

响应面法优化超声波辅助离子液体提取荞麦壳色素及其稳定性和抗氧化性的研究

刘宏,夏慧敏,久欣,刘妍妍,王焕芸*

内蒙古医科大学药学院,呼和浩特 010110

摘要:本研究采用响应面法优化超声波辅助离子液体提取方法,提取荞麦壳色素,并研究其稳定性和抗氧化性。实验中合成了氨基酸离子液体,筛选出了L-赖氨酸磷酸盐离子液体,从荞麦壳中提取色素。分别考察了L-赖氨酸磷酸盐离子液体的浓度、固液比、提取时间和提取温度对色素的影响。通过单因素试验和响应面法优化确定了最佳提取工艺,为L-赖氨酸磷酸盐离子液体的浓度14%,固液比1:22,提取温度为80℃,煎煮两次,每次45min的萃取条件下。本研究阐明了荞麦壳色素的最佳提取工艺,并为荞麦壳色素的工业提取奠定了一定的基础。

关键词:离子液体;荞麦壳色素;稳定性;抗氧化活性

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)Suppl-0023-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.S.004

Optimization of ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of pigment from buckwheat hull by response surface method and its stability and antioxidant activity

LIU Hong, XIA Hui-min, JIU Xin, LIU Yan-yan, WANG Huan-yun*

Pharmacology School, Inner Mongolian Medical University, Hohhot 010110, China

Abstract: In this study, response surface methodology was used to optimize the ultrasonic-assisted ionic liquid extraction method to extract buckwheat hull pigment, and its stability and antioxidant activity were studied. In the experiment, amino acid ionic liquid was synthesized, L-lysine phosphate ionic liquid was screened out, and pigment was extracted from buckwheat hull. The effects of the concentration of L-lysine phosphate ionic liquid, solid-liquid ratio, extraction time and extraction temperature on the pigment were investigated. The optimum extraction process was determined by single factor test and response surface methodology. The concentration of L-lysine phosphate ionic liquid was 14%, the solid-liquid ratio was 1:22, the extraction temperature was 80℃, and the extraction time was 45 minutes. This study clarified the best extraction process of buckwheat hull pigment, and laid a certain foundation for the industrial extraction of buckwheat hull pigment.

Key words: ionic liquid; pigment of buckwheat hull; stability; antioxidant activity

荞麦壳所含的棕色素,不仅可作为巧克力、蛋糕、饮料等食品以及药品包衣用天然色素,且因含有大量多酚类物质^[1],尚可作为保健食品原料加以开发利用。离子液体是一类在室温环境下完全由离子组成的液体物质,具有不挥发、溶解性强等特点^[2],离子液体作为萃取剂,不仅对环境友好,且具有快速、高效的优点^[3]。另外,氨基酸类离子液体具有

可回收重复利用、可降解、无污染的优点,更适于作为提取剂使用。故本研究合成了氨基酸离子液体,并且采用响应面法优化确定了荞麦壳提取色素的最佳提取工艺,同时,研究了色素的稳定性及其抗氧化性,以期为荞麦壳色素的开发应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试药

荞麦壳(内蒙古清谷新禾有机食品集团有限公司提供);荞麦壳色素(本课题组自制);氨基酸为生化试剂;其余试剂均为分析纯。

收稿日期:2022-04-25

接受日期:2022-06-24

基金项目:内蒙古自治区蒙医药协同创新培育中心研究项目(MYYXT201905)

*通信作者 Tel:86-018647116320;E-mail:Whuanyun999@163.com

1.1.2 仪器

KQ-250DE 型数控超声波提取器(昆山市超声仪器有限公司);DZKW-电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);YLD-2000 电热恒温鼓风干燥箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析仪器有限公司);AL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 氨基酸离子液体的合成

参考文献^[4]方法,分别制备精氨酸、赖氨酸、组氨酸、丙氨酸、谷氨酸的磷酸、硝酸、乙酸盐离子液体。

1.2.2 色素提取用氨基酸离子液体的筛选

取荞麦壳,粉碎,过 40 目筛,称取约 1 g,精密称

定,置 25 mL 具塞锥形瓶中,加 5% 氨基酸离子液体 25 mL,置超声波清洗器内,50 °C 超声提取 60 min,滤出提取液,精密量取滤液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,以 pH 4.6 醋酸-醋酸钠缓冲液定容,以 NaHCO₃ 溶液或 HAc 中和至 pH7.0,室温放置 20 min,UV 法在 291 nm 波长处测定吸光度值,通过比较吸光度值筛选最佳氨基酸离子液体提取液。

1.2.3 荞麦壳色素提取

以精氨酸磷酸盐离子液体为提取剂,取荞麦壳粉末 1 g,精密称定,分别研究精氨酸磷酸盐水溶液浓度、提取次数、固液比、提取温度、提取时间等因素对提取荞麦壳色素的影响。单因素试验安排见表 1,表中标注*的为变量及范围,其余为固定量,每一行为一个因素试验。

表 1 氨基酸离子液体辅助提取荞麦壳色素单因素试验安排表

Table 1 Single factor test schedule of amino acid ionic liquid assisted extraction of buckwheat hull pigment

因素 Factor	离子液体浓度 Ionic liquid concentration (%)	超声波功率 Ultrasonic power (Hz)	提取时间 Extraction time (min)	提取温度 Extraction temperature (°C)	固液比 Solid- liquid ratio	提取次数 Extraction times
离子液体浓度 Ionic liquid concentration	5 ~ 25 *	75	40	50	1:20	1
搅拌速度 Mixing speed	10	50 ~ 100 *	40	50	1:20	1
提取时间 Extraction time	10	75	20 ~ 90 *	50	1:20	1
提取温度 Extraction temperature	10	75	40	30 ~ 80 *	1:20	1
固液比 Solid-liquid ratio	10	75	40	50	1:10 ~ 1:30 *	1
提取次数 Extraction times	10	75	40	50	1:20	1 ~ 3 *

以赖氨酸磷酸盐水溶液浓度、固液比、提取温度及时间为考察因素,以提取液吸光度(A)为考核指标,设计响应面法实验,得到最终提取优化条件,实验因素与水平见表 2^[5,6]。

表 2 响应面实验因素与水平表

Table 2 Response surface experimental factors and level table

水平 Level	因素 Factor		
	A 提取时间 Extraction time (min)	B 固液比 Solid- liquid ratio	C 离子液体浓度 Ionic liquid concentration(%)
-1	20	1:10	10
0	40	1:20	15
1	60	1:30	20

1.2.4 荞麦壳色素稳定性研究

1.2.4.1 pH 值对色素稳定性的影响

分别取浓度为 0.1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 溶

液,配制成色素浓度为 0.1% 的 7 种不同 pH 值溶液(pH2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0),室温放置,观察颜色变化并测定 291 nm 处吸光度。

1.2.4.2 金属离子对色素稳定性的影响

分别配制 0.01 mol/L 的 CuCl₂、NaCl、CaCl₂、Pb(CH₃COO)₂、MgCl₂、ZnSO₄、AlCl₃、FeCl₃、KCl 溶液,各量取 5 mL,另取 5 mL 蒸馏水作为对照,分别在上述溶液中加入 10% 色素溶液 40 μL,震荡摇匀后,室温放置,观察颜色变化并测定 291 nm 处吸光度^[7]。

1.2.4.3 光照对色素稳定性的影响

配制相同浓度的 0.01% 色素水溶液 2 份,分别用荧光灯和紫外灯在同一高度、同一时间照射,观察现象并测定 291 nm 处的吸光度值。

1.2.4.4 温度对色素稳定性的影响

配制相同浓度 0.02% 色素水溶液,4 份,在不同温度(40、60、80、100 °C)下加热 30 min,冷却至室温

后于 291 nm 处测定其吸光度并观察颜色变化^[8]。

1.2.4.5 氧化剂和还原剂对色素稳定性的影响

配制 0.1% 色素水溶液,共 10 份,每份 4 mL,取其中 5 份分别加入 10% 过氧化氢 100、200、300、400、500 μL ,加蒸馏水定容至 5 mL,观察现象并测定 291 nm 处吸光度;另取 5 份,分别加入 1.0% 亚硫酸氢钠 100、200、300、400、500 μL ,加蒸馏水定容至 5 mL,观察现象并测定 291 nm 处吸光度。

1.2.5 荞麦壳色素抗氧化性能

1.2.5.1 DPPH 自由基清除能力的测定

配制 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液:称取 39.44 mg DPPH 固体,用 70% 乙醇溶解并定容至 500 mL。另称取荞麦壳色素和 Vc,用 70% 乙醇溶解,制成 3 mg/mL 的供试溶液与对照溶液,取 DPPH 乙醇溶液,加入不同浓度的荞麦壳色素溶液和 Vc 溶液,室温下避光放 30 min,在 518 nm 处测定吸光度值,按照公式(1)计算清除率^[9,10]。

$$\text{清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 :DPPH·溶液 5 mL 加入无水乙醇 5 mL 的吸光度; A_1 :DPPH·溶液 5 mL 加入样品溶液 5 mL 的吸光度; A_2 :样品溶液 5 mL 加入无水乙醇 5 mL 的吸光度;公式中引入 A_2 是为了消除样品溶液本身颜色对实验测定的干扰。

1.2.5.2 超氧阴离子清除能力的测定

参照前期制备方法,制备 0.1 mol/L HCl 溶液,pH8.2 的 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液以及浓度为 0.3 mmol/L 的邻苯三酚溶液^[11]。取荞麦壳色素,用蒸馏水溶解,制成 5 mg/mL 的溶液,分别吸取 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 mL,置 10 mL 容量瓶,蒸馏水稀释并定容,即得待测样品溶液。

邻苯三酚自氧化速率 V_0 的测定:于 5 mL pH 8.2 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液中加入 2 mL 蒸馏水,25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 20 min,再加入 0.15 mL 邻苯三酚溶液,混匀,采用紫外分光光度法于 325 nm 处测定吸光度,每组反应为 30 s,共反应 10 组。将数据以时间为横坐标,吸光度为纵坐标,作线性回归,斜率即自氧化速率 V_0 。

荞麦色素及 Vc 清除超氧阴离子速率 V_1 的测定:试管中加入 pH8.2 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 5 mL,1.8 mL 蒸馏水,0.2 mL 不同浓度的样品溶液及对照品溶液,置 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴保温 20 min,加入 0.15 mL 邻苯三酚溶液,混匀,在波长为 325 nm 处测定吸光度,每组反应为 30 s,共反应 10 组,

将数据以时间为横坐标,吸光度为纵坐标,作线性回归,所得斜率即表示色素或 Vc 清除超氧阴离子的速率 V_1 ,按照公式(2)计算清除率。

$$\text{清除率} = [(V_1 - V_0) / V_0] \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5.3 羟自由基清除能力测定

A 液:精密称取 KH_2PO_4 约 13.609 g,加水定容至 250 mL;B 液:精密称取 K_2HPO_4 约 45.644 g,加水定容至 500 mL。以体积比 A:B=19:81 的比例配制 pH=7.4,浓度为 0.2 mol/L 的磷酸缓冲溶液;称取邻菲罗啉约 0.249 2 g,加水定容至 250 mL,得浓度为 2.5 mmol/L 的溶液。精密称取约 1.042 8 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,蒸馏水溶解定容至 500 mL,得到浓度为 7.5 mmol/L 的溶液。量取适量 30% 的过氧化氢溶液,稀释 30 倍得 1% 过氧化氢溶液。

取荞麦壳色素和 Vc,用蒸馏水溶解,即得 20 mg/mL 待测样品溶液及对照溶液。试管中依次加入 2 mL pH7.4 的磷酸盐缓冲液,0.3 mL 5 mmol/L 邻菲罗啉溶液,混匀,再加入 7.5 mmol/L FeSO_4 溶液 0.2 mL,震荡摇匀后加入样品溶液及对照溶液 0.5 mL,摇匀后加 1% 的过氧化氢溶液 1 mL,补充体积至 8 mL。损伤管和未损伤管,其中损伤管中加入 1% 的过氧化氢溶液 1 mL,未损伤管不加过氧化氢溶液,最后定容各管体积至 8 mL。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 1 h,于 536 nm 下测定吸光值,按照公式(3)计算清除率。

$$\text{清除率} = [(A_2 - A_0) / (A_1 - A_0)] \times 100\% \quad (3)$$

式中, A_0 为未损伤管的吸光度值, A_1 为损伤管的吸光度值, A_2 为加样品管的吸光度值。

2 结果

2.1 氨基酸离子液体的筛选

按“1.2.2”项下方法,以浓度为 2% 的各氨基酸离子液体水溶液为提取剂提取荞麦壳色素,以 A 值的大小作为氨基酸离子液体提取荞麦壳色素效果的评价指标。通过比较提取液 A 值,碱性氨基酸离子液体的提取效果较好,进一步对精氨酸磷酸盐、赖氨酸磷酸盐、组氨酸磷酸盐提取色素的效果进行比较,结果可知精氨酸磷酸盐的提取效果最佳。所制备的离子液体性状见表 3,提取用离子液体筛选结果见表 4。

2.2 荞麦壳色素提取工艺研究

2.2.1 单因素考察

2.2.1.1 离子液体浓度

按“1.2.3”项下方法,以不同浓度的精氨酸磷

表3 离子液体性状

Table 3 Property of ionic liquid

名称 Name	性状 Character	pH 值 pH value	名称 Name	性状 Character	pH 值 pH value
磷酸-精氨酸	无色透明固体	8.6	硝酸-组氨酸	黄白色固体	2.83
磷酸-赖氨酸	棕黄色固体	7.73	硝酸-丙氨酸	白色透明固体	1.63
磷酸-谷氨酸	白色颗粒	3.11	醋酸-精氨酸	无色透明固体	6.75
磷酸-组氨酸	黄白色固体	6.18	醋酸-赖氨酸	棕黄色固体	6.02
磷酸-丙氨酸	白色透明固体	3.5	醋酸-谷氨酸	白色固体	3.47
硝酸-精氨酸	无色透明固体	3.36	醋酸-组氨酸	白色固体	7.3
硝酸-赖氨酸	棕黄色稠膏状	2.35	醋酸-丙氨酸	白色透明固体	4.25
硝酸-谷氨酸	白色透明固体	1.58			

表4 氨基酸离子液体提取荞麦壳色素筛选结果

Table 4 Screening results of buckwheat hull pigment extracted by amino acid ionic liquid

离子液体 Ionic liquid	吸光度值 Absorbance value	离子液体 Ionic liquid	吸光度值 Absorbance value	离子液体 Ionic liquid	吸光度值 Absorbance value
精氨酸磷酸盐	0.637	精氨酸硝酸盐	0.485	精氨酸乙酸盐	0.186
赖氨酸磷酸盐	-0.326	赖氨酸硝酸盐	-0.765	赖氨酸乙酸盐	-0.130
组氨酸磷酸盐	0.545	组氨酸硝酸盐	0.424	组氨酸乙酸盐	0.479
谷氨酸磷酸盐	0.356	谷氨酸硝酸盐	0.186	谷氨酸乙酸盐	0.453
丙氨酸磷酸盐	0.446	丙氨酸硝酸盐	0.285	丙氨酸乙酸盐	0.248

酸盐离子液体水溶液为提取剂提取荞麦壳色素,以吸光度(A)的大小作为精氨酸磷酸盐离子液体提取荞麦壳色素效果的评价指标。实验结果表明,以离子液体浓度为15%的提取效果最优,实验结果见表5。

表5 离子液体浓度考察结果

Table 5 Investigation results of ionic liquid concentration

离子液体浓度 Ionic liquid concentration (%)	吸光度 Absorbance
5	0.413
10	0.554
15	0.63
20	0.612
25	0.574

2.2.1.2 固液比

按“1.2.3”项下方法,以10%的精氨酸磷酸盐离子液体为提取剂,取荞麦壳粉末1g,精密称定,以提取液吸光度(A)为考核指标,研究精氨酸磷酸盐水溶液与荞麦壳粉末的固液比因素对提取荞麦壳色素的影响,实验结果表明,以固液比的1:10提取效果最优,实验结果见表6。

表6 固液比考察结果

Table 6 Investigation results of solid-liquid ratio

固液比 Solid-liquid ratio	吸光度 Absorbance
1:10	0.482
1:20	0.595
1:30	0.554

2.2.1.3 提取时间

按“1.2.3”项下方法,以10%的精氨酸磷酸盐离子液体为提取剂,精氨酸磷酸盐水溶液与荞麦壳粉末的固液比为1:20,以提取液吸光度(A)为考核指标,研究不同提取时间对提取荞麦壳色素的影响,实验结果表明,以提取40min提取效果最优,实验结果见表7。

表7 提取时间考察结果

Table 7 Results of extraction time investigation

提取时间 Extraction time (min)	吸光度 Absorbance
20	0.487
40	0.564
60	0.498

2.2.1.4 提取温度

按“1.2.3”项下方法,以 10% 的精氨酸磷酸盐离子液体为提取剂,精氨酸磷酸盐水溶液与荞麦壳粉末的固液比为 1:20,以提取液吸光度(A)为考核指标,研究不同提取温度对提取荞麦壳色素的影响,实验结果表明,以 80 ℃ 提取效果最优,实验结果见表 8。

表 8 提取温度考察结果

Table 8 Investigation results of extraction temperature

提取温度 Extraction temperature(℃)	吸光度 Absorbance
30	0.487
50	0.554
80	0.765

2.2.1.5 超声功率

按“1.2.3”项下方法,以 10% 的精氨酸磷酸盐离子液体为提取剂,精氨酸磷酸盐水溶液与荞麦壳粉末的固液比为 1:20,提取时间为 40 min,以提取液吸光度(A)为考核指标,研究不同超声功率对提取荞麦壳色素的影响,实验结果,以 50 Hz 超声功率提取效果最优,实验结果见表 9。

表 9 超声功率考察结果

Table 9 Results of ultrasonic power investigation

超声功率 Ultrasonic power(Hz)	吸光度 Absorbance
40	0.546
50	0.583
75	0.554
100	0.502

2.2.1.6 提取次数

按“1.2.3”项下方法,以 10% 的精氨酸磷酸盐离子液体为提取剂,精氨酸磷酸盐水溶液与荞麦壳粉末的固液比为 1:20,提取时间为 40 min,超声波功率为 75%,以提取液吸光度(A)为考核指标,研究不同提取次数对提取荞麦壳色素的影响,实验结果,以 3 次提取提取效果最优,综合比较总提取液吸光度增加幅度以及各单次提取液吸光度值,确定以提取 1 次为宜,实验结果见表 10。

2.2.2 响应面法优化荞麦壳色素提取工艺

由单因素实验结果可知,对荞麦壳色素提取效果影响较大的因素有离子液体百分浓度、固液比、提

表 10 提取次数考察结果

Table 10 Inspection results of extraction times

提取次数 Extraction time	吸光度 Absorbance
1	0.553
2	0.682
3	0.759
4	0.803

取时间等。经单因素考察,提取次数与提取温度可以确定,而其他因素需要经进一步实验筛选最有条件。故确定以离子液体百分浓度、固液比、提取时间三个因素为考察因素,响应面法设计实验方案,实验结果见表 11。

表 11 响应面实验结果

Table 11 Results of response surface experiments

实验号 Test No.	离子液体百分浓度 Percentage concentration of ionic liquid	固液比 Solid-liquid ratio	提取时间 Extraction time	吸光度值 Absorbance (A)
1	0	0	0	0.648
2	1	1	0	0.641
3	1	0	1	0.68
4	0	-1	1	0.635
5	0	-1	-1	0.604
6	-1	0	-1	0.582
7	0	0	0	0.671
8	-1	0	1	0.626
9	-1	1	0	0.552
10	0	1	-1	0.591
11	-1	-1	0	0.694
12	1	0	-1	0.618
13	0	0	0	0.622
14	0	0	0	0.668
15	0	1	1	0.686
16	1	-1	0	0.616
17	0	0	0	0.604

2.3 响应面结果分析

采用 Design-Expert 10.0 软件对响应值与各因素编码值进行回归拟合后得到色素提取率与各变量的二次多项式方程模型为:吸光度 = 0.299 87 + 0.002 136A + 0.026 880B + 0.013 197C + 0.000

$110AB + 0.000\ 059AC + 0.000\ 300BC - 0.000\ 056A^2 - 0.001\ 331B^2 - 0.000\ 465C^2$, 分析结果见表 12。

表 12 回归模型方差分析

Table 12 Analysis of variance of regression model

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 <i>F</i> value	显著性 Significance
模型 Model	0.023 240 33	9	0.002 582 26	10.500	0.002 647 92	显著
A	0.000 666 13	1	0.000 666 13	2.709	0.143 808 49	
B	0.001 404 50	1	0.001 404 50	5.711	0.048 187 44	
C	0.001 653 13	1	0.001 653 13	6.722	0.035 806 89	
AB	0.000 484 00	1	0.000 484 00	1.968	0.203 424 40	
AC	0.000 552 25	1	0.000 552 25	2.246	0.177 677 37	
BC	0.000 900 00	1	0.000 900 00	3.659	0.097 329 92	
A ²	0.002 136 32	1	0.002 136 32	8.686	0.021 489 59	
B ²	0.004 662 00	1	0.004 662 00	18.956	0.003 339 05	
C ²	0.009 114 00	1	0.009 114 00	37.058	0.000 497 14	
残差 Residual	0.001 721 55	7	0.000 245 94			
失拟项 Lack of fit	0.001 264 75	3	0.000 421 58	3.692	0.119 683 36	不显著
纯误差 Pure error	0.000 456 80	4	0.000 114 20			
总和 Cor total	0.024 961 88	16				

注: $P < 0.05$, 显著; $P > 0.1$, 不显著。

Note: $P < 0.05$, significant; $P > 0.1$, not significant.

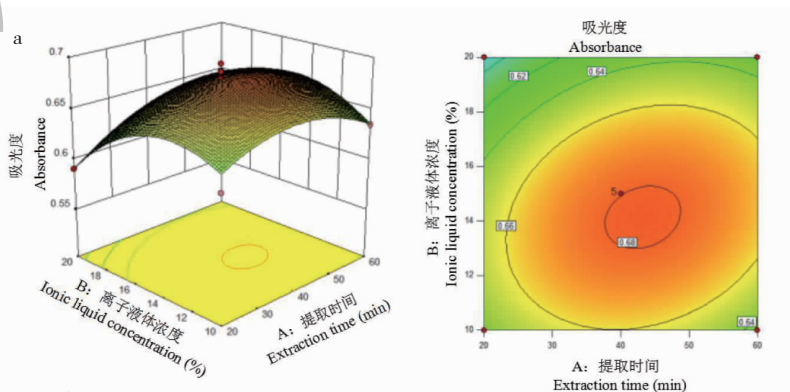
由表 12 可知, 模型 $P < 0.01$, 表明回归方程拟合度好且具有统计学意义, 而失拟项 $P = 0.119\ 68 > 0.05$, 差异无统计学意义, 即模型与试验的差异较小, 表明其他因素对实验的干扰较小, 残差可能由随机误差引起。

由回归模型显著性分析可知: $C > B > A$, 表明各单因素对实验结果的影响顺序为: 固液比 $>$ 离子液体浓度 $>$ 提取时间。

利用 Design Expert 10.0.7 软件得出各交互项的响应面图和等高线图(见图 1)。响应面图是一个

三维空间曲线图。可以从响应曲面图的斜率和曲面颜色的变暗趋势来判断因素之间相互作用的显著性。曲面的倾斜程度反映了各种因素对实验结果的影响程度, 越陡峭表示各种因素对响应值的影响越大。等高线图相当于响应面图的投影, 其性质反映了各种因素相互作用的强弱^[12]。

通过以上实验, 可以确定荞麦色素的最佳提取条件为, 氨酸磷酸盐溶液浓度 12%、固液比 1:22 (g: mL)、提取温度 80 °C、提取时间 44 min、提取次数 1 次、超声波功率为 50%。



续图 1(Continued Fig.1)

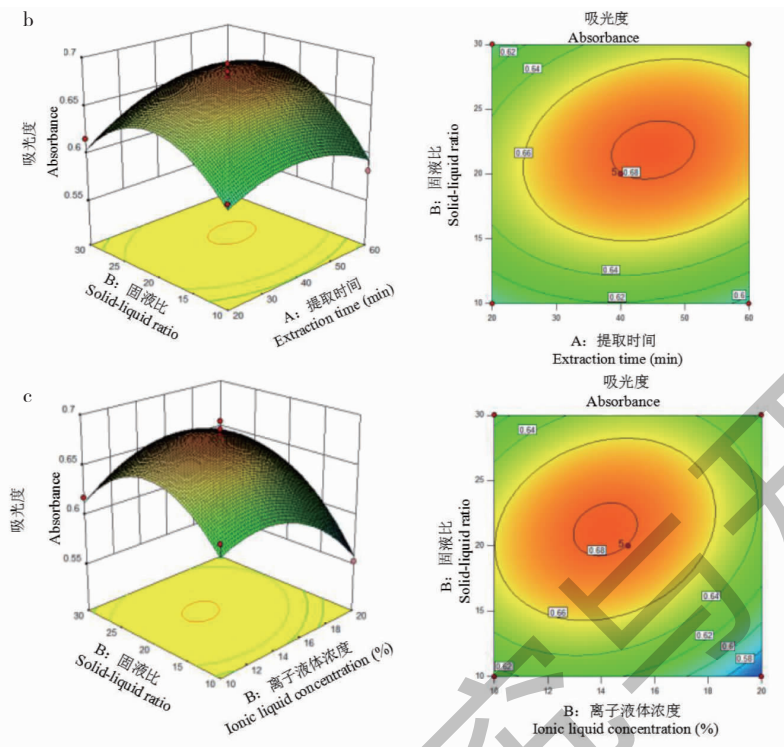


图1 各因素交互作用的响应面图与等高线图

Fig. 1 Response surface and contour map of interaction between factors

2.4 工艺验证试验

为便于实际操作,在上述实验研究筛选出的最佳提取条件做适当调整为精氨酸磷酸盐溶液浓度15%、固液比1:20(g:mL)、提取温度80℃、提取时间45min、提取次数1次、超声波功率为50%。并按最佳提取条件进行3批验证试验,测得的吸光度值分别为0.674、0.658、0.680。结果表明,RSD为1.69%,提取结果符合最佳工艺研究结果,说明工艺条件稳定。

2.5 稳定性实验

2.5.1 pH值对荞麦壳色素稳定性的影响

按“1.2.4.1”项下方法配制成色素浓度为0.1%的7种不同pH值溶液,室温放置,观察颜色变化并测定291nm处吸光度。

结果见表13,色素在不同pH溶液中稳定性的顺序为:pH8.0溶液>pH10.0溶液>pH12.0溶液>pH14.0溶液>pH6.0溶液>pH4.0溶液>pH2.0溶液;颜色深浅顺序与稳定性顺序相同。4h内,各溶液颜色均稍变浅。

表13 荞麦壳色素在不同pH溶液中的稳定性

Table 13 The stability of buckwheat hull pigment in different pH solutions

时间 Time (min)	pH2	pH4	pH6	pH8	pH10	pH12	pH14
0	0.808	0.959	0.96	0.979	0.986	0.992	0.981
1	0.784	0.886	0.954	0.956	0.985	0.99	0.979
3	0.769	0.885	0.977	0.997	0.986	0.986	0.975
5	0.742	0.881	0.958	0.961	0.989	0.989	0.961
30	0.736	0.882	0.948	0.972	0.987	0.981	0.954
60	0.721	0.873	0.945	0.975	0.984	0.975	0.938
120	0.703	0.864	0.948	0.972	0.982	0.969	0.921

续表 13 (Continued Tab. 13)

时间 Time (min)	pH2	pH4	pH6	pH8	pH10	pH12	pH14
180	0.689	0.854	0.896	0.965	0.979	0.962	0.905
240	0.675	0.852	0.895	0.962	0.975	0.956	0.899
300	0.665	0.841	0.896	0.958	0.975	0.948	0.889
720	0.652	0.835	0.894	0.956	0.976	0.935	0.896
900	0.649	0.839	0.889	0.952	0.974	0.931	0.889
1 080	0.638	0.791	0.886	0.946	0.972	0.926	0.882
1 200	0.625	0.789	0.889	0.942	0.974	0.921	0.874
1 500	0.614	0.772	0.885	0.939	0.971	0.918	0.865
1 800	0.612	0.768	0.885	0.942	0.971	0.913	0.851
2 100	0.612	0.744	0.886	0.934	0.974	0.909	0.845
2 400	0.609	0.73	0.884	0.932	0.972	0.899	0.833
2 700	0.608	0.725	0.885	0.929	0.971	0.901	0.836
2 880	0.609	0.725	0.885	0.929	0.972	0.899	0.833

2.5.2 金属离子对荞麦壳色素稳定性的影响

子的溶液,加入到荞麦色素中,观察颜色变化并测定

按“1.2.4.2”项下方法,配制含有不同金属离

其 PH 值,结果见表 14。

表 14 荞麦壳色素在不同金属离子溶液中的稳定性

Table 14 The stability of buckwheat hull pigment in different metal ion solutions

时间 Time (min)	Pb(CH ₃ COO) ₂	FeCl ₃	AlCl ₃	CuSO ₄	NaCl	CrCl ₃	CdSO ₄	CaSO ₄	KCl	H ₂ O
0	0.882	0.896	0.842	0.879	0.886	0.865	0.881	0.854	0.843	0.844
1	0.874	0.895	0.839	0.876	0.885	0.865	0.881	0.854	0.84	0.844
3	0.87	0.893	0.834	0.878	0.885	0.863	0.879	0.851	0.839	0.842
5	0.868	0.89	0.826	0.875	0.881	0.861	0.875	0.849	0.835	0.841
30	0.852	0.888	0.819	0.871	0.887	0.854	0.869	0.842	0.816	0.839
60	0.835	0.886	0.804	0.862	0.882	0.851	0.861	0.837	0.807	0.835
120	0.799	0.874	0.796	0.854	0.882	0.846	0.856	0.826	0.801	0.831
180	0.776	0.868	0.789	0.847	0.879	0.841	0.851	0.821	0.798	0.829
240	0.759	0.867	0.776	0.841	0.876	0.832	0.847	0.817	0.795	0.827
300	0.748	0.854	0.772	0.835	0.873	0.827	0.841	0.815	0.791	0.827
720	0.732	0.841	0.775	0.829	0.874	0.819	0.837	0.811	0.784	0.825
900	0.716	0.834	0.768	0.815	0.873	0.813	0.835	0.809	0.776	0.823
1 080	0.705	0.825	0.764	0.803	0.872	0.805	0.829	0.803	0.765	0.825
1 200	0.681	0.817	0.762	0.796	0.874	0.796	0.825	0.795	0.761	0.821
1 500	0.664	0.806	0.754	0.798	0.871	0.792	0.827	0.791	0.754	0.823
1 800	0.635	0.784	0.746	0.792	0.863	0.785	0.825	0.787	0.749	0.819
2 100	0.629	0.772	0.741	0.795	0.861	0.776	0.823	0.789	0.744	0.815
2 400	0.613	0.765	0.735	0.792	0.862	0.761	0.819	0.783	0.746	0.813
2 700	0.589	0.751	0.736	0.786	0.861	0.763	0.818	0.781	0.744	0.813
2 880	0.587	0.754	0.735	0.789	0.861	0.759	0.819	0.781	0.744	0.815

加 CdSO_4 的溶液颜色为浅蓝色、加 FeCl_3 的溶液颜色为淡黄色,二者 48 h 无明显颜色变化。其余金属离子均无色,加入色素后溶液呈淡棕色,48 h 内颜色无明显变化。

2.5.3 光照对荞麦壳色素稳定性的影响

按“1.2.4.3”项下方法,配制相同浓度的色素水溶液 2 份,分别用荧光灯和紫外灯在同一高度、同一时间照射,观察现象并测定 291 nm 处的吸光度值,结果见表 15。

表 15 荞麦壳色素在不同光照下的稳定性

Table 15 The stability of buckwheat hull pigment under different light sources

时间 Time (min)	紫外灯照射 UV lamp irradiation	日光灯照射 Fluorescent lamp illumination
0	0.832	0.832
1	0.829	0.831
3	0.817	0.827
5	0.805	0.825
30	0.781	0.819
60	0.764	0.813
120	0.753	0.806
180	0.741	0.801
240	0.735	0.798
300	0.729	0.795
720	0.721	0.788
900	0.713	0.786
1 080	0.706	0.788
1 200	0.684	0.785
1 500	0.659	0.786
1 800	0.642	0.786
2 100	0.627	0.784
2 400	0.621	0.785
2 700	0.619	0.784
2 880	0.617	0.785

紫外灯相较于日光灯对色素稳定性影响大。48 h 内,溶液颜色逐渐变浅。

2.5.4 温度对荞麦壳色素稳定性的影响

按照“1.2.4.4”项下方法,配制相同浓度色素水溶液,4 份,在不同温度(40、60、80、100 °C)下加热 30 min,冷却至室温后于 291 nm 处测定其吸光度并观察颜色变化,结果见表 16。

表 16 荞麦壳色素在不同温度下的稳定性

Table 16 The stability of buckwheat shell pigment at different temperatures

时间 Time (min)	40 °C	60 °C	80 °C	100 °C
0	0.825	0.836	0.842	0.868
1	0.825	0.835	0.841	0.867
3	0.823	0.831	0.837	0.863
5	0.821	0.829	0.833	0.861
30	0.817	0.817	0.827	0.852
60	0.815	0.813	0.823	0.843
120	0.815	0.806	0.821	0.829
180	0.813	0.799	0.816	0.817
240	0.811	0.796	0.811	0.805
300	0.811	0.787	0.803	0.786
720	0.809	0.781	0.784	0.778
900	0.807	0.783	0.778	0.764
1 080	0.805	0.776	0.773	0.756
1 200	0.807	0.776	0.768	0.747
1 500	0.803	0.779	0.761	0.733
1 800	0.803	0.774	0.749	0.725
2 100	0.801	0.772	0.745	0.727
2 400	0.805	0.765	0.743	0.723
2 700	0.803	0.771	0.745	0.721
2 880	0.801	0.764	0.743	0.721

温度越高,对荞麦壳色素稳定性影响越大。温度越高,初始溶液颜色越深,48 h 内,各温度条件下的溶液颜色逐渐变浅。

2.5.5 氧化剂和还原剂对荞麦壳色素稳定性的影响

按“1.2.4.5”项下方法,配制色素水溶液,共 10 份,取其中 5 份分别加入 10% 过氧化氢 100、200、300、400、500 μL ,加蒸馏水定容至 5 mL,观察现象并测定 291 nm 处吸光度;另取 5 份,分别加入 1.0% 亚硫酸氢钠 100、200、300、400、500 μL ,加蒸馏水定容至 5 mL,观察现象并测定 291 nm 处吸光度,结果见表 17 和表 18。

过氧化氢对荞麦壳色素稳定性影响较小。48 h 内颜色无明显变化;亚硫酸氢钠在初始 3 h 时对色素稳定性影响较大,3 h 后趋于稳定,48 h 内,溶液颜色微变深。

表 17 荞麦壳色素在不同体积氧化剂作用下的稳定性

Table 17 The stability of buckwheat hull pigment under the action of different volume oxidants

时间 Time (min)	100 μ L	200 μ L	300 μ L	400 μ L	500 μ L
0	0.658	0.647	0.633	0.628	0.616
1	0.658	0.647	0.633	0.628	0.616
3	0.656	0.645	0.631	0.627	0.616
5	0.656	0.641	0.631	0.627	0.613
30	0.647	0.641	0.628	0.624	0.608
60	0.643	0.632	0.625	0.621	0.601
120	0.645	0.635	0.624	0.618	0.587
180	0.646	0.632	0.626	0.615	0.583
240	0.645	0.633	0.62	0.611	0.585
300	0.646	0.635	0.624	0.613	0.583
720	0.645	0.632	0.626	0.611	0.583
900	0.643	0.633	0.624	0.609	0.581
1 080	0.643	0.635	0.62	0.606	0.583
1 200	0.645	0.632	0.621	0.609	0.581
1 500	0.643	0.632	0.62	0.609	0.577
1 800	0.641	0.631	0.615	0.603	0.579
2 100	0.641	0.632	0.613	0.605	0.576
2 400	0.64	0.631	0.613	0.603	0.577
2 700	0.641	0.632	0.615	0.603	0.577
2 880	0.640	0.632	0.613	0.601	0.575

表 18 荞麦壳色素在不同体积还原剂作用下的稳定性

Table 18 The stability of buckwheat hull pigment under the action of different volume reducing agent

时间 Time (min)	100 μ L	200 μ L	300 μ L	400 μ L	500 μ L
0	0.677	0.684	0.688	0.695	0.711
1	0.678	0.687	0.689	0.695	0.712
3	0.691	0.691	0.695	0.698	0.715
5	0.695	0.698	0.699	0.701	0.716
30	0.738	0.735	0.737	0.741	0.748
60	0.769	0.757	0.751	0.768	0.774
120	0.775	0.779	0.759	0.771	0.785
180	0.779	0.786	0.763	0.776	0.791
240	0.776	0.793	0.767	0.774	0.795
300	0.779	0.789	0.764	0.776	0.793
720	0.781	0.791	0.767	0.781	0.798
900	0.779	0.793	0.771	0.783	0.795
1 080	0.783	0.795	0.773	0.779	0.799

续表 18(Continued Tab. 18)

时间 Time (min)	100 μ L	200 μ L	300 μ L	400 μ L	500 μ L
1 200	0.783	0.791	0.776	0.783	0.801
1 500	0.781	0.793	0.774	0.785	0.799
1 800	0.783	0.791	0.778	0.787	0.803
2 100	0.781	0.795	0.785	0.786	0.806
2 400	0.781	0.793	0.781	0.789	0.806
2 700	0.783	0.793	0.787	0.791	0.803
2 880	0.781	0.795	0.785	0.789	0.806

2.6 抗氧化性能

2.6.1 DPPH 自由基清除能力

按“1.2.5.1”项下方法配制 DPPH 溶液,荞麦色素溶液和 Vc 溶液分别为供试品溶液和对照品溶液,分别加入 DPPH 溶液,在 518 nm 处测定吸光度值,计算其清除率,结果见表 19 和表 20。

表 19 荞麦壳色素对 DPPH 自由基的清除率

Table 19 Scavenging rate of buckwheat hull pigment on DPPH free radical

稀释倍数 Dilution ratio	清除率 Scavenging rate(%)
9	62.1
7	48.2
5	37.66
3	27.24
1	22.08

表 20 Vc 对 DPPH 自由基的清除率

Table 20 Scavenging rate of Vc on DPPH free radical

稀释倍数 Dilution ratio	清除率 Scavenging rate(%)
9	86.04
7	82.36
5	79.79
3	78.79
1	77.73

实验结果表明,与 Vc 相比,荞麦壳色素具有较好的 DPPH 清除能力。

2.6.2 超氧阴离子清除能力

按“1.2.5.2”项下方法制备 HCl 溶液,三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液以及邻苯三酚溶液,并配制荞麦色素待测样品溶液。

邻苯三酚自氧化速率 V_0 的测定:于 5 mL pH 8.2 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液中加入 2 mL 蒸馏水,恒温水浴 20 min,加入邻苯三酚溶液,采用紫外分光光度法测定吸光度。以时间为横坐标,吸光度为纵坐标,作线性回归,斜率即自氧化速率 V_0 。

荞麦色素及 Vc 清除超氧阴离子速率 V_1 的测定:三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液中加入不同浓度的样品溶液及对照品溶液,恒温水浴 20 min,邻苯三酚溶液,测定吸光度,将数据以时间为横坐标,吸光度为纵坐标,作线性回归,所得斜率即表示色素或 Vc 清除超氧阴离子的速率 V_1 ,结果见表 21 和 22。

表 21 荞麦色素对超氧阴离子的清除率

Table 21 Scavenging rate of buckwheat hull pigment on superoxide anion

稀释倍数 Dilution ratio	V_1	清除率 Scavenging rate(%)
1	0.017 1	34.64
3	0.018 0	41.73
5	0.018 4	44.88
7	0.019 6	54.33
9	0.021 4	68.5

表 22 Vc 对超氧阴离子的清除率

Table 22 Scavenging rate of Vc on superoxide anion

稀释倍数 Dilution ratio	V_1	清除率 Scavenging rate(%)
1	0.023 5	14
3	0.028 5	39.02
5	0.029 7	44.87
7	0.035 7	74.14
9	0.039 1	90.73

实验结果表明,与 Vc 相比,荞麦壳色素具有较

好的超氧阴离子清除能力。

2.6.3 羟自由基清除能力

按“1.2.5.3”项下方法制备一定浓度的磷酸缓冲溶液、邻菲罗啉溶液、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液以及过氧化氢溶液,分别加入到荞麦色素供试品溶液和 Vc 对照品溶液中,于 536 nm 下测定吸光值,按照公式(2)计算清除率,结果见表 23 和 24。

表 23 荞麦壳色素对羟自由基的清除率

Table 23 Scavenging rate of buckwheat hull pigment on hydroxyl radical

稀释倍数 Dilution ratio	清除率 Scavenging rate(%)
9	96.29
7	76.64
5	56.55
5	38.43
3	24.02

表 24 Vc 对羟自由基的清除率

Table 24 Scavenging rate of Vc on hydroxyl radical

稀释倍数 Dilution ratio	清除率 Scavenging rate(%)
9	96.94
7	84.49
5	61.57
5	48.47
3	36.24

实验结果表明。荞麦壳色素具有较好的羟自由基清除能力,与 Vc 相比无明显差异。

3 讨论与结论

荞麦壳色素为多酚类,故以碱性氨基酸离子液体为提取剂的提取效果应优于中性及酸性氨基酸离子液体,且碱性越强,提取效果越好,实验结果也予以了证实。磷酸-赖氨酸离子液体虽碱性较强,但因赖氨酸离子液体自身具有较深颜色,采用紫外法测定提取液吸光度时,赖氨酸离子液体自身的颜色掩盖了提取液的颜色,干扰检测,故测定结果为负值。因此,尽管赖氨酸离子液体为碱性离子液体,但无法判定其提取效果,故在后续实验研究中未予采用。

提取工艺单因素筛选实验中,提取次数的实验数据反映出提取 3 次效果最好,但通过分别测定第 1、2、3、4 提取液的吸光度值,发现随着提取次数增

加,单次提取液的吸光度值降低得很显著,而提取次数的增加必将大大增加成本和操作的复杂,故确定提取 1 次;提取温度的考察中最高温度设定为 80 $^{\circ}\text{C}$,是因为考虑到色素类化合物结构特点造成可能的热稳定性差,在长时间较高温度下提取色素可能会发生化学变化而影响提取率及色素的纯度。

稳定性实验结果提示,荞麦壳色素对光和金属离子的稳定性较好,而热稳定性差。同时,强酸强碱对色素的稳定性有明显的影,PH 值越接近中性,色素稳定性越好,pH 值偏碱性的色素溶液的稳定性较 pH 值偏酸性的色素溶液稳定性好。故建议荞麦壳色素生产过程应避免长时间与酸碱接触。

荞麦壳色素对光和金属离子的稳定性较好,对强酸、强碱及热稳定性差;偏碱性条件下的稳定性较偏酸性好,荞麦壳色素体外的抗氧化活性较好。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I(中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:325.
- 2 Lyu SY, Cheng C, Yan X, et al. Determination of magnolol and honokiol from *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils by HPLC-MS[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2020,36:321-330.
- 3 Xiao DM, Ma DH, Liu L, et al. Application of ionic liquids in pharmaceutical field [J]. Sci Technol Chem Ind(化工科技), 2019,27:76-80.
- 4 Liu W, Wang HP, Li X, et al. Extraction of purple potato pigment from lysine phosphate solution[J]. Chem Bioeng(化学与生物工程), 2015,32:42-46.
- 5 Deng Y, Cao JF, Zhang Y, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction linarin from *Cirsium setosum* by response surface methodology[J]. J Guizhou Normal Univ(贵州师范学院学报), 2019,35:6-12.
- 6 Zhu Y, Yin DH, Wu Z, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from Fructus Alpiniae by response surface methodology[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2019,37:1558-1561.
- 7 Wang S. Study on extraction process and stability of buckwheat hull pigment [D]. Changchun: Jilin Agricultural University(吉林农业大学), 2012.
- 8 Ren SL. Study on extraction, purification and stability of buckwheat hull pigment [D]. Hefei: Hefei University of Technology(合肥工业大学), 2007.