

微波辅助提取蓝莓酒糟中花青素的工艺优化 及 HPLC-ESI-MS 鉴定

宋 頔 廖婷婷 王 绩 陈振民 张益民 梁运祥 胡咏梅

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点研究室, 武汉 430070

摘要 以蓝莓酒糟为原料,通过响应面试验对微波辅助提取蓝莓酒糟中花青素的工艺进行优化,并采用 HPLC-ESI-MS 方法对分离提纯的花青素单体进行结构鉴定。结果表明,最佳提取条件为:乙醇含量(体积分数) 62%,柠檬酸含量 1.25%,液固比 60:1(V/m),微波功率 420 W,微波提取时间 83 s。在最佳提取条件下,从 1.0 g 蓝莓酒糟中提取到 1.905 ± 0.038 mg 花青素,首次提取率达 86.87%。从供试的蓝莓酒糟,中共鉴定出 9 种花青素单体,其中主要的单体为锦葵色素 3-O-半乳糖苷和锦葵色素-3-O-葡萄糖苷。

关键词 花青素; 蓝莓酒糟; 微波辅助提取; 响应面试验; HPLC-ESI-MS

中图分类号 TS 252.54 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)05-0065-09

花青素又称花色素,属于生物类黄酮化合物,是一种重要的天然水溶性色素,在植物中广泛存在,同时赋予植物五彩缤纷的颜色^[1]。花青素不仅可预防包括心血管疾病、二型糖尿病和癌症等慢性退行性疾病^[2-4],而且还具有抗炎^[5]、保护视网膜^[6]、抗诱变^[7]和抗氧化^[8]等功效,因此,越来越受人们的关注。我国蓝莓资源丰富,绝大多数蓝莓用于果酒、果汁和果酱的生产。低温发酵蓝莓酒很好地保留了蓝莓中的有效生物活性物质,具有较大的应用前景。蓝莓酒酿造后,仍含有大量天然色素的蓝莓酒糟,往往被直接丢弃。不仅资源没有得到充分利用,造成了很大的浪费,而且对环境造成了严重的污染。研究表明,蓝莓果中的大部分花青素仍滞留在蓝莓酒糟中,只有少量留在酒中,而且蓝莓酒糟中花青素的抗氧化性显著优于蓝莓果中花青素的抗氧化性^[9]。

花青素的提取方法主要有微波辅助提取^[10]、超声辅助提取^[11]、索氏提取^[12]、高压提取^[13]、固相萃取-高效液相色谱法^[14]和脉冲电场提取^[15]等。其中,微波辅助提取法具有易于操作、成本低、提取率高以及对环境污染低等优点。目前,已有关于蓝莓果生物活性或酚类提取技术的报道^[16-18],以及关于葡萄酒糟中花青素或(聚)酚类、脂质和角鲨烯等化

合物的研究报道^[14,19-22],但关于采用响应面设计和微波辅助技术手段从蓝莓酒糟中提取花青素的文献鲜见报道。响应曲面分析法(response surface methodology, RSM)是一种有效的优化复杂统计过程的方法,已成功地用于从许多药用植物中优化提取总类黄酮化合物。相对而言,正交试验仅能比较各种因素中已选定水平的优劣,不提供未考察区域的信息,因此,不能很好地进行预测和控制^[23],而借助响应面设计进行试验,可弥补这些不足,并且求得的回归方程精度高、试验组合少,可同时研究几个因素之间的交互作用,是一种高效的优化反应条件以及加工工艺参数的方法^[24-25]。因此,本研究采用微波辅助提取和响应面设计优化蓝莓酒糟花青素提取工艺,并采用 HPLC-ESI-MS 方法鉴定提取物中的花青素单体。同时,考虑到提取到的花青素可作为天然食用色素或回归酒体的潜在用途,本研究选取无毒的乙醇和柠檬酸代替甲醇和盐酸为提取溶剂,为花青素的继续开发和利用以及更广泛地应用于工业领域奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

蓝莓酒糟,华中农业大学农业微生物学国家重

收稿日期: 2017-09-18

基金项目: 国家基金委国家基础科学人才培养基金项目(201315)

宋 頔, 硕士研究生. 研究方向: 应用微生物学. E-mail: m18827372413@163.com

通信作者: 胡咏梅, 博士, 副教授. 研究方向: 应用微生物学. E-mail: plum73@163.com

点实验室发酵工程研究室(−20 ℃保藏); YMC-Pack ODS-AQ(4.6 mm×250 mm; 5 μm)C18 色谱柱, 日本 YMC 公司; Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm; 3.5 μm), 美国 Agilent 公司; 甲酸、乙腈、甲醇, 均为色谱纯, 美国 Sigma 公司; 冰醋酸、KCl、醋酸钠、浓 HCl、无水乙醇、柠檬酸, 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; Alpha 1-2 LD plus 冻干机, 德国 Christ 公司; MI-211A 美的微波炉, 广东美的微波电器制造公司; SY-2000 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司。

1.2 试验方法

1) 微波辅助提取蓝莓酒糟中花青素的响应面试验及其验证性试验。将蓝莓酒糟于−20 ℃冰箱冷冻 24 h 后, 置于冷冻干燥器中, 在升华温度为

−40 ℃的条件下冷冻干燥 48 h, 粉碎后过孔径 0.25 mm 筛, 于−20 ℃冰箱保藏备用。根据单因素和正交试验结果^[26], 选取乙醇含量(体积分数)、提取时间和柠檬酸含量进行三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计, 以花青素含量为指标确定最佳的提取条件, 方案设计见表 1。对试验结果进行极差分析和方差分析, 通过软件进行预测, 并对最优组合进行验证性试验。

2) 高效液相色谱分析。色谱柱采用 YMC-Pack ODS-AQ-C18 反向色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。以甲醇为流动相 A, 含 0.5% 甲酸的水为流动相 B, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 5 μL, 按照表 2 所示进行梯度洗脱。采用 UV 检测器进行检测, 检测波长为 520 nm。对每个高效液相峰进行收集, 浓缩, 备用。

表 1 Box-Behnken 试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experiments

水平 Level	X ₁ 乙醇含量/% Ethanol concentration	X ₂ 提取时间/s Microwave extraction time	X ₃ 柠檬酸含量/% Citric acid concentration
1	40	10	0.3
2	60	50	0.9
3	80	90	1.5

表 2 花青素的分离纯化程序

Table 2 The separation and purification programs of anthocyanins

时间/min Time	流动相 A/% Mobile phase A	流动相 B/% Mobile phase B	进样量/μL Injection volume
0	10	90	5
5	20	80	5
10	25	75	5
15	30	70	5
20	35	65	5
25	40	60	5
30	45	55	5
35	50	50	5
40	55	45	5
41	60	40	5
42	60	40	5
45	10	90	5
60	10	90	5

酒糟花青素用色谱纯的甲醇溶解, 进行 HPLC-ESI-MS 分析, 以确定每个峰的相对分子质量。液相条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm)。以甲醇为流动相 A, 含 0.5% 甲酸的水为流动相 B, 流速 0.3 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 5 μL, 按照表 2 进行梯度洗脱。质谱仪的条件为: 雾化气 N₂ 40 psi, 干燥气 N₂ 流速为 8.0 L/min, 毛细管温度为 350 ℃, 毛细管电压正离子模式下 4.5 kV, 质量扫描范围为 50~1 000 m/z。

1.3 花青素含量的测定

参照 Lee 等^[27]方法, 采用 pH 示差法。

2 结果与分析

2.1 Box-Behnken 试验设计和结果

将乙醇含量(X₁)、提取时间(X₂)和柠檬酸含量(X₃)设为自变量, 花青素含量设为响应值, 采用 Box-Behnken 试验设计对微波辅助提取花青素的工艺进行 3 因素 3 水平的响应面分析试验, 试验设计和结果见表 3。

3) 质谱分析。将高效液相色谱中收集到的蓝莓

表 3 Box-Beheken 试验设计和结果

Table 3 The design and results of Box-Behnken experiments

试验编号 No.	X ₁ 乙醇含量/% Ethanol concentration	X ₂ 提取时间/s Microwave extraction time	X ₃ 柠檬酸含量/% Citric acid concentration	花青素含量/(mg/g) Anthocyanin yield
1	60	10	1.5	1.781
2	40	50	0.3	1.710
3	60	10	0.3	1.816
4	60	50	0.9	1.887
5	40	10	0.9	1.652
6	40	90	0.9	1.756
7	80	10	0.9	1.699
8	60	90	1.5	1.909
9	80	90	0.9	1.753
10	40	50	1.5	1.691
11	60	50	0.9	1.906
12	60	90	0.3	1.857
13	60	50	0.9	1.894
14	60	50	0.9	1.907
15	80	50	0.3	1.662
16	60	50	0.9	1.907
17	80	50	1.5	1.766

2.2 二次回归模型拟合及方差分析

采用 Design-Expert 8.0 软件对表 3 中的数据
进行多元二次拟合分析,获得回归方程为:

$$Y = 0.3855 + 0.046724X_1 + 0.002759X_2 - 0.009813X_3 - 0.001563X_1X_2 + 0.002563X_1X_3 + 0.009063X_2X_3 - 0.003984X_1^2 - 0.001616X_2^2 - 0.09330X_3^2$$

回归模型的方差分析见表 4。由表 4 可知,模

型的 F 值是 141.93, $P < 0.000 1$, 表明模型差异极
显著,该模型的差异性不到 0.01% 的概率是由误差
导致。模型失拟项 $P = 0.062 7 > 0.05$, 失拟项不显
著,说明模型比较稳定,在回归区域的拟合度很好,
能很好地预测实际情况。另外,模型的相关系数
 $R^2 = 0.994 6$, 说明方程模型与实验数据有 99.46%
的符合度。模型的矫正系数 $Adj R^2 = 0.987 5$, 说明

表 4 响应面多元二次回归模型方差分析

Table 4 The analysis of the response surface multivariate quadratic regression model

变异来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean of square	F 值 F value	$P > F$	显著性 Significance
模型 Model	0.140 0	9	0.016 0	141.93	<0.000 1	**
X ₁ -X ₁	0.006 3	1	0.006 3	5.68	0.048 6	*
X ₂ -X ₂	0.013 0	1	0.013 0	120.56	<0.000 1	**
X ₃ -X ₃	0.001 3	1	0.001 3	11.73	0.011 1	*
X ₁ X ₂	0.006 3	1	0.006 3	5.64	0.049 3	*
X ₁ X ₃	0.003 8	1	0.003 8	34.12	0.000 6	**
X ₂ X ₃	0.001 9	1	0.001 9	17.07	0.004 4	**
X ₁ ²	0.110 0	1	0.110 0	964.38	<0.000 1	**
X ₂ ²	0.002 8	1	0.002 8	25.38	0.001 5	**
X ₃ ²	0.004 8	1	0.004 8	42.88	0.000 3	**
残差 Residual term	0.007 8	7	0.001 1			
失拟项 Lack of fit	0.006 3	3	0.002 1	5.72	0.062 7	
纯误差 Pure error	0.001 5	4				
总和 Total	0.14	16				

注: ** 表示影响极显著, $P < 0.01$; * 表示影响显著, $0.01 < P < 0.05$ 。Note: ** indicates highly significant, $P < 0.01$; * indicates significant, $0.01 < P < 0.05$ 。

模型的预测值和实际值之间具有高度相关性,能够解释 98.75% 的响应值变化,可以相信模型对花青素提取含量的预测。模型中的 X_2 和 X_1X_3 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对响应值的影响为极显著, X_1 、 X_3 、 X_1X_2 为显著项,说明因素效应显著,同时各因素间的相互作用也比较大。

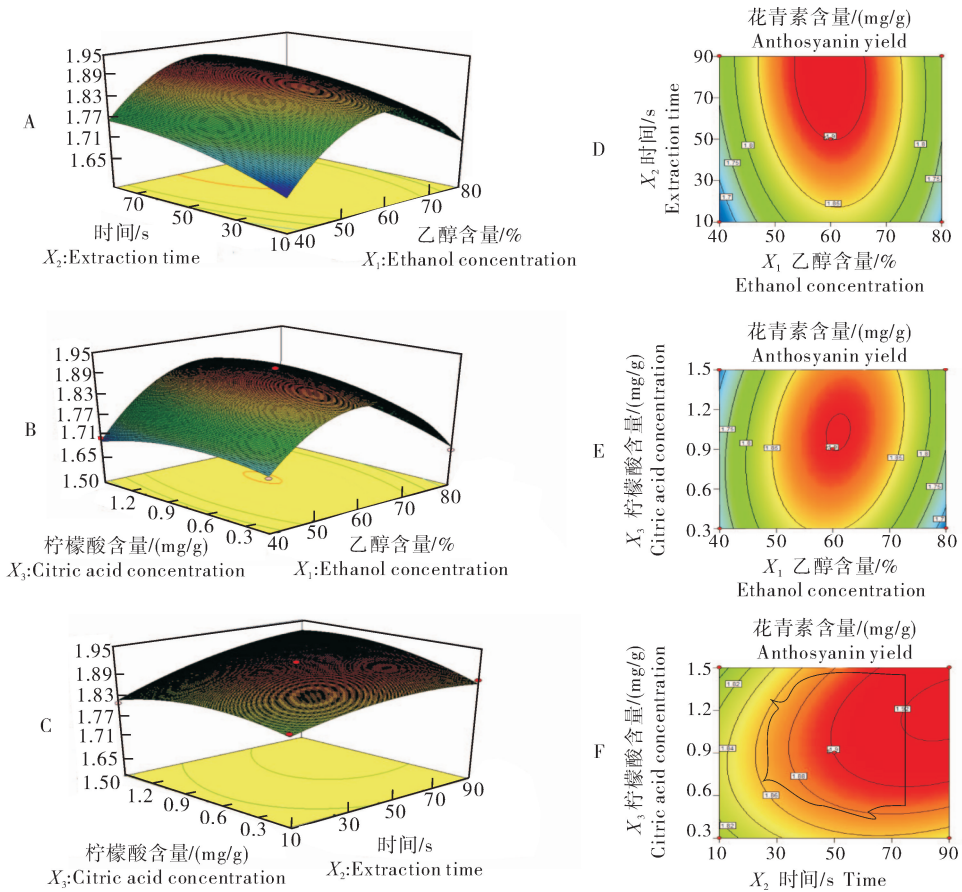
2.3 响应面各因素交互作用的分析

通过 Design-Expert 8.0 软件进行各因素间交互作用对花青素含量的响应面分析。利用该软件分别绘制三维曲面图(图 1A、B、C)及等高线图(图 1D、E、F)。

每个响应面分别代表当第 3 个变量保持在 0 水平时另外 2 个独立变量之间的相互作用。由图 1A、D 可看出,当乙醇体积分数处于一定范围内时,花青

素含量随着提取时间的增加而快速增加。此后,随着提取时间的再增加,花青素含量达到稳定状态。说明微波提取时间的增加,有利于花青素的浸提,最后达到饱和。当提取时间在 80~90 s 范围内的时,花青素含量达到最高。当提取时间一定时,随着乙醇体积分数的增加,花青素含量上升;当乙醇体积分数达到 60% 左右,花青素含量达到最高;然后随着提取时间增加,花青素含量下降,其原因很可能是高含量的乙醇浸提蓝莓酒糟中的花青素时存在醇沉现象。

如图 1B、E 所示,因素 X_1 和 X_3 交互作用的等高线图显示两者交互作用比较强。当柠檬酸含量一定时,花青素含量随着乙醇体积分数的增加表现出先上升后下降的趋势。当乙醇体积分数在 60% 左



A:因素 X_1 和 X_2 交互作用的 3D 图 The 3D figure of interaction between factor X_1 and X_2 ; B:因素 X_1 和 X_3 交互作用的 3D 图 The 3D figure of interaction between factor X_1 and X_3 ; C: X_2 和 X_3 交互作用的 3D 图 The 3D figure of interaction between X_2 and X_3 ; D:因素 X_1 和 X_2 交互作用的等高线图 The contour map of interaction between factor X_1 and X_2 ; E:因素 X_1 和 X_3 交互作用的等高线图 The contour map of interaction between factor X_1 and X_3 ; F:因素 X_2 和 X_3 交互作用的等高线图 The contour map of interaction between factor X_2 and X_3 ;因素 X_1 为乙醇含量(体积分数),因素 X_2 为提取时间,因素 X_3 为柠檬酸含量 Factor X_1 is ethanol concentration, factor X_2 is extraction time, factor X_3 is citric acid concentration.

图 1 响应面立体分析图和等高线图

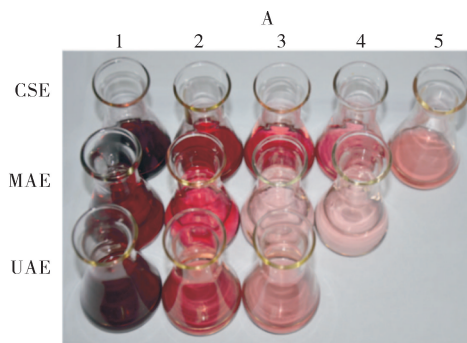
Fig.1 Contour plots and response surface stereo analysis diagram

右时,花青素含量达到最大,说明乙醇体积分数过高过低都不适合花青素的浸提。当乙醇体积分数一定时,随着柠檬酸含量改变,花青素含量的变化比较小。

由图 1C,F 可知,当提取时间一定时,花青素含量随着柠檬酸含量的增加先增加后减小。柠檬酸质量分数在 0.9%~1.3% 时,花青素含量最高。柠檬酸含量一定时,随着提取时间的增加,花青素含量呈先上升再下降的趋势。当提取时间在 60~90 s 时,花青素含量达到最大值。

2.4 回归模型验证

根据软件得到的最佳优化条件为:61.61%乙醇(含 1.25%柠檬酸),提取时间 82.87 s,预测提取到的花青素含量为 1.923 mg/g。按照最优条件对模型进行验证,为了便于实验操作,乙醇含量选取 62%(体积分数),浸提时间选取 83 s,最终得到花青素含量为 1.905 ± 0.038 mg/g。经过 t 检验,差异不显著,与模型预测值基本一致。因此,确定微波辅助提取该蓝莓酒糟中花青素的最佳工艺为:62%乙醇(含 1.25%的柠檬酸),液固比 60:1(V:m),在微波功率为 420 W 的条件下浸提 83 s。



A:采用 UAE、MAE 和 CSE 方法多次提取的结果 Photograph of multiple extraction using UAE, MAE and CSE methods; UAE、MAE 和 CSE 分别表示超声波辅助提取、微波辅助提取和传统方法提取 UAE, MAE and CSE represent ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction and conventional solvent extraction, respectively; B:3 种方法多次提取花青素提取率柱形图 Column diagram of multiple extraction using UAE, MAE and CSE methods.

图 2 不同提取方法对花青素提取率的影响

Fig.2 Effects of different extraction methods on the extraction rate of anthocyanins

仅使得提取时间缩短,而且首次提取率较高。因此,微波辅助提取比传统方法提取和超声波辅助提取方法在提取效率上具有较为明显的优势。

2.6 蓝莓酒糟中花青素的分离纯化与鉴定

1)HPLC 分析。大孔树脂纯化后的花青素提取液经 HPLC 分析,共获得 9 个主要的吸收峰,如图 3 所示。收集每个吸收峰的洗脱液,进行旋转蒸发浓缩后,用于下一步的 HPLC-ESI-MS 分析。

2.5 微波辅助提取、传统提取和超声辅助提取的花青素提取率比较

采用本研究响应面优化所得到的最佳微波辅助工艺条件,与文献[28]的传统提取(以 70%的乙醇(含 1% HCl)为提取溶剂,料液比为 1:25 (g/mL),70 °C 提取 60 min)和超声辅助提取方法[29](400 W, 61.03 °C 超声提取 23.67 min)比较,提取多次,其花青素的产率如图 2 所示。

采用微波辅助提取蓝莓酒糟中花青素,在最优提取条件下对蓝莓酒糟共进行了 4 次提取(第 4 次提取时花青素的提取量接近零),所得花青素的总含量为 2.193 mg/g。由图 2A 可知,传统方法提取到第 5 次,花青素还未浸提完全,而微波和超声波辅助提取到第 3 次,花青素可基本提取完全。如图 2B 所示,在本研究优化得到的微波辅助最优提取条件下,花青素的首次提取率可达到 86.87%;而分别参照王秀菊等[28]和 He 等[29]所采用的传统提取和超声波辅助方法的最佳工艺条件,花青素的首次提取率分别是 72.25%和 79.94%,说明微波辅助提取不

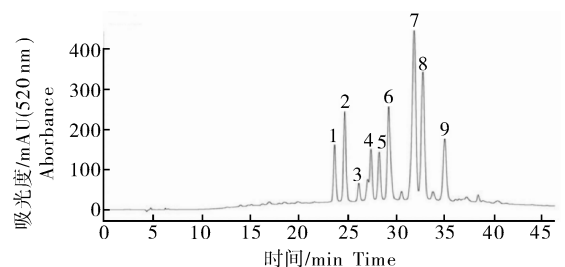
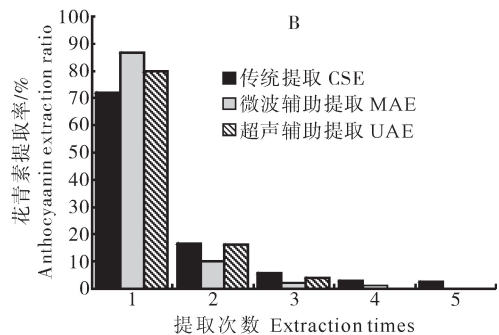
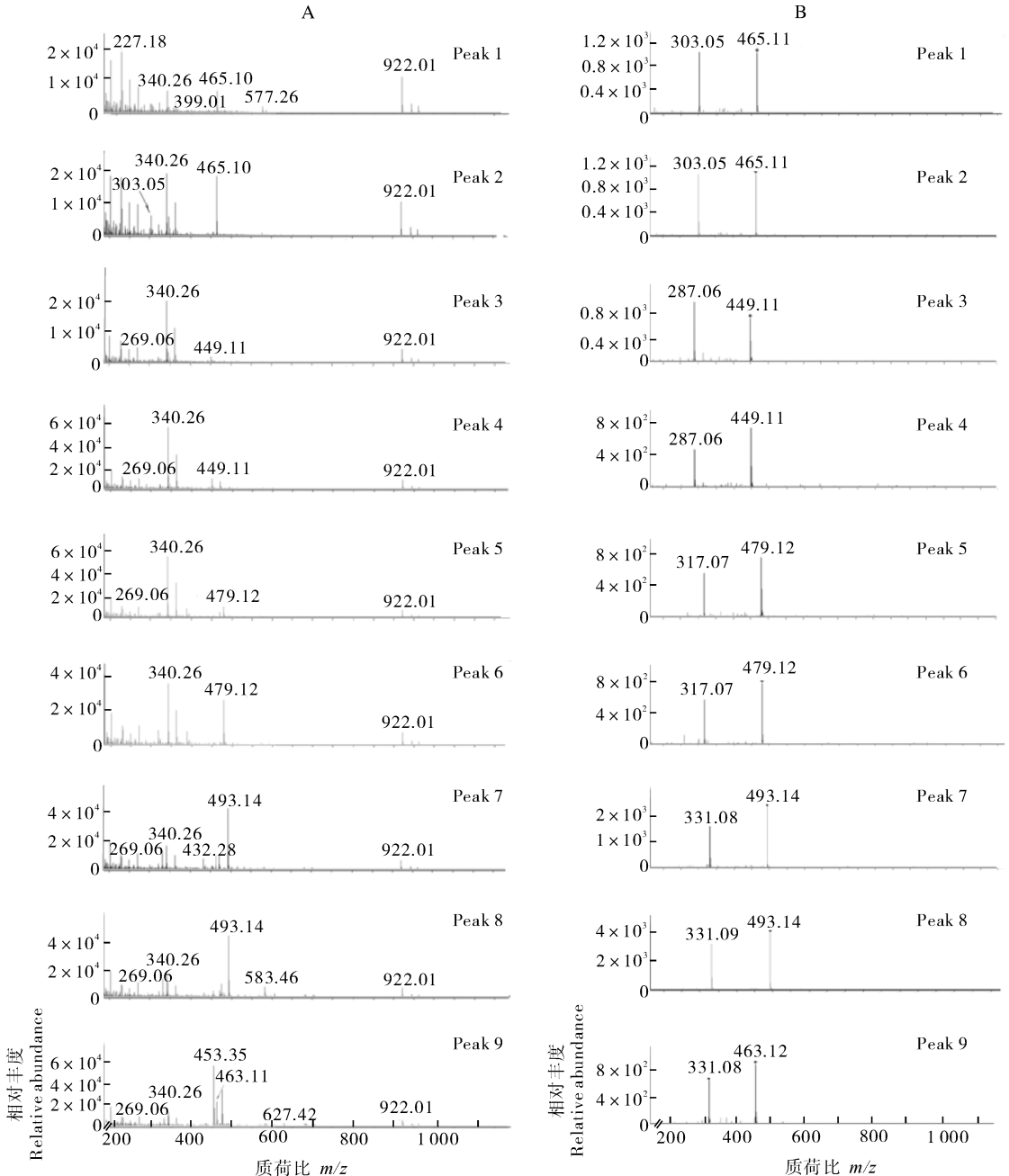


图 3 蓝莓酒糟中花青素的 HPLC 图

Fig.3 HPLC spectrum of anthocyanins from blueberry lees

2) 蓝莓酒糟花青素的质谱分析。采用 HPLC-ESI-MS 对所收集的 1~9 号花青素进行一级质谱和二级质谱鉴定(图 4)。通过一级质谱可知每个峰的相对分子质量,结合文献[30-33]确定 m/z 为 465.1、449.1、479.1、493.1 和 463.1 的花青素分别是飞燕草色素、矢车菊色素、牵牛花色素和锦葵色素(图 4A)。进一步通过二级质谱分析,获得各个花青素单体和碎片的 m/z (图 4B)。结合 HPLC 分析中

各个峰的保留时间、一级质谱图和二级质谱图结果以及文献[30-33]中已报道的花青素相关信息,确定 9 个花青素单体名称(表 5)。由表 5 可知,锦葵色素、牵牛花色素、飞草燕色素和矢车菊色素分别占供试蓝莓酒糟花青素的 52.3%、17.3%、15.0% 和 6.9%,其中,锦葵色素所占比例最多,超过 50%;葡萄糖苷、半乳糖苷和阿拉伯糖苷组成的花青素分别占蓝莓酒糟花青素的 44.4%、38.4%、8.7%,其中葡



A(左)为一级质谱图,B(右)为二级质谱图。A is the first level of the spectrum,B is the second level of the spectrum.

图 4 HPLC 中 9 个峰的一级质谱和二级质谱图

Fig.4 MS and MS/MS spectrums of the nine peaks from HPLC analysis

表 5 蓝莓酒糟中花青素的分析鉴定

Table 5 Analysis and identification of anthocyanins in blueberry lees extract

峰 Peak	出峰时间/min Time	母离子 m/z Parent ion	碎片 m/z Product ion	名称 Compounds	含量/% Content
1	23.779	465.1	303.1	飞燕草色素 3-O-半乳糖苷 Delphinidin 3-O-galactoside	5.522
2	24.826	465.1	303.1	飞燕草色素 3-O-葡萄糖苷 Delphinidin 3-O-glucoside	9.509
3	26.274	449.1	287.1	矢车菊色素 3-O-半乳糖苷 Cyanidin-3-O-galactoside	1.678
4	27.530	449.1	287.1	矢车菊色素 3-O-葡萄糖苷 Cyanidin-3-O-glucoside	5.178
5	28.374	479.1	317.1	牵牛花色素 3-O-半乳糖苷 Petunidin-3-O-galactoside	5.179
6	29.357	479.1	317.1	牵牛花色素 3-O-葡萄糖苷 Petunidin-3-O-glucoside	12.168
7	31.980	493.1	331.1	锦葵色素 3-O-半乳糖苷 Malvidin-3-O-galactoside	26.039
8	32.877	493.1	331.1	锦葵色素 3-O-葡萄糖苷 Malvidin-3-O-glucoside	17.545
9	35.126	463.1	331.1	锦葵色素 3-O-阿拉伯糖苷 Malvidin-3-O-arabinoside	8.736

葡萄糖苷和半乳糖苷组成的花青素所占比例较多,两者合计超过 80%。在供试蓝莓酒糟的这 9 种花青素中,锦葵色素-3-O-半乳糖苷和锦葵色素-3-O-葡萄糖苷是最主要的两种花青素,分别占总花青素含量的 26.039%和 17.545%。

3 讨论

找到一种经济有效的从植物中获取花青素的提取方法,是目前花青素研究的热点。李颖畅等^[34]研究了不同溶剂对蓝莓花青素提取的影响,结果发现,采用乙醇和甲醇作为提取剂的花青素提取量比较高,并且差异并不显著。鉴于甲醇有一定的毒性,因此,选择乙醇作为提取溶剂。花青素在酸性环境下相对比较稳定,并且酸化乙醇溶液将破坏植物细胞膜和溶解花青素同时进行,使得花青素的提取率提高,酸化剂通常采用盐酸或者柠檬酸。选择柠檬酸作为酸化剂,既可以防止氯离子的污染^[35],还可扩大花青素的应用范围,使提取的花青素不仅可以应用于医疗,还可用于食品和化妆品等领域。因此,本研究选择了柠檬酸酸化的乙醇作为溶剂提取蓝莓酒糟中的花青素,一方面可保证提取率,另一方面还扩大了花青素的应用范围。

Zou 等^[36]采用微波和超声波辅助提取桑葚中的花青素,分别与与溶剂提取进行了对比。在超声波提取的最优条件:63.8%甲醇(含有 1% TFA)、提取温度为 43.2 °C、液固比 23.8 : 1、提取时间 40 min,该条件下花青素提取量达到 64.84 mg/g。在微波辅助提取中,最优提取条件:甲醇为 59.6%(含

有 1% TFA)、微波功率 425 W、液固比 25 : 1、提取时间 132 s,此条件下花青素提取量为 54.94 mg/g,而传统溶剂提取 60 min,提取花青素仅为 44.83 mg/g^[37]。这说明微波既可有效提高花青素的提取率,又比超声波辅助提取所需的时间更短。本研究采用微波辅助提取蓝莓酒糟中的花青素,得到的最佳提取工艺是乙醇体积分数 62%、柠檬酸质量分数为 1.25%、微波功率 420 W、液固比 60 : 1、微波提取时间 83 s。与传统溶剂法相比,大大地缩短了提取时间,提高了提取率。

参 考 文 献

- [1] WALLACE T C, GIUSTI M M. Anthocyanins[J]. *Adv Nutr*, 2015, 6: 620-622.
- [2] WALLACE T C, SLAVIN M, FRANKENFELD C L. Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease[J]. *Nutrients*, 2016, 8(1): 32.
- [3] SARIKAPHUTI A, NARARATWANCAI T, HASHIGUCHI T, et al. Preventive effects of anthocyanins on diabetes in Zucker diabetic fatty rats[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(3): 689-695.
- [4] KUNTZ S, KUNZ C, RUDLOFF S. Inhibition of pancreatic cancer cell migration by plasma anthocyanins isolated from healthy volunteers receiving an anthocyanin-rich berry juice[J]. *Eur J Nutr*, 2015, 388(SI): 1-12.
- [5] OLEJNIK A, KOWALSKA K, KIDON M, et al. Purple carrot anthocyanins suppress lipopolysaccharide-induced inflammation in the co-culture of intestinal Caco-2 and macrophage RAW264.7 cells[J]. *Food Funct*, 2016, 7: 557-564.
- [6] SILVAN J M, REGUERO M, DE PASCUAL-TERESA S A. A protective effect of anthocyanins and xanthophylls on UVB-in-

- duced damage in retinal pigment epithelial cells [J]. *Food Funct*, 2016, 7: 1067-1076.
- [7] LIU W, LU X, HE G, et al. Cytosolic protection against ultraviolet induced DNA damage by blueberry anthocyanins and anthocyanidins in hepatocarcinoma HepG2 cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35: 491-498.
- [8] FLORES F P, SINGH R K, KERR W L, et al. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of blueberry anthocyanins prepared using different solvents [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 4441-4447.
- [9] 张杨, 谢笔钧, 孙智达. 蓝莓酒渣、果、酒中花色苷成分鉴定及酒渣与果中花色苷抗氧化活性比较 [J]. *食品科学*, 2016, 37: 165-171.
- [10] TENG H, LEE W Y, CHOI Y H. Optimization of microwave-assisted extraction for anthocyanins, polyphenols, and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface methodology [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36: 3107-3114.
- [11] CAI Z, QU Z, LAN Y, et al. Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes [J]. *Food Chem*, 2016, 197: 266-272.
- [12] PEDERSEN J R, OLSSON J O. Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips [J]. *Analyst*, 2003, 128: 332-334.
- [13] JUN X. High-pressure processing as emergent technology for the extraction of bioactive ingredients from plant materials [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2013, 53: 837-852.
- [14] DELGADO DE LA TORRE M, FERREIRO-VERA C, PRIEGO-CAPOTE F, et al. Anthocyanidins, proanthocyanidins, and anthocyanins profiling in wine lees by solid-phase extraction - liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with data-dependent methods [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 12539-12548.
- [15] TURK M F, BARON A, VOROBIEV E. Effect of pulsed electric fields treatment and mash size on extraction and composition of apple juices [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 9611-9616.
- [16] WU T, JIANG Z, YIN J, et al. Anti-obesity effects of artificial planting blueberry (*Vaccinium ashei*) anthocyanin in high-fat diet-treated mice [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2016, 67: 257-264.
- [17] DIACONEASA Z, LEOPOLD L, RUGINA D, et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 2352-2365.
- [18] CHEN J, TAO X, ZHANG M, et al. Properties and stability of blueberry anthocyanin-bovine serum albumin nanoparticles [J]. *J Sci Food Agric*, 2014, 94: 1781-1786.
- [19] MAZAUURIC J P, SALMON J M. Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: II. Analysis of desorbed polyphenol compounds from yeast lees [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 3876-3881.
- [20] MAZAUURIC J P, SALMON J M. Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 5647-5653.
- [21] TORRE M P D D L, PRIEGO-CAPOTE F, CASTRO M D L D. Characterization and comparison of wine lees by liquid chromatography-mass spectrometry in high-resolution mode [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 1116-1125.
- [22] PÉREZ-SERRADILLA J, LUQUE D E, CASTRO M D L D. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124: 1652-1659.
- [23] 崔秀秀, 韩梅, 李丽娜, 等. 利用响应面法优化耐冷纤维素降解菌产内切纤维素酶的发酵条件 [J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(4): 62-69.
- [24] BEZERRA M A, SANTELLI R E, OLIVEIRA E P, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry [J]. *Talanta*, 2008, 76: 965-977.
- [25] MYERS R H, MONTGOMERY D C, ANDERSON-COOK C M. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments [M]. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016.
- [26] 廖婷婷, 石彬, 肖兵, 等. 微波辅助提取蓝莓酒糟中花青素的研究 [J]. *中国酿造*, 2015, 39 (10): 111-115.
- [27] LEE J, DURST R W, WROLSTAD R E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method; collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2005, 88: 1269-1278.
- [28] 王秀菊, 杜金华, 马磊, 等. 蓝莓酒渣中花色苷提取工艺的优化及其稳定性的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2009(9): 151-156.
- [29] HE B, ZHANG L L, YUE X Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace [J]. *Food Chem*, 2016, 204: 70-76.
- [30] HOSSEINIAN F S, BETA T. Saskatoon and wild blueberries have higher anthocyanin contents than other Manitoba berries [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 10832-10838.
- [31] PRIOR R L, LAZARUS S A, CAO G, et al. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1270-1276.
- [32] YOSHIMURA Y, ENOMOTO H, MORIYAMA T, et al. Visualization of anthocyanin species in rabbiteye blueberry *Vaccinium ashei* by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry [J]. *Analy Bioanal Chem*, 2012, 403: 1885-1895.
- [33] YOUSEF G G, BROWN A F, FUNAKOSHI Y, et al. Efficient quantification of the health-relevant anthocyanin and phenolic

- acid profiles in commercial cultivars and breeding selections of blueberries (*Vaccinium* spp.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 614806-614815.
- [34] 李颖畅, 孟宪军, 修英涛, 等. 蓝莓果中花色苷的提取工艺研究 [J]. *食品科技*, 2007(11): 73-76.
- [35] ZHAO Z S, LI T P. Extraction and purification of pigment from purple sweet potato wine vinasse [J]. *Adv J Food Sci Tech*, 2015, 7: 298-301.
- [36] ZOU T B, WANG M, GAN R Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12: 3006-3017.
- [37] ZOU T, WANG D, GUO H, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from mulberry and identification of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS [J]. *J Food Sci*, 2012, 77: C46-C50.

Optimizing microwave-assisted extraction of anthocyanins from blueberry wine lees and identifying anthocyanins in extract with HPLC-ESI-MS

SONG Qi LIAO Tingting WANG Ji CHEN Zhenmin
ZHANG Yimin LIANG Yunxiang HU Yongmei

College of Life Science and Technology/State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The response surface methodology (RSM) was used to optimize the microwave-assisted extraction (MAE) of anthocyanins from freeze-dried blueberry wine lees. The high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) was used to identify the structure of the anthocyanins. Using ethanol containing citrate acid, 420 W power, and a 60 : 1 (V/m) liquid-to-solid ratio, the optimal conditions for obtaining the maximum anthocyanins yield of 1.905 ± 0.038 mg/g were 62% ethanol containing 1.25% citrate acid, with an extraction time of 83 s and the extraction rate of 86.87% for the first time. Nine anthocyanins were identified in the extract by HPLC-ESI-MS. Results showed that malvidin-3-O-galactoside and malvidin-3-O-glucoside are the major anthocyanin components in blueberry wine lees.

Keywords anthocyanins; blueberry wine lees; microwave-assisted extraction; response surface methodology; HPLC-ESI-MS

(责任编辑:陆文昌)