洛神花花青素的提取量随超声波处理时间的延长而升高;在30 min时,洛神花花青素提取量达到最高,为2.874 2 mg/g;之后,随着超声波处理时间的延长,洛神花花青素的提取量逐渐减少。导致这种趋势的原因可能是:超声波能破坏洛神花花萼细胞的细胞壁,使细胞中花青素成分溶出至提取液中^[20],因而洛神花花青素溶出量会先随超声波处理时间的延长

而升高,但当超声波处理达到一定时间后,过度的处理会破坏洛神花花青素原本结构的稳定性。因此,选取超声时间15,30,45 min进行下一步优化试验。

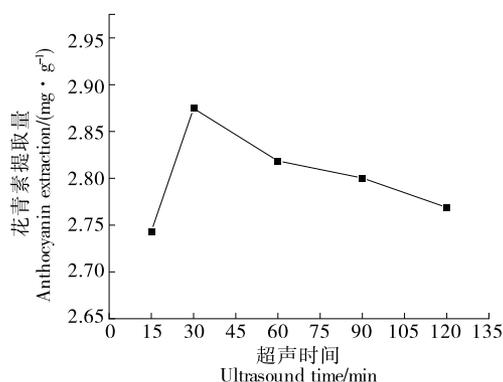


图3 超声时间对洛神花花青素提取量的影响

Figure 3 Influence of ultrasound time on anthocyanin from roselle extraction capacity

2.1.4 超声温度对洛神花花青素提取量的影响 图4结果表明,超声温度为40~60℃时,洛神花花青素提取量随温度的升高而升高;在60℃时,洛神花花青素提取量达到最大值,为2.893 3 mg/g;之后,洛神花花青素提取量缓慢下降。导致这种趋势的原因可能是:提取温度太低,花青素不能全部溶出,而在到达一定的温度后,洛神花花青素就会充分溶出,而温度过高又会使花青素降解^[21],导致花青素提取量下降。因此,选取超声温度50,60,70℃进行下一步优化试验。

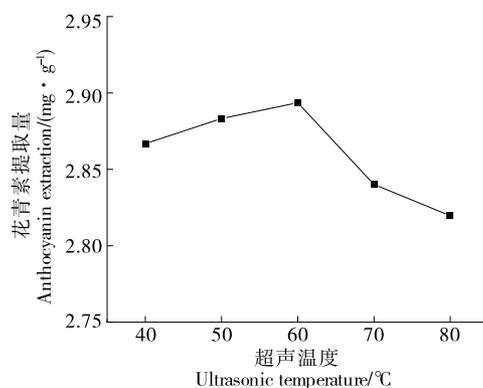


图4 超声温度对洛神花花青素提取量的影响

Figure 4 Influence of ultrasound temperature on anthocyanin from roselle extraction capacity

2.2 响应面实验

2.2.1 模型建立 响应面实验因素水平及结果分别见表1和表2。根据实际测定数值进行回归拟合,得到以花青素提取量为响应值的回归方程:

表 1 响应面试验因素水平

Table 1 Response surface factor test level

水平	A 超声时间/ min	B 超声温度/ ℃	C 液料比 (mL/g)	D 0.1% 盐酸 占比/%
-1	15	50	5:1	30
0	30	60	10:1	40
1	45	70	15:1	50

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Response surface optimisation of extraction rate experimental design and results

试验号	A	B	C	D	花青素提取量/ (mg·g ⁻¹)
1	-1	-1	0	0	2.671±0.036
2	1	-1	0	0	2.822±0.027
3	-1	1	0	0	2.704±0.031
4	1	1	0	0	2.699±0.039
5	0	0	-1	-1	2.617±0.015
6	0	0	1	-1	2.785±0.023
7	0	0	-1	1	2.575±0.041
8	0	0	1	1	2.592±0.034
9	-1	0	0	-1	2.781±0.053
10	1	0	0	-1	2.802±0.016
11	-1	0	0	1	2.530±0.039
12	1	0	0	1	2.669±0.032
13	0	-1	-1	0	2.786±0.017
14	0	1	-1	0	2.583±0.035
15	0	-1	1	0	2.658±0.043
16	0	1	1	0	2.746±0.028
17	-1	0	-1	0	2.633±0.055
18	1	0	-1	0	2.722±0.049
19	-1	0	1	0	2.695±0.031
20	1	0	1	0	2.818±0.018
21	0	-1	0	-1	2.865±0.037
22	0	1	0	-1	2.716±0.059
23	0	-1	0	1	2.631±0.046
24	0	1	0	1	2.643±0.041
25	0	0	0	0	2.918±0.033
26	0	0	0	0	2.954±0.047
27	0	0	0	0	2.903±0.018
28	0	0	0	0	2.971±0.021
29	0	0	0	0	2.984±0.029

$$Y=2.95+0.043A-0.028B+0.031C-0.077D-0.039AB+0.0085AC+0.03AD+0.073BC+0.04BD-0.038CD-0.1A^2-0.11B^2-0.14C^2-0.14D^2. \quad (4)$$

由表 3 可知,模型达到了极显著水平($P<0.0001$),且失拟项不显著($P=0.5790>0.05$),说明模型拟合程度较好。模型的 F 值为 26.87,模型的修正系数 $R_{Adj}^2=0.9282$,

相关系数 $R^2=0.9641$,表明该模型可以解释 96.41% 的响应值且试验误差小,具有较好的拟合精度和较高的可信度,能较好地指导洛神花花青素提取工艺的优化。

表 3 花青素提取量模型及回归系数的回归分析结果[†]

Table 3 Results of regression analyses of anthocyanin extraction models and regression coefficients

来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.430	14	0.031	26.87	<0.0001	**
A	0.022	1	0.022	19.68	0.0006	**
B	0.010	1	0.010	8.58	0.0110	*
C	0.012	1	0.012	10.48	0.0060	**
D	0.071	1	0.071	62.89	<0.0001	**
AB	0.006	1	0.006	5.35	0.0364	*
AC	0.003	1	0.003	0.25	0.6219	
AD	0.004	1	0.004	3.06	0.1019	
BC	0.021	1	0.021	18.63	0.0007	**
BD	0.006	1	0.006	5.70	0.0316	*
CD	0.006	1	0.006	5.02	0.0418	*
A ²	0.068	1	0.068	59.83	<0.0001	**
B ²	0.072	1	0.072	63.09	<0.0001	**
C ²	0.140	1	0.140	119.00	<0.0001	**
D ²	0.140	1	0.140	119.82	<0.0001	**
残差	0.016	14	0.001			
失拟项	0.011	10	0.001	0.94	0.5790	
纯误差	0.005	4	0.001			
总和	0.440	28				

[†] $P<0.01$ 为极显著,用**表示; $P<0.05$ 为显著,用*表示; $R^2=0.9641$; $R_{Adj}^2=0.9282$; $R_{Pre}^2=0.8384$ 。

由表 3 还可以看出,各因素对洛神花花青素含量的影响依次为 0.1% 盐酸占比>超声时间>液料比>超声温度,其中一次项 A、C、D 为极显著因素($P<0.01$),一次项 B 为显著因素($P<0.05$);二次项 A²、B²、C²、D²均为极显著因素($P<0.01$),二次项影响大小为 D²>C²>B²>A²;交互项 BC 为极显著因素($P<0.01$),AB、BD、CD 为显著因素($P<0.05$),交互项影响大小为 BC>BD>AB>CD>AD>AC。

2.2.2 响应面曲线分析 由图 5~图 10 可知,响应曲面的陡度次序为 BC>BD>AB>CD>AD>AC;BC 的等高线图为完整椭圆形且密集,说明超声温度和液料比的相互作用强,且对响应值花青素提取量的影响极显著,与方差分析结果一致。

2.2.3 验证实验 利用响应面软件对回归方程以及响应面图和等高线图进行分析可以得到洛神花花青素最佳提

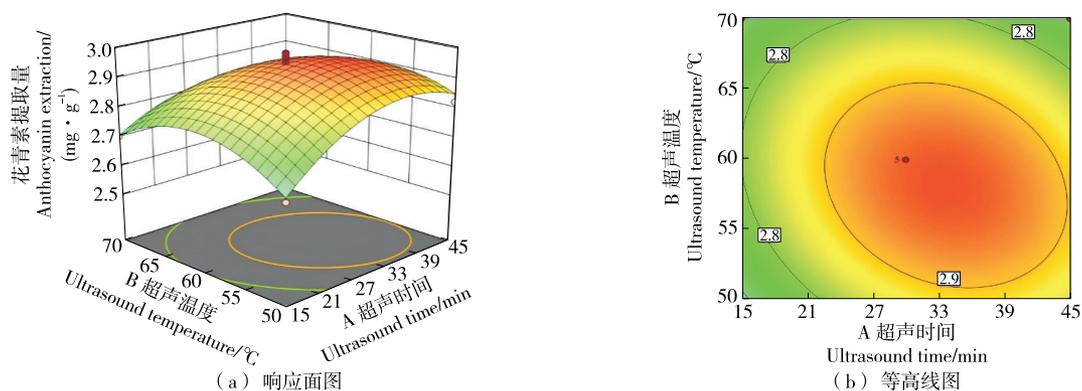


图5 超声时间和超声温度对花青素提取量影响的响应面图及等高线图

Figure 5 Response surface plots and contour plots of the effect of sonication time and sonication temperature on anthocyanin extraction

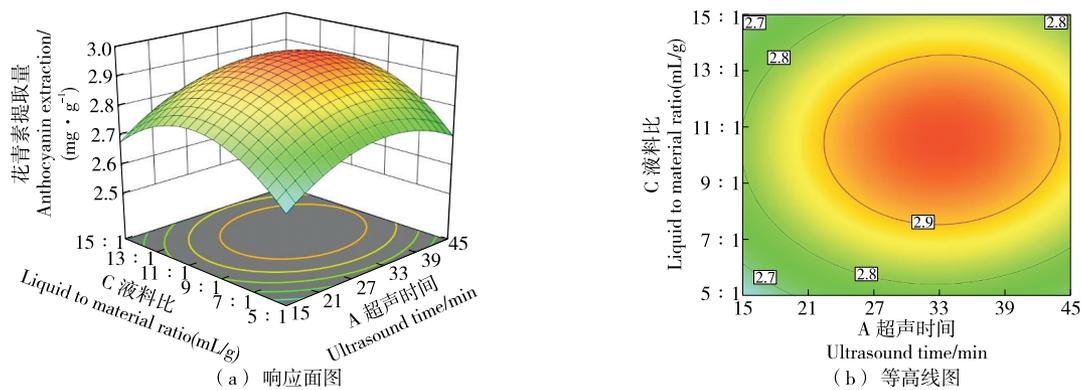


图6 超声时间和液料比对洛神花花青素提取量影响的响应面图及等高线图

Figure 6 Response surface plots and contour plots of the influence of sonication time and liquid/material ratio on anthocyanin extraction

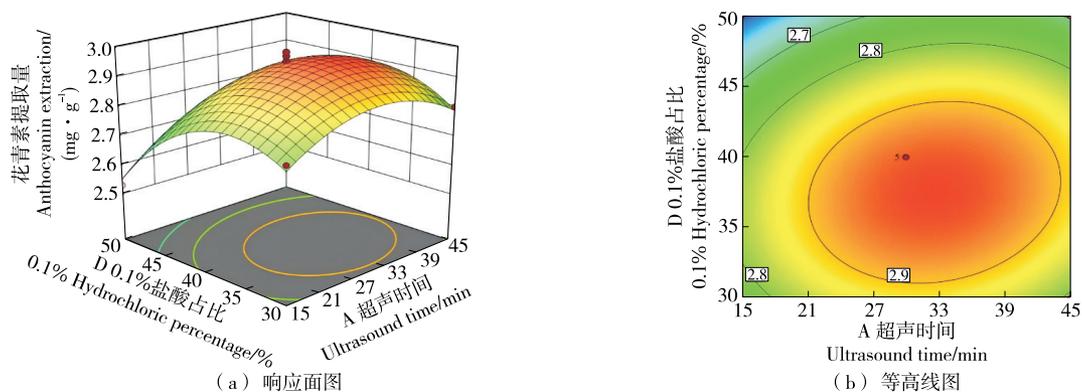


图7 超声时间和0.1%盐酸占比对花青素提取量影响的响应面图及等高线图

Figure 7 Response surface plots and contour plots of the effect of sonication time and 0.1% hydrochloric percentage on anthocyanin extraction

取工艺参数为提取时间 33.159 min, 提取温度 58.072 °C, 液料比 10.522:1 (mL/g), 0.1% 盐酸占比 37.150%, 花青素提取量预测值为 2.966 mg/g。为方便操作将其修正为提取时间 30 min, 提取温度 60 °C, 液料比 10:1 (mL/g), 0.1%

盐酸占比为 40%, 并在此基础上进行 3 次平行验证实验, 实际洛神花花青素提取含量平均值为 2.982 mg/g, 与预测值接近, 说明该模型可以较好地模拟和预测洛神花花青素提取工艺。

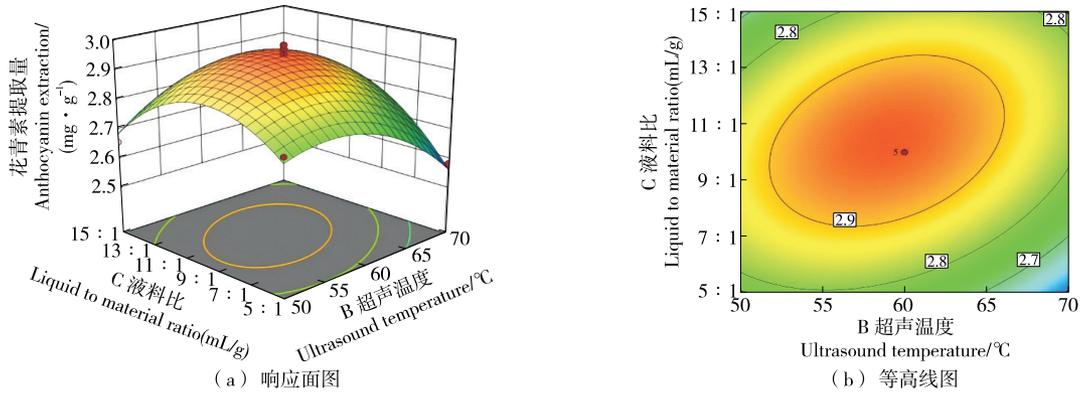


图 8 超声温度和液料比对花青素提取量影响的响应面图及等高线图

Figure 8 Response surface plots and contour plots of the effect of ultrasonication temperature and liquid/ material ratio on anthocyanin extraction

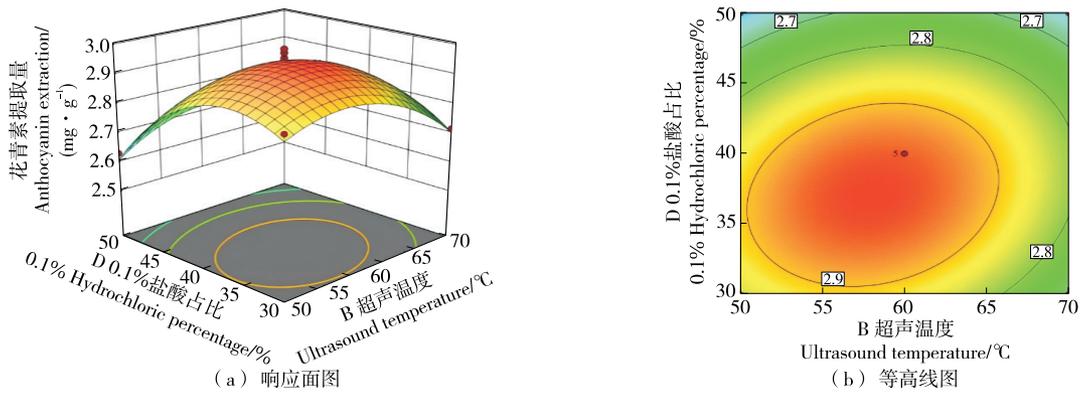


图 9 超声温度和 0.1% 盐酸占比对花青素提取量影响的响应面图及等高线图

Figure 9 Response surface and contour plots of the effect of ultrasound temperature and 0.1% hydrochloric percentage on anthocyanin extraction

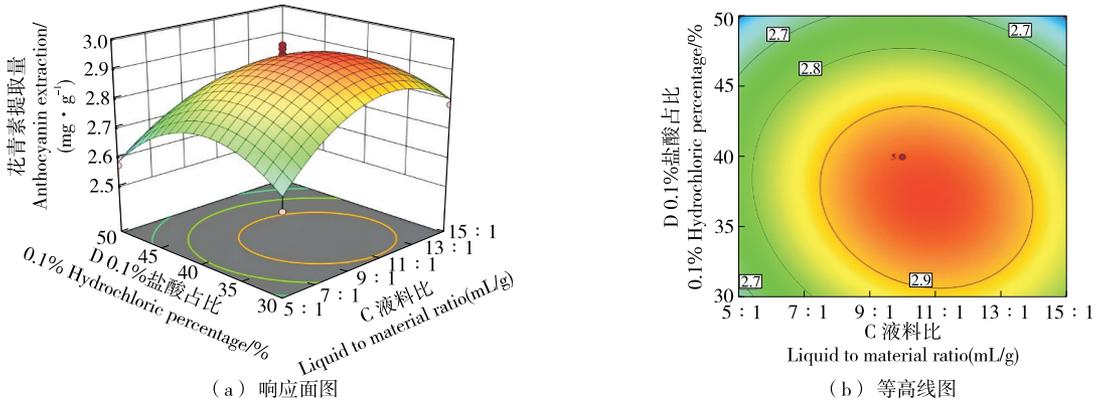


图 10 液料比和 0.1% 盐酸占比对花青素提取量影响的响应面图及等高线图

Figure 10 Response surface plots and contour plots of the influence of liquid/ material ratio and 0.1% hydrochloric percentage on anthocyanin extraction

2.3 洛神花花青素的颜色及可见光谱分析

由图 11 可知,在试验范围内,随着 pH 的不断升高花青素的颜色变化为:红色→淡紫色→淡粉色→蓝色→棕绿色→深褐色→黄色。pH<7 时,洛神花花青素溶液呈酸

性,花青素的颜色呈红色或紫色等亮色系,其最大吸收峰在 525 nm 波长附近;pH>7 时,洛神花花青素溶液呈碱性,花青素的颜色呈棕色或褐色等暗色系,其最大吸收峰在 575 nm 波长附近。在 pH 由酸性到碱性的过程中,洛神

花花青素的最大吸收峰从 525 nm 向 575 nm 波长方向移动,同时其最大吸收波长处的吸光度持续下降。通过洛神花花青素不同的颜色可以区分溶液的酸碱性,这一特性有利于其在食品包装领域的应用。根据食品在腐败前后的酸碱性不同,将洛神花花青素添加至成膜材料中,可以开发食品新鲜度的智能指示包装,使食品新鲜度可视化。

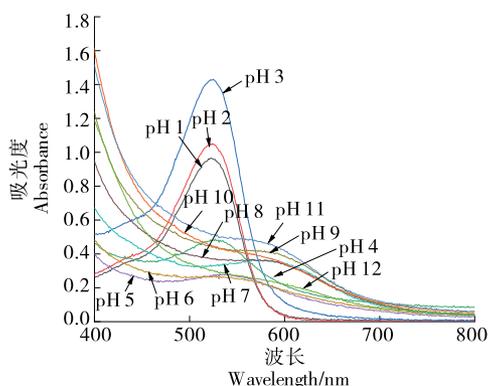


图 11 洛神花花青素溶液在 pH 1~12 下的可见光谱

Figure 11 Visible spectra of anthocyanin solutions from roselle at pH 1~12

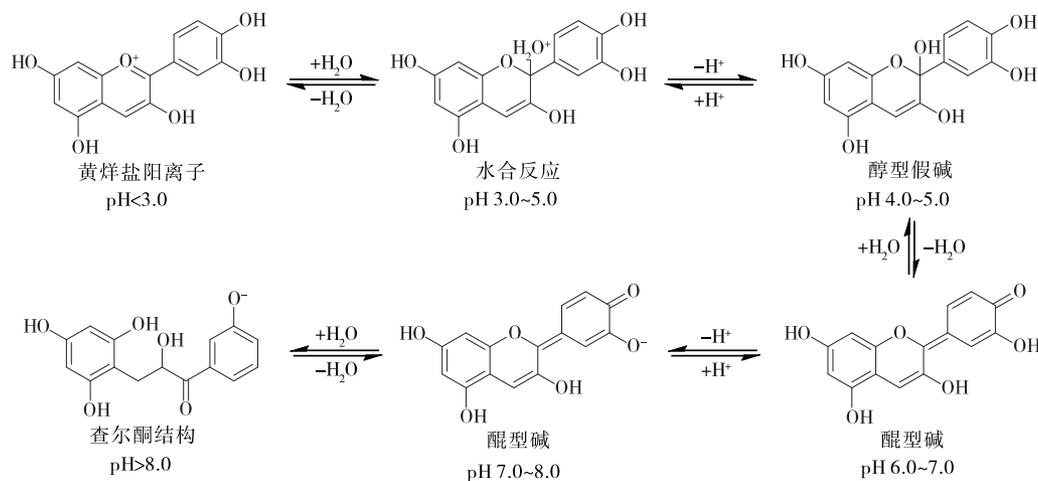


图 12 洛神花花青素在不同 pH 值下分子结构的变化

Figure 12 Changes in the molecular structure of anthocyanins from roselle at different pH values

2.4 洛神花花青素稳定性

2.4.1 pH 值对洛神花花青素稳定性的影响 由图 13 可知,当洛神花花青素提取液处于 pH 1~3 的环境下 1 h 后,保存率基本处于稳定且保持在 85% 以上;当环境 pH > 3 时,洛神花花青素的保存率处于持续下降的状态,并且随着 pH 值的增大,洛神花花青素保存率降低速度增快。同时,洛神花花青素溶液的颜色由紫红色逐渐变为褐色。其原因可能是:在不同酸性环境下,洛神花花青素的分子结构发生改变,花青素的颜色和保存率也随之改变,造成了花青素的稳定性下降^[25]。综上所述,洛神花花青素在

洛神花花青素在不同的 pH 值下颜色发生改变的原因是其自身的结构发生变化。花青素的基本结构是 2-苯基-苯并吡喃的糖基化多羟基或聚甲氧基衍生物,含有 A 和 B 两个苯基环。洛神花花青素在不同的酸碱环境下会呈现出 4 种不同的结构^[22]。由图 12 可知,pH < 3 时,主要是以红色黄烔盐阳离子(AH⁺)的形式存在于洛神花花青素中,洛神花花青素溶液呈红色。pH < 7 时,花青素溶液呈弱酸性,主要是以醇型假碱的形式存在于洛神花花青素中,再由醇型假碱开环生成无色查尔酮形式,洛神花花青素溶液由红色逐渐变为淡粉色或淡紫色。pH > 7 时,溶液呈碱性,主要以蓝色醌型碱的形式存在于洛神花花青素中,洛神花花青素溶液的颜色变为蓝色且逐渐加深为棕绿色和深褐色,最后变为黄绿色^[23]。洛神花花青素的颜色受羟基和甲氧基数目的影响:如果有更多的羟基存在,则颜色会更偏棕褐色或者蓝色;如果有更多的甲氧基存在,则颜色会更红。此外,洛神花花青素以盐的形式存在于洛神花花萼中,其在新鲜洛神花花萼细胞中的颜色主要取决于结合方式。洛神花花青素分子结构中带正电荷的共轭双键在约 500 nm 处吸收的可见光,是洛神花呈现鲜红的原因^[24]。

强酸的环境中较为稳定。

2.4.2 光照环境对洛神花花青素稳定性的影响 由图 14 可知,在避光条件下,洛神花花青素的保存率稳定在 90% 以上,相对于其他条件下较为稳定。室内自然光下的花青素保存率相较于避光条件下的有所下降。室外强光和紫外光线下,洛神花花青素保存率下降明显,造成这种现象的原因可能是:强光或紫外光直接照射,影响了花青素的结构,极大地降低了洛神花花青素的保存率^[26]。因此,洛神花花青素遇光呈不稳定的状态。

2.4.3 温度对洛神花花青素稳定性的影响 由图 15 可

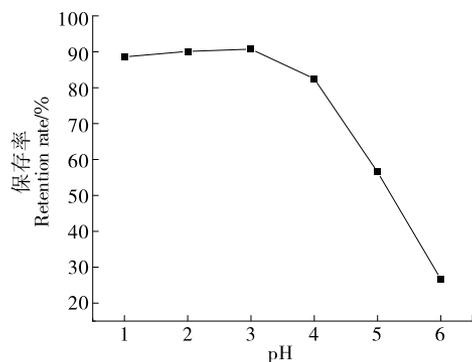


图 13 pH 值对洛神花花青素稳定性的影响

Figure 13 Influence of pH values on the stability of anthocyanins from roselle

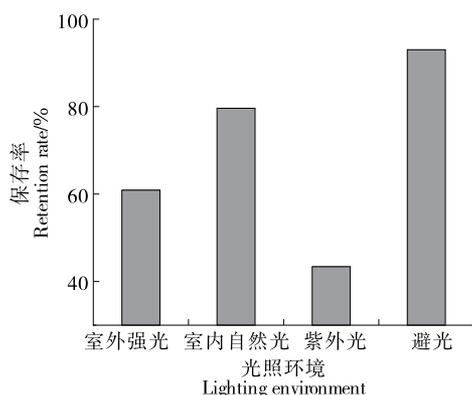


图 14 光照环境对洛神花花青素稳定性的影响

Figure 14 Influence of light environment on the stability of anthocyanins from roselle

知,在 0~40 °C 环境下,洛神花花青素的保存率均维持在 90% 以上,基本趋于稳定状态;在 50 °C 时,开始有明显下降,花青素保存率降至 80%;在 60 °C 时,洛神花花青素保存率达到 75%;随着温度继续升高,洛神花花青素下降幅度更加明显,到 70 °C 时已经下降到 50%。因为在酸性环境中持续高温使洛神花花青素裂解并发生美拉德反应^[27],而且温度越高,花青素降解越迅速,所以导致洛神花花青素的稳定性持续下降^[28]。因此,洛神花花青素适宜在低温环境下保存和使用。

2.5 洛神花花青素抗氧化活性

2.5.1 清除 DPPH 自由基能力 由图 16 可知,洛神花花青素对 DPPH 自由基的清除能力随着花青素质量浓度的增加而逐渐加强,而且洛神花花青素对 DPPH 自由基的清除能力高于同质量浓度 V_c 溶液的。这可能是由于洛神花中总多酚浓度很高,而多酚可以将电子转移给自由基,当它们的电子成对时,自由基变得稳定,所以洛神花花青素具有较高的 DPPH 自由基清除能力^[29]。

2.5.2 清除 ABTS 自由基能力 由图 17 可知,随着洛神花花青素质量浓度的增大,其清除 ABTS 自由基的能力也

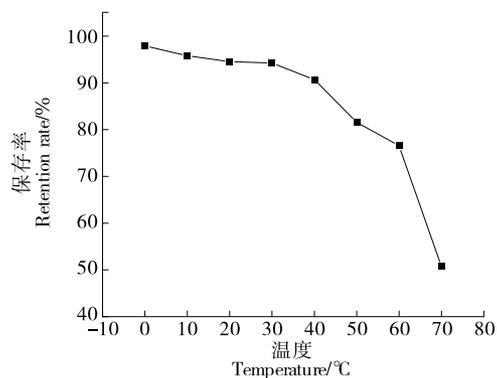


图 15 温度对洛神花花青素稳定性的影响

Figure 15 Influence of temperature on the stability of anthocyanins from roselle

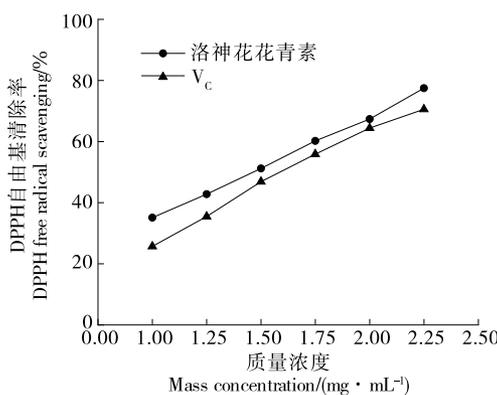


图 16 洛神花花青素对 DPPH 自由基的清除能力

Figure 16 DPPH radical scavenging by different concentrations of anthocyanins from roselle

随之增强,洛神花花青素对 ABTS 自由基的清除能力高于同质量浓度 V_c 溶液的。因此,洛神花花青素具有较高的 ABTS 自由基清除能力。

2.5.3 清除羟自由基能力 由图 18 可知,随着洛神花花

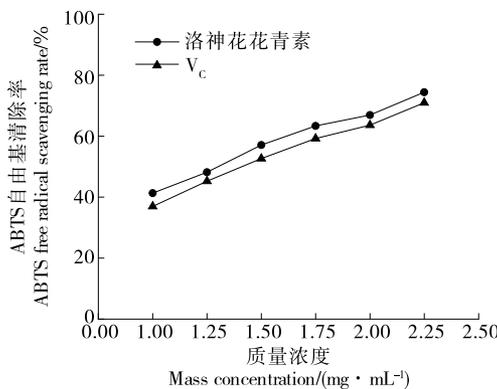


图 17 洛神花花青素对 ABTS 自由基的清除能力

Figure 17 ABTS radical scavenging by different concentrations of anthocyanins from roselle

青素质量浓度的增大,其清除羟自由基的能力也随之增强,而且洛神花花青素对羟自由基的清除能力总体上高出相同浓度质量 V_c 溶液很多。

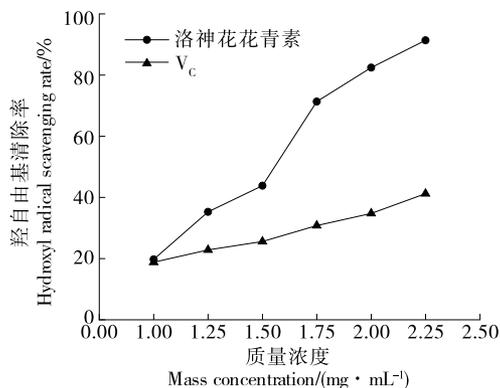


图 18 洛神花花青素对羟自由基的清除能力

Figure 18 Hydroxyl radical scavenging by different concentrations of anthocyanins from roselle

3 结论

研究优化了超声辅助酸法提取洛神花花青素的工艺条件,其最佳提取工艺为液料比 10:1 (mL/g)、0.1% 盐酸占比为 40%、超声时间 30 min、超声温度 60 °C。在此条件下,洛神花花青素提取量的平均值为 2.982 mg/g。利用盐酸酸化乙醇来提取活性化合物花青素,有助于增强花青素的传质效果,加快扩散速度。超声波辅助提取可以增强溶质的水合反应和植物细胞的破碎反应,同样促进了花青素的传质效果,两者具有显著协同作用,可以明显增加花青素的提取量,缩短提取时间。通过对洛神花花青素的性质研究发现:洛神花花青素在不同酸碱度下的颜色变化是因为其自身结构的改变而导致的;其稳定性受碱性环境、紫外光照射、高温的影响较大,适宜在低温、避光的酸性条件下保存和使用;洛神花花青素有较强的抗氧化活性,并且具有明显的剂量效应关系。但研究仅从变色机理、稳定性和抗氧化性 3 个方面分析了洛神花花青素的性质,未来可以通过代谢组学和转录组学联合分析花青素的合成机制,围绕花青素合成通路中的结构基因对其性质进行深入探索,进一步完善洛神花花青素的性质研究。

参考文献

- [1] ISLAM M M. Food and medicinal values of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. Linne Malvaceae) plant parts: a review[J]. Open Journal of Nutrition and Food Sciences, 2019, 1: 14-20.
- [2] SHRUTHI V H, RAMACHANDRA C T, NIDONI U, et al. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as a source of natural colour: a review[J]. Plant Archives, 2016, 16(2): 515-522.
- [3] 李静, 李云清, 林荔辉, 等. 玫瑰茄花青素研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2022, 18(3): 155-162.
- [4] LI J, LI Y Q, LIN L H, et al. Research progress of roselle anthocyanins (*Hibiscus sabdariffa* L.) [J]. Subtropical Agriculture Research, 2022, 18(3): 155-162.
- [5] 国家卫生健康委关于印发《按照传统既是食品又是中药材的物质目录管理规定》的通知[J]. 中华人民共和国国家卫生健康委员会公报, 2021(11): 7-9.
- Notice of the National Health and Wellness Commission on the issuance of the provisions on the management of the catalogue of substances that are both food and herbal medicine according to tradition[J]. Bulletin of the National Health Commission of the People's Republic of China, 2021(11): 7-9.
- [5] 孟翔宇. 玫瑰茄花色苷提取与分离纯化及特性研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2019: 37-45.
- MENG X Y. Study on extraction, isolation, purification, structural identification and characterization of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2019: 37-45.
- [6] ALY A A, ALI H G M, ELIWA N E R. Phytochemical screening, anthocyanins and antimicrobial activities in some berries fruits[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(2): 911-920.
- [7] 陈柯君, 杨周昊, 余虹达, 等. 基于黑苹果果皮花青素的虾鲜度指示膜的制备及应用[J]. 食品科学, 2023, 44(21): 274-281.
- CHEN K J, YANG Z H, YU H D, et al. Preparation and application of shrimp freshness indicator film based on black apple peel anthocyanin[J]. Food Science, 2023, 44(21): 274-281.
- [8] 王钊, 岳晓禹, 温双双, 等. 酸法提取紫茄皮花青素及其性质研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(10): 184-188.
- WANG Z, YUE X Y, WEN S S, et al. Study on the extraction and properties of anthocyanins from purple eggplant peel by acid method[J]. China Condiment, 2022, 47(10): 184-188.
- [9] 邹小波, 薛瑾, 黄晓玮, 等. 一种双层智能膜的制备及在指示三文鱼新鲜度中的应用[J]. 食品科学, 2019, 40(23): 206-212.
- ZOU X B, XUE J, HUANG X W, et al. Development and application of an intelligent bilayer packaging film as a freshness indicator for salmon[J]. Food Science, 2019, 40(23): 206-212.
- [10] 马孟佳, 赵娟, 陈鹏飞, 等. 4 种不同来源花青素的稳定性及抗氧化性比较[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(4): 31-39, 67.
- MA M J, ZHAO J, CHEN P F, et al. Comparison on stability and antioxidant activity of anthocyanins from four separate sources[J]. Food Research and Development, 2024, 45(4): 31-39, 67.
- [11] REN S, GIUSTI M M. The effect of whey protein concentration and preheating temperature on the color and stability of purple corn, grape and black carrot anthocyanins in the presence of ascorbic acid[J]. Food Research International, 2021, 144: 110350.
- [12] 孙茂成, 杨丰硕, 范秀娟, 等. 食品加工条件对黑枸杞花青素稳定性的影响[J]. 中国调味品, 2024, 49(3): 182-186.

- SUN M C, YANG F S, FAN X J, et al. Effects of food processing conditions on stability of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. *China Condiment*, 2024, 49(3): 182-186.
- [13] 杨红, 唐莉, 李毅, 等. 8 种食品水提液的抗氧化和抗炎活性比较[J]. *食品与机械*, 2023, 39(11): 192-197.
- YANG H, TANG L, LI Y, et al. Comparative studies on the antioxidant and anti-inflammatory activities of water extracts from eight kinds of foods[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(11): 192-197.
- [14] SARKER U, HOSSAIN M M, OBA S. Nutritional and antioxidant components and antioxidant capacity in green morph *Amaranthus leafy vegetable*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1 336.
- [15] 杭书扬, 杨留枝, 史苗苗, 等. 山药皮残渣多糖结构表征及抗氧化活性测定[J]. *食品与机械*, 2023, 39(2): 153-158, 206.
- HANG S Y, YANG L Z, SHI M M, et al. Characterization and antioxidant activity determination of polysaccharide from yam peel residue[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(2): 153-158, 206.
- [16] LIN C Y, JUNG J, ZHAO Y Y. Investigation of cell wall characteristics of copigmented and coated whole blueberry fruit for improving anthocyanin stability under high hydrostatic pressure process and refrigerated storage[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2024, 59(2): 829-844.
- [17] 梁泳仪, 肖冬悦, 王宏, 等. 化橘红黄酮深共熔溶剂提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. *食品与机械*, 2024, 40(7): 192-199.
- LIANG Y Y, XIAO D Y, WANG H, et al. Optimization of deep eutectic solvent extraction process and antioxidant activities of flavonoids from *exocarpium Citri grandis*[J]. *Food & Machinery*, 2024, 40(7): 192-199.
- [18] 张冬梅, 王丽杰, 潘悦. 响应面法优化酶—超声提取黑枸杞花青素及抗氧化性研究[J]. *食品工业*, 2024, 45(2): 11-16.
- ZHANG D M, WANG L J, PAN Y. Optimization of enzyme-ultrasonic assisted extraction of anthocyanins from black wolfberry by response surface methodology and its antioxidant activity study[J]. *The Food Industry*, 2024, 45(2): 11-16.
- [19] ROY S, RHIM J W. Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(14): 2 297-2 325.
- [20] LV J M, GOUDA M, ZHU Y Y, et al. Ultrasound-assisted extraction optimization of proanthocyanidins from kiwi (*Actinidia chinensis*) leaves and evaluation of its antioxidant activity[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(8): 1 317.
- [21] 庞文倩, 刘春菊, 李大婧, 等. 热压加工过程中紫玉米花色苷的热降解动力学及色泽变化[J]. *江苏农业学报*, 2023, 39(7): 1 583-1 592.
- PANG W Q, LIU C J, LI D J, et al. Thermal degradation kinetics of anthocyanins and color change in purple corn during hot pressing process[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 39(7): 1 583-1 592.
- [22] 赵明超. 黑米花青素生物合成分子机制研究及其营养价值评价[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021: 27-36.
- ZHAO M C. Study on the molecular mechanism of anthocyanin biosynthesis in black rice and its nutritional value evaluation[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021: 27-36.
- [23] 王锋, 邓洁红, 谭兴和, 等. 花色苷及其共色作用研究进展[J]. *食品科学*, 2008(2): 472-476.
- WANG F, DENG J H, TAN X H, et al. Research progress on anthocyanins copigmentation[J]. *Food Science*, 2008(2): 472-476.
- [24] 李雪. 通过分子间和分子内辅色作用稳定花青素颜色的研究[D]. 天津: 天津大学, 2019: 43-50.
- LI X. Color stabilization of anthocyanins by intermolecular and intramolecular copigmentation[D]. Tianjin: Tianjin University, 2019: 43-50.
- [25] 雷桥, 张文惠. 负载天然色素的生物基智能包装指示器研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2024, 42(1): 20-31.
- LEI Q, ZHANG W H. Research progress of bio-based intelligent packaging indicator loaded with natural pigments [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2024, 42(1): 20-31.
- [26] 朱玉磊, 汪正鑫, 于文博, 等. 花青素药用价值研究进展[J]. *安徽农业大学学报*, 2023, 50(6): 1 082-1 091.
- ZHU Y L, WANG Z X, YU W B, et al. Research progress on medicinal values of anthocyanins[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2023, 50(6): 1 082-1 091.
- [27] KARA S, ERÇELEBI E A. Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual colour of urmu mulberry (*Morus nigra* L.) [J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 116(2): 541-547.
- [28] 牛钰, 李晶, 王俊文, 等. 高等植物花青素生物合成、调控、生物活性及其检测的研究进展[J]. *浙江农业学报*, 2024, 36(4): 978-996.
- NIU Y, LI J, WANG J W, et al. Research progress of anthocyanin biosynthesis, regulation, bioactivity and detection in higher plants[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2024, 36(4): 978-996.
- [29] VULIĆ J, TUMBAS V T, SAVATOVIĆ S M, et al. Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts[J]. *Acta Periodica Technologica*, 2011(42): 271-279.