

# 基于氯化胆碱/乙酸的桑椹花青素高效提取工艺

张晓辉, 季青霞, 丁成新, 毕艳红\*, 赵祥杰, 王朝宇

(淮阴工学院生命科学与食品工程学院, 江苏淮安 223003)

**摘要:** 为建立新型绿色高效的桑椹花青素提取工艺体系, 该研究以桑椹为原料, 以低共熔溶剂 (Deep eutectic solvents, DESs) 为提取剂, 探讨了DESs种类、含水量、料液比以及提取温度和提取时间对花青素提取效率的影响, 并在单因素试验基础上, 采用响应面设计优化了提取工艺条件。结果显示: 在提取剂为氯化胆碱/乙酸 (1/3 *n/n*)-水 (80/20 *V/V*), 料液比为1/10 (g/mL), 提取温度为60 °C, 提取时间为40 min时, 花青素的得率达6.35 mg/g, 实验结果与响应面模型预测值接近, 表明模型适用。此工艺提取桑椹花青素的效率远高于传统提取剂, 这说明由适当比例氢键供体和受体所构成的DESs与目标产物之间强烈的氢键作用更有助于花青素的浸出和溶解。本研究结果为绿色可设计的DES溶剂用于天然产物的高效制备提供了借鉴。

**关键词:** 低共熔溶剂; 桑椹花青素; 单因素实验; 响应面分析

文章编号: 1673-9078(2021)11-288-294

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0153

## High-efficiency Extraction Process of Anthocyanins from Mulberry Based on Choline Chloride/Acetic Acid

ZHANG Xiaohui, JI Qingxia, DING Chengxin, BI Yanhong\*, ZHAO Xiangjie, WANG Zhaoyu

(School of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian 223003, China)

**Abstract:** In order to establish a new green and efficient process for extracting anthocyanins from mulberry, mulberry was used as the raw material and deep eutectic solvents (DESs) was used as the extractant to explore the effects of the types of DESs, water content, solid-liquid ratio, as well as extraction temperature and extraction time on the extraction efficiency of anthocyanins. On the basis of single factor experiments, the extraction conditions were optimized by response surface methodology. The results revealed that the yield of anthocyanins was 6.35 mg/g when the choline chloride/acetic acid (1/3 *n/n*)-water (80/20 *V/V*) was selected as the suitable solvent, solid-liquid ratio was 1/10 (g/mL), extraction temperature was 60 °C and extraction time was 40 min. The experimental result was close to the predicted value of the response surface model, indicating that the model is suitable. The extraction efficiency of this process for mulberry anthocyanins was much higher than that of traditional extractants, suggesting the strong hydrogen bonding between DESs and the target product (which was composed of a proper ratio of hydrogen bond donors and acceptors) was more conducive to the leaching and dissolution of anthocyanins. The results of this study provide a reference for high-efficiency preparation of natural products with green and designable DES solvents.

**Key words:** deep eutectic solvent; mulberry anthocyanin; single-factor experiment; response surface methodology

引文格式:

张晓辉,季青霞,丁成新,等.基于氯化胆碱/乙酸的桑椹花青素高效提取工艺[J].现代食品科技,2021,37(11):288-294

ZHANG Xiaohui, JI Qingxia, DING Chengxin, et al. High-efficiency extraction process of anthocyanins from mulberry based on choline chloride/acetic acid [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 288-294

桑椹为桑科植物 (*Morus alba* L.) 的果穗, 是一种药食两用中药材, 具有丰富的营养和药用价值<sup>[1-3]</sup>。

收稿日期: 2021-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31501421); 江苏省六大人才高峰项目 (SWYY-011, YY-061); 江苏省青蓝工程优秀青年骨干教师项目 (2016)

作者简介: 张晓辉 (1995-), 男, 在读硕士生, 研究方向: 生物化工, E-mail: zhangxh156@163.com

通讯作者: 毕艳红 (1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品酶学与食品加工, E-mail: byhfood@126.com

现代营养学研究表明, 桑椹含有丰富的总糖、维生素、矿物质和人体必需氨基酸等, 具有调节免疫力、降血脂、改善贫血、预防心血管疾病及改善新陈代谢等药理作用, 被誉为“21世纪的最佳保健果品”<sup>[4-6]</sup>。桑椹花青素是桑椹中关键的功能性成分, 尤以矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-芸香糖苷为主, 含量占到总花青素的90%以上<sup>[7]</sup>, 广泛用于酸性食品、日用品、医药保健食品等行业。

以“石化溶剂”为基础的传统花青素提取工艺往往

存在能耗高、污染环境、提取率低及工业化生产成本高的缺点<sup>[8]</sup>。且由于桑椹花青素结构中存在活性多羟基结构,其提取过程中对酸碱度、氧化还原剂、光照、温度及金属离子等因素敏感,极易导致活性丧失,从而改变色泽或色泽消失<sup>[9]</sup>。

低共熔溶剂(Deep eutectic solvent, DES)是一类由氢键受体(如季铵盐、季磷盐等)和氢键供体(如羧酸、酰胺或多元醇等)组成的共熔混合物,具有溶解化合物能力强、可设计、绿色可降解等优点,目前已开始应用于天然活性成分的分离提取、富集纯化等方面<sup>[10-13]</sup>。如Choi等<sup>[14]</sup>发现槲皮素、芦丁在氯化胆碱基DES中的溶解度是水相中的18~460,000倍,显示出DES对该类化合物优异的萃取能力。Dai等<sup>[15]</sup>考察了DES中长春花花青素的提取率及稳定性,结果表明此类花青素在乳酸-葡萄糖中的稳定性与酸性乙醇相比提高了3倍。

然而,尽管DES已展现出良好的科学价值和应用前景,但目前DES在上述领域的研究仍然停留在“试错法”阶段,尚无理论、经验规律可借鉴。为此本研究将以DES为提取剂,以桑椹花青素的高效提取为目标,探索DES的组成、结构与性质对花青素提取的影响,构建基于DES的花青素高效提取工艺,为活性天然产物的高效提取制备提供借鉴。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

桑椹鲜果,水分含量为85%,购于当地市场。氯化胆碱(CHCl)(≥98%)、尿素(UR)(≥99.5%)、冰乙酸(HA)(≥98%)、乳酸(HL)(≥98%)、乙二醇(EG)、丙二醇(PG)、甲醇、无水乙醇、浓盐酸、乙腈等,均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

LYO GT2 冷冻干燥机,上海将来实验设备有限公司;KQ-200VDE 三频数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;FA2004B 电子天平,上海精科天美科学仪器有限公司;85-2 恒温磁力搅拌器,上海皓庄仪器有限公司;UV-1800 紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;CT 15 RE 高速冷冻离心机,日本日立电子科技有限公司。

### 1.3 DES 的制备

依据参考文献<sup>[16]</sup>的方法并稍作修改。将不同量的氢键受体和氢键供体加入到反应瓶中磁力搅拌混合均

匀(60~80 ℃, 1~2 h),直到混合物变为无色澄清液体,之后转移至真空干燥箱中,用P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>充分干燥后备用。

### 1.4 桑椹花青素的提取

称取2 g 桑椹匀浆置于50 mL 透明玻璃螺口瓶中,按照一定的液料比加入不同的提取剂,放入超声波提取器中,在一定的温度和提取时间内进行超声提取。之后把混合液离心过滤(4 ℃, 3000 r/min, 20 min),取上清,在50 ℃下旋转蒸发并浓缩,之后冷冻干燥48 h,得到桑椹花青素粗提物。

### 1.5 桑椹花青素提取率的测定

参考已有研究<sup>[17]</sup>,采用pH示差法计算提取液中花青素的得率。在测得的花青素紫外最大吸收波长和700 nm 下采用紫外-可见分光光度法测定吸光度,含量计算公式如下:

$$\text{花青素得率}(\text{mg/g}) = \frac{A \times MW \times DF \times V}{\epsilon \times L \times m}$$

式中:

*A*——吸光值,此处  $A = (A_{\text{max}} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{\text{max}} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$ ;

*MW*——矢车菊素-3-葡萄糖苷分子量,449.2 g/mol;

$\epsilon$ ——矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔消光系数,26900 L/(mol·cm);

*DF*——稀释倍数;

*L*——光程,1 cm;

*V*——提取液的总体积, mL;

*m*——样品质量, g。

### 1.6 溶剂对桑椹花青素提取的影响

精确称取1 g 桑椹匀浆置于玻璃螺口瓶中,分别于不同的DES、去离子水、酸性乙醇(80%乙醇-0.4%盐酸*V/V*)、95%乙醇中超声提取(40 ℃, 10 min, 料液比1/10),离心过滤(4 ℃, 3000 r/min, 20 min),取上清液稀释6倍后测定花青素得率,实验平行三次。

### 1.7 桑椹花青素提取的单因素试验

#### 1.7.1 含水量对桑椹花青素提取的影响

精确称取1 g 桑椹匀浆置于玻璃螺口瓶中,以CHCl/HA(1/3)为提取剂(文中DES组成比例均为摩尔比),并分别添加0~100%(间隔为20%)水到提取剂中,超声提取(40 ℃, 10 min, 料液比1/10),离心过滤(4 ℃, 3000 r/min, 20 min),取上清液稀释6倍后测定花青素得率。

#### 1.7.2 料液比比对桑椹花青素提取的影响

精确称取 1 g 桑椹匀浆置于玻璃螺口瓶中, 以 CHCl<sub>3</sub>/HA (1/3) -H<sub>2</sub>O (80/20 V/V) 为提取剂, 分别以 1/4、1/7、1/10、1/13、1/16 为料液比, 超声提取 (40 °C, 10 min), 离心过滤 (4 °C, 3000 r/min, 20 min), 取上清液稀释 6 倍后测定花青素得率。

### 1.7.3 温度对桑椹花青素提取的影响

精确称取 1 g 桑椹匀浆置于玻璃螺口瓶中, 以 CHCl<sub>3</sub>/HA (1/3) -H<sub>2</sub>O (80/20 V/V) 为提取剂 (料液比 1/10) 于 30~70 °C (间隔 10 °C) 条件下超声提取 10 min, 离心过滤 (4 °C, 3000 r/min, 20 min), 取上清液稀释 6 倍后测定花青素得率。

### 1.7.4 提取时间对超声提取桑椹花青素的影响

精确称取 1 g 桑椹匀浆置于玻璃螺口瓶中, 以 CHCl<sub>3</sub>/HA (1/3) -H<sub>2</sub>O (80/20 V/V) 作为提取剂 (料液比 1/10), 于 60 °C 分别超声提取 10~50 min (间隔 10 min), 离心过滤 (4 °C, 3000 r/min, 20 min), 取上清液稀释 6 倍后测定花青素得率。

## 1.8 DES 中桑椹花青素提取的响应面优化

选取料液比、提取温度、提取时间三个影响较为显著的因素作为响应因子, 以桑椹花青素的得率为响应值, 应用 Box-Bohnken 中心组合法进行 3 因素 3 水平的试验, 进行响应面分析, 实验因素与水平设计见表 1。提取剂为氯化胆碱/乙酸 (1/3) -水 (80/20 V/V) 的响应面优化。

表 1 实验因素与水平设计

Table 1 Experimental factors and horizontal design

水平	因素		
	A 料液比	B 温度/°C	C 时间/min
-1	1:7	50	30
0	1:10	60	40
1	1:13	70	50

## 1.9 数据处理

使用 Origin 8 和 Design-Expert.V 8.0.6 进行数据处理、图表制作及数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 桑椹花青素最大吸收波长的测定

以提取剂作为空白组, 用紫外-可见分光光度仪在 400~600 nm 对 7 种不同类型的提取溶液进行全波长扫描, 得到桑椹花色苷的紫外-可见吸收光谱如图 1 所示。可以看出, 桑椹花青素在 CHCl<sub>3</sub>/HL (1/3)、CHCl<sub>3</sub>/HA (1/3)、CHCl<sub>3</sub>/PG (1/3)、HL、HA、去离子水和 95%

乙醇中的最大紫外吸收波长都在 521 nm 左右, 这与马义虔<sup>[18]</sup>和 Zhang 等<sup>[19]</sup>的研究报道一致。因此, 在本实验测定桑椹花青素得率时, 将 521 nm 作为桑椹花青素的最大紫外吸收波长。

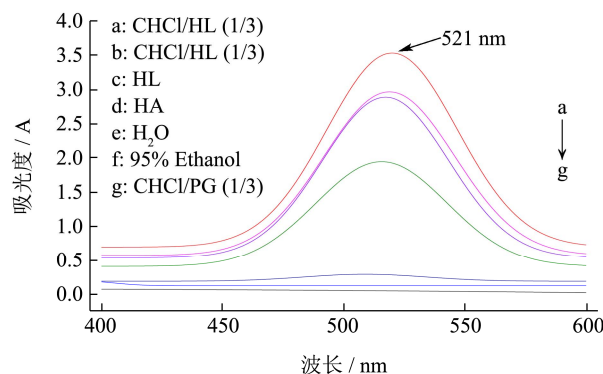


图 1 不同提取剂中桑椹花青素紫外-可见光扫描图

Fig.1 UV-visible spectroscopy of mulberry anthocyanins in different extraction solvents

## 2.2 提取剂对桑椹花青素提取得率的影响

表 2 提取剂对桑椹花青素提取得率的影响

Table 2 Effect of various solvents on the amount of anthocyanins

序号	yield from mulberry		
	DES	摩尔比	得率/(mg/g)
1	ChCl/Acetic acid	2/3	3.19±0.13
2	ChCl/Acetic acid	1/2	3.67±0.16
3	ChCl/Acetic acid	1/3	4.05±0.17
4	ChC/Acetic acid	1/4	3.50±0.16
5	ChCl/Acetic acid	1/5	3.23±0.12
6	ChCl/Urea	1/3	-
7	ChCl/Glycerin	1/3	0.15±0.01
8	ChCl/Lactic acid	1/3	3.75±0.17
9	ChCl/Ethylene glycol	1/3	0.61±0.02
10	ChCl/Propylene glycol	1/3	1.56±0.07
11	80% Ethanol-0.4% HCl	-	3.22±0.12
12	95% Ethanol	-	0.18±0.01
13	H <sub>2</sub> O	-	0.35±0.02

以有机酸、酰胺和多元醇为氢键供体, 以氯化胆碱为氢键受体制备了 10 种 DES, 再选取 3 种常用的提取溶剂 (80%乙醇-0.4%盐酸、95%乙醇和去离子水) 为对比, 考察了不同提取剂对桑椹花青素得率的影响。结果如表 2 所示, DESs 的组成、结构和性质以及不同的传统提取剂均会显著影响花青素的得率。在所选用的 DESs 中, 有 6 种显示出较好的提取效果, 其中以 CHCl<sub>3</sub>/HA (1/3) 的得率最高, 达 4.05 mg/g; 当 DES 的氢键供体为多元醇时, 花青素的得率普遍较低, 为 0.15~1.56 mg/g, 明显低于氢键供体为酸时的 DESs,

这是由于酸性提取环境更有利于保持花青素结构的稳定性,防止其降解<sup>[20]</sup>,这与罗政等<sup>[21]</sup>的研究结果一致。而当氢键供体是碱性尿素时,其与CHCl的组合并未表现出提取作用,CHCl/UR的强碱性可能是导致其无法用于桑椹花青素提取的主要原因。研究结果还表明,DES的氢键供体和受体的组成比例同样会影响花青素的得率,就CHCl/HA而言,随着CHCl与HA摩尔比由2/3逐渐减小至1/5,花青素的得率呈现先增加后降低的趋势,以1/3为最佳摩尔比。这主要归因于DES组成比例的变化会导致提取体系中氢键网络的变化,进而改变了其扩散传质、极性以及pH值等特性。而就传统提取溶剂而言,酸性溶剂80%乙醇-0.4%盐酸的提取得率显著优于95%乙醇和去离子水的得率,这与李金星等<sup>[22]</sup>和曾林等<sup>[23]</sup>的研究类似,说明酸性溶剂更有助于花青素的提取。

### 2.3 桑椹花青素提取得率的单因素实验

以CHCl/HA为提取剂,研究了水含量、料液比、提取温度及提取时间对桑椹花青素得率的影响。如图2a所示,DES中水的添加会显著的影响花青素的提取效果,如随着水含量的不断增加,花青素的得率呈现先增加后降低的趋势,当添加20%的水时花青素的得率最高,达4.59 mg/g。一般而言,DES本身的粘度较大,扩散系数小,单纯使用并不利于天然产物的提取。但Zeng等<sup>[24]</sup>在使用CHCl/UR从藜麦中提取总黄酮和20-羟基蜕皮激素时发现,在DES中添加一定比例的水会使DES的粘度明显下降,显著提高得率;但同时过量的水也会改变体系的氢键网络,减弱提取物与DES之间的氢键作用,导致目标成分的难溶解<sup>[25]</sup>。

本研究根据参考文献的报道,考察了料液比为1/4~1/16对桑椹花青素得率的影响(图2b),发现当料液比为1/10时,花青素的得率显著提高;继续增加料液比,得率的变化不明显,后续研究选择的料液比为1/10,此时得率为4.48 mg/g。天然产物的提取得率往往随着料液比的增加而增大,这是因为提取剂的增加不仅可降低提取体系的粘度,而且溶剂和固体之间浓度梯度的增加会增加体系的扩散速率,继而提高目的提取物与提取剂的接触面积,最终导致得率的增加。

Abbott等采用空穴理论模型得到的DES的热传输性质表明,升高温度将赋予DES更高的能量,从而提高了溶剂分子的流动性,增加体系的扩散速率<sup>[26]</sup>;此外升高温度还会提高细胞膜的通透性,更有利于天然化合物的浸出和溶解<sup>[27]</sup>。但过高的温度会破坏花青素的分子结构,导致得率的下降。如图2c所示,随着超声温度从30℃升至60℃,花青素的得率逐渐增加

至最大,继续升高温度,得率则迅速降低。综合考虑,CHCl/HA(1/3)-H<sub>2</sub>O(80/20 V/V)的适宜提取温度为60℃,与文献<sup>[28]</sup>报道的最优工艺的提取温度相近,此时得率为5.67 mg/g。

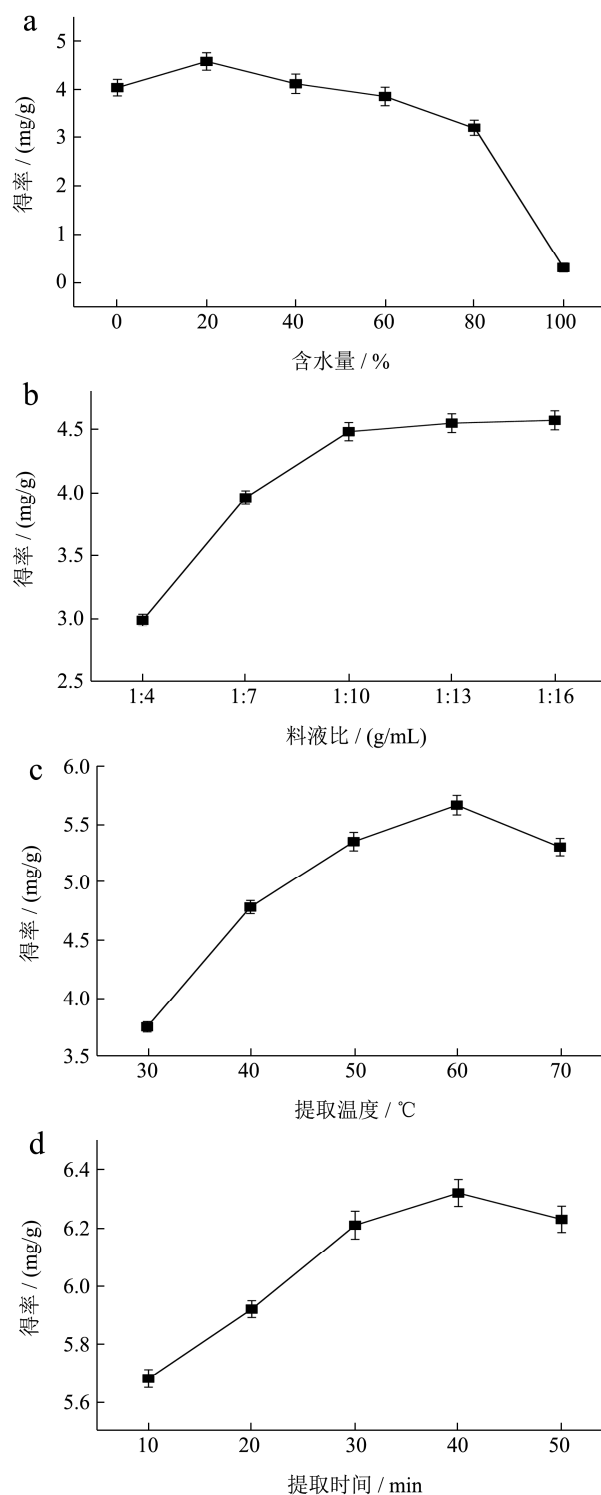


图2 不同因素对花青素提取得率的影响

Fig.2 The effect of several parameters on anthocyanins yield

注: a 含水量, b 料液比, c 温度, d 时间。

图2d的结果显示,随着超声时间的延长,花青素的得率也逐渐增加,并在40 min时达到最大,比文献

[28]报道的最优工艺的超声时间少 95 min, 此时得率为 6.32 mg/g; 但继续增加提取时间, 花青素的得率则呈现逐渐下降的趋势。延长超声时间一般会提高得率, 但时间过长会使花青素暴露在自然环境中导致其降解, 也会使其他非花青素成分大量溶出, 降低花青素的纯度[27]。

### 2.4 DES 中桑椹花青素提取的响应面优化

利用 Design-Expert 软件对表 3 中的响应面分析方案的试验数据进行多元回归拟合及显著性检验, 得到的回归方程的显著性检验及方差分析见表 3。

表 3 ChCl/HA (1/3)-H<sub>2</sub>O (80/20 V/V) 提取花青素的 Box-Behnken 试验设计

Table 3 Box-Behnken design for three variables and experimental results of anthocyanin yield using ChCl/HA (1/3)-water (80/20 V/V) as extraction solvent

编号	A 液料比	B 温度/°C	C 时间/min	Y 得率/(mg/g)
1	0 (10)	1 (70)	-1 (30)	5.96
2	0	1	1 (50)	6.00
3	0	0 (60)	0 (40)	6.30
4	1 (13)	-1 (50)	0	6.17
5	1	0	-1	6.19
6	-1 (7)	-1	0	6.05
7	0	0	0	6.35
8	-1	0	-1	6.04
9	0	0	0	6.32
10	1	1	0	6.18
11	-1	1	0	5.97
12	-1	0	1	6.06
13	0	0	0	6.34
14	0	0	0	6.35
15	0	-1	1	6.03
16	1	0	1	6.25
17	0	-1	-1	6.04

回归拟合后得到的方程为:  $Y=6.3348+0.0850A-0.0245B+0.0150C+0.0222AB+0.0114AC+0.0129BC-0.0565A^2-0.1830B^2-0.1437C^2$ 。从上表可以看出, 模型的  $F$  值为 98.94,  $p<0.0001<0.05$ , 这表明模型是显著的。失拟项  $F$  值为 0.5083,  $p$  值为 0.6975 $>0.05$ , 差异不显著, 说明该回归方程对实验拟合情况良好, 未知因素对实验结果的干扰性较小, 说明残差均由随机误差引起。同时, 上表中各项方差分析表明, A、B、A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup> 项 ( $p(Pr>F)<0.05$ ) 对花青素提取得率的影响效果是显著的, 但 C 项和 A、B、C 之间交互作用对花青素提取得率的影响不显著。从单因素来看,

对花青素提取得率影响从大到小为: A>B>C。预测系数  $Pred R^2=0.9567$  与调整相关系数  $R^2_{Adj}=0.9822$  也是合理的, 决定系数  $R^2=0.9922$  以及调整相关系数  $R^2_{Adj}=0.9822$  也表明实验拟合程度较好。

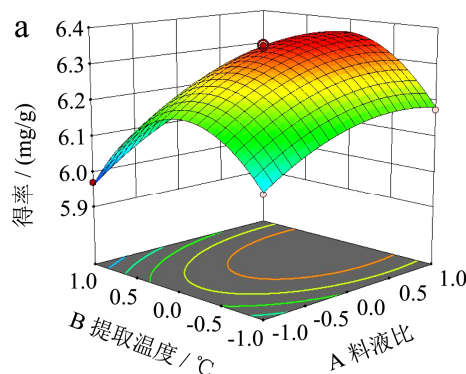
表 4 回归方程系数及显著性检验

Table 4 Regression equation coefficients and significant test

来源	均方和	自由度	均方差	F 值	p 值	显著性
模型	0.33	9	0.037	98.94	<0.0001	极显著
A	0.058	1	0.058	155.10	<0.0001	**
B	0.0048	1	0.0048	12.87	0.0089	**
C	0.0018	1	0.0018	4.80	0.0645	
AB	0.0020	1	0.0020	5.30	0.0549	
AC	0.0005	1	0.0005	1.40	0.2759	
BC	0.0007	1	0.0007	1.79	0.2229	
A <sup>2</sup>	0.014	1	0.014	36.14	0.0005	**
B <sup>2</sup>	0.14	1	0.14	378.93	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	0.087	1	0.087	233.67	<0.0001	**
残差	0.0026	7	0.0004		-	
失拟值	0.0007	3	0.0002	0.51	0.6975	不显著
纯误差	0.0019	4	0.0005		-	
总和	0.33	16	0.037	98.94	-	

注: \*表示显著 ( $p<0.05$ ); \*\*表示极显著 ( $p<0.01$ )。

图 3 显示了料液比和提取温度和时间对桑椹花青素得率的交互作用。由结果可知, 响应曲面越陡峭表明两者之间的交互作用对桑椹花青素得率的影响越显著, 且料液比、提取温度和时间对得率的影响依次减小。结合表 3 方差分析可知, 料液比与提取温度、提取温度与时间以及料液比与提取时间的交互作用对桑椹花青素的得率影响逐渐减小。由此可以得出 CHCl/HA (1/3)-H<sub>2</sub>O (80/20 V/V) 提取桑椹花青素最佳条件为: 料液比 1/10、超声温度 60 °C、超声时间 40 min, 在该条件下进行重复试验, 得到花青素的平均得率为 6.35 mg/g, 略小于试验预测值 6.36 mg/g, 说明模型可靠。同时, 本研究结果显著高于程秀玮等 [28] 人用酸性乙醇超声提取桑椹花青素的得率 5.09 mg/g。说明 DES 提取花青素是可行的。



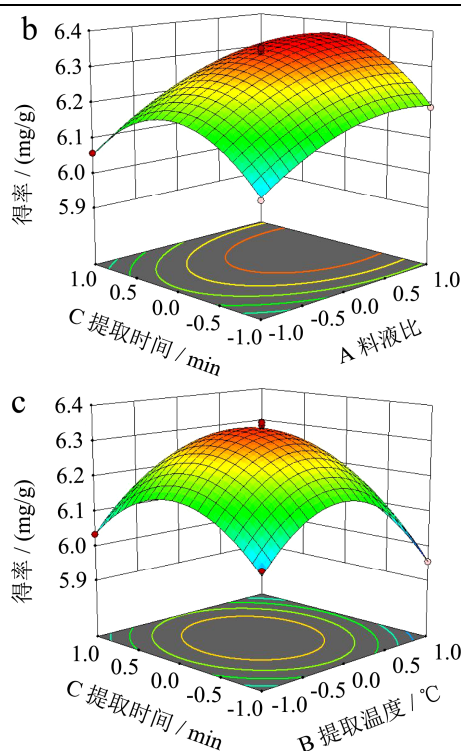


图3 不同因素对桑椹花青素得率的相互影响

Fig.3 Interaction effects of different factors on the mulberry anthocyanin yield

注: (a) A 和 B 的交互作用; (b) A 和 C 的交互作用; (c) B 和 C 的交互作用

### 3 结论

随着“绿色化学”概念的提出,人们对食品、药品及化妆品领域中所用溶剂的环保性和绿色性更为关注,而天然产物提取技术的“绿色”特性也主要体现在“溶剂”的选择上。本文以桑椹鲜果为原料,以超声方式为辅助手段,考察了新型绿色DES高效提取桑椹花青素的工艺,经响应面优化,花青素提取量高达6.35 mg/g。同时,本研究结果表明,由适当比例氢键供体和受体所构成的DESs在花青素提取过程中展现出了提取得率高、绿色无污染、简单易操作及原子经济等传统有机溶剂所无法比拟的优势,展现出了DES在天然产物提取中的强大潜力,为DES溶剂的绿色高效利用提供了有益参考。

### 参考文献

[1] Choi K H, Lee H A, Park M H, et al. Mulberry (*Morus alba* L.) fruit extract containing anthocyanins improves glycemic control and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic C57BL/Ksj-db/db mice [J]. Journal of Medicinal Food, 2016, 19(8): 737-45

[2] Yuan Q X, Zhao L Y. The mulberry (*Morus alba* L.) fruit - a

review of characteristic components and health benefits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(48): 10383-10394

[3] 赵秀玲,范道春.桑椹的生理活性成分、提取检测及药理作用研究进展[J].药物分析杂志,2017,37(3):378-385

ZHAO Xiuling, FAN Daochun. Review of physiological active components, extraction and detection methods and pharmacological bioactivities of mulberry [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2017, 37(3): 378-385

[4] Tam D N H, Nam N H, Elhady M T, et al. Effects of mulberry on the central nervous system: a literature review [J]. Current Neuropharmacology, 2021, 19(2): 193-219

[5] Lee S, Lee M S, Chang E, et al. Mulberry fruit extract promotes serum HDL-cholesterol levels and suppresses hepatic microRNA-33 expression in rats fed high cholesterol/cholic acid diet [J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1499

[6] Hu D W, Bao T, Lu Y, et al. Polysaccharide from mulberry fruit (*Morus alba* L.) protects against palmitic-acid-induced hepatocyte lipotoxicity by activating the Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 68(46): 13016-13024

[7] Huang L X, Zhou Y B, Meng L W, et al. Comparison of different CCD detectors and chemometrics for predicting total anthocyanin content and antioxidant activity of mulberry fruit using visible and near infrared hyperspectral imaging technique [J]. Food Chemistry, 2017, 224: 1-10

[8] Chemat F, Vian M A, Cravotto G. Green extraction of natural products: concept and principles [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(7): 8615-8627

[9] Khalifa I, Zhu W, Li K K, et al. Polyphenols of mulberry fruits as multifaceted compounds: compositions, metabolism, health benefits, and stability-a structural review [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 28-43

[10] 黄秀红,刘丽辰,阮怿航,等.响应面优化低共熔溶剂提取乌龙茶多糖的研究[J].食品研究与开发,2020,41(11):96-103

HUANG Xiuhong, LIU Lichen, RUAN Yihang, et al. Optimization of deep eutectic solvents extraction of polysaccharides from oolong tea by response surface methodology [J]. Food Research and Development, 2020, 41(11): 96-103

[11] Huang Y, Feng F, Jiang J, et al. Green and efficient extraction of rutin from Tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents [J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1400-1405

[12] Karimi M, Dadfarnia S, Shabani A M H, et al. Deep eutectic liquid organic salt as a new solvent for liquid-phase

- microextraction and its application in ligandless extraction and preconcentration of lead and cadmium in edible oils [J]. *Talanta*, 2015, 144: 648-654
- [13] Zhao B Y, Xu P, Yang F X, et al. Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica* [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2015, 3(11): 2746-2755
- [14] Dai Y T, Van S J, Witkamp G J, et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 766: 61-68
- [15] Dai Y T, Rozema E, Verpoorte R, et al. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents [J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1434: 50-56
- [16] Abbott A P, Griffith J, Nandhra S, et al. Sustained electroless deposition of metallic silver from a choline chloride-based ionic liquid [J]. *Surface & Coatings Technology*, 2007, 202(10): 2033-2039
- [17] 王玉书,赵爽,张琳,等.羽衣甘蓝花青素的定位及含量成分测定[J].*中国农业大学学报*,2020,25(11):45-53  
WANG Yushu, ZHAO Shuang, ZHANG Lin, et al. Location, content and composition determination of anthocyanin in kale [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(11): 45-53
- [18] 马义虔.桑椹花色苷的提取、纯化、微胶囊化及应用[D].贵阳:贵州大学,2016  
MA Yiqian. Extraction, purification, microencapsulation and application of mulberry anthocyanins [D]. Guiyang: Guizhou University, 2016
- [19] Zhang L X, Fan G J, Khan M A, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and identification of anthocyanin components from mulberry wine residues [J]. *Food Chemistry*, 2020, 323: 126714
- [20] 胡金奎.桑椹花青素的分离制备、结构分析及其体外活性[D].无锡:江南大学,2013  
HU Jinkui. Separation and preparation, structure analysis and *in vitro* activity of anthocyanins from mulberry fruits [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013
- [21] 罗政.桑椹花青素提取工艺的研究[D].南宁:广西大学,2017  
LUO Zheng. Study on extraction technology of anthocyanin from mulberry [D]. Nanning: Guangxi University, 2017
- [22] 李金星,胡志和,马立志,等.蓝莓加工过程中出汁率及花青素的稳定性[J].*食品科学*,2014,35(2):120-125  
LI Jinxing, HU Zhihe, MA Lizhi, et al. Juice yield and anthocyanins stability during the processing of blueberry [J]. *Food Science*, 2014, 35(2): 120-125
- [23] 曾琳,韩成云,赵志刚,等.不同提取方法黑米花青素的稳定性研究[J].*食品工业*,2018,39(8):6-10  
ZENG Lin, HAN Chengyun, ZHAO Zhigang, et al. Stability of anthocyanin extracted from black rice by different methods [J]. *The Food Industry*, 2018, 39(8): 6-10
- [24] Zeng J, Shang X C, Zhang P, et al. Combined use of deep eutectic solvents, macroporous resins, and preparative liquid chromatography for the isolation and purification of flavonoids and 20-hydroxyecdysone from *Chenopodium quinoa* Willd [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 776
- [25] Choi Y H, Van S J, Dai Y T, et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(4): 1701-1705
- [26] Abbott A P, Harris R C, Ryder K S. Application of hole theory to define ionic liquids by their transport properties [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111(18): 4910-4913
- [27] 郑覃,李建颖,杨璐,等.超声辅助提取黑果枸杞花青素的工艺优化[J].*食品工业科技*,2017,38(14):227-231  
ZHENG Tan, LI Jianying, YANG Lu, et al. Process optimization for ultrasonic-assisted extraction of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murray [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(14): 227-231
- [28] 程秀玮,魏玮,孙勇民.响应面法优化桑椹花色苷提取工艺的研究[J].*食品研究与开发*,2014,35(14):43-46  
CHENG Xiuwei, WEI Wei, SUN Yongmin. Optimization of anthocyanin extraction from mulberry by response surface methodology [J]. *Food Research and Development*, 2014, 35(14): 43-46