

温度和金属离子对黑米花青素稳定性的影响

张小花^{1,2}, 郭亚宾^{1,2}, 镇翊远², 赵思明², 牛猛², 张宾佳^{1*}

(¹西南大学食品科学学院 重庆 400715

²华中农业大学食品科学技术学院 武汉 430072)

摘要 以黑米花青素为研究对象,通过模拟典型的热加工环境(加热温度 60~100 ℃,加热时间 0~40 min,离子浓度 0~40 mmol/L),采用色差仪、紫外-可见分光光度计、荧光分光光度计等方法研究温度和金属离子(Na⁺、Ca²⁺)对黑米花青素热稳定性、抗氧化性、色度的影响。结果表明,在温度和金属离子的作用下,花青素的稳定性下降,100 ℃处理花青素溶液 40 min,Na⁺、Ca²⁺浓度达到 40 mmol/L 时,花青素的保留下降至 75%左右。温度和金属离子浓度提高时,花青素溶液的 L*值和 b*值增加,a*值下降,花青素的取代基或者助色基团减少,530 nm 处的紫外特征峰蓝移,而波长 280 nm 处仍有花色苷的紫外特征吸收峰。长时间的热处理(30 min 以上)会使花青素的抗氧化活性显著降低。花青素的降解遵循一级反应动力学规律,热降解活化能 E_a约 12.30 kJ/mol。温度和金属离子的影响会加快花青素的降解速率,在 100 ℃加热 30 min 花青素的保留率约为 79.8%。分子动力学模拟结果证实金属离子,尤其是 Ca²⁺对花青素稳定性的影响。相关性分析结果表明 Na⁺与花青素溶液体系的还原能力呈极显著负相关关系,而 Ca²⁺与花青素溶液体系的羟自由基清除率呈显著负相关关系。

关键词 黑米花青素; 温度; 金属离子; 抗氧化活性; 一级反应动力学; 分子动力学; 相关性分析

文章编号 1009-7848(2025)02-0143-15 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.02.013

花青素,作为类黄酮化合物的一种,是一种重要的水溶性天然色素。花青素具有类黄酮典型的 C6-C3-C6 的碳骨架结构(图 1),含有两个苯甲酰环(A、B 环)和一个含氧六元杂环(C 环)。游离态的花青素在自然界中存在较少,常通过糖苷键与葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等连接形成花色苷^[1]。花青素的抗氧化、抗炎等生理活性及其在调节肠道菌群、预防或者辅助治疗糖尿病和高胆固醇血症等慢性疾病的生理保健功效被广泛认可^[2-3]。花青素虽具有众多功效,但其化学性质活泼,其分子中的 2-苯基苯并吡喃阳离子结构的羟基化会降低其稳定性^[4]。在提取纯化、分离鉴定或者加工储存中,花青素的理化稳定性常受到金属离子、温度、光照、氧气、酶、pH 值等因素的影响^[5]。花青素进入人体后,对胃肠道 pH 值和消化酶也非常敏感,导致生物利用率有所降低^[6]。探究影响花青素稳定性的因素具有重要的意义。

影响花青素稳定性的因素主要包括其自身的

结构、温度、pH 值、酶、光照、氧化剂、还原剂以及金属离子等^[1,7-8]。花青素属于热敏性成分,高温会破坏花青素的结构^[7,9-10]。汪志慧等^[7]探究金属离子对莲房原花青素稳定性的影响时发现,Fe²⁺、Fe³⁺、Al³⁺、Pb²⁺等金属离子对花青素有明显的破坏作用,导致原花青素褪色,产生沉淀等。Mg²⁺、Zn²⁺或 Fe²⁺的存在不利于落叶松松塔原花青素热稳定性的保持,而还原剂 NaHSO₃的存在会提高原花青素的热稳定性^[8]。黑果枸杞花青素的保留率会随 pH 值的增大而降低,抗坏血酸、迷迭香、茶多酚、木糖醇可减少花青素在水相体系中的氧化^[11]。

关于影响花青素稳定性的研究很多,而其在食品加工中稳定性的变化机制尚未清晰。黑米为一种重要的有色稻米,其麸皮中积累大量的花青素^[12]。黑米中花青素组分单一,主要组分为矢车菊素-3-葡萄糖苷^[13]。本文以黑米花青素为原料,进行不同条件的热处理和离子处理,测定花青素的保留率、色度、抗氧化活性等指标,探究温度和金属离子对黑米花青素稳定性的影响,从而获得高稳定性花青素产品的制备条件,为有色米饭的营养、色彩控制提供理论参考。

收稿日期: 2024-02-08

基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2022BBA004)

第一作者: 张小花,女,硕士

通信作者: 张宾佳 E-mail: zbw9383@163.com

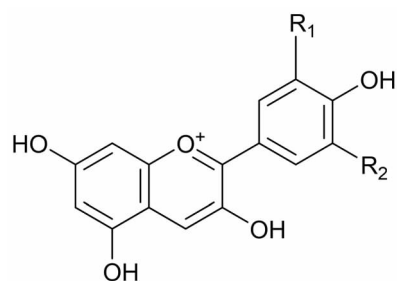


图1 花青素的基本结构

Fig.1 Basic chemical structure of anthocyanin

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花青素(来源于黑米花青素,经纯化后纯度为74.42%),湖北紫鑫生物科技有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、氧化钾、磷酸氢二钠、盐酸、DPPH、氯化亚铁、硫酸亚铁、铁氰化钾等,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

JAI2002 电子天平,上海分析仪器制造厂;722S 紫外-可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;UltraScanVIS 色差仪,美国 Hunterlab 有限公司;F-4500 荧光分光光度计,日本株式会社日立制作所;Acuity UPLC 高效液相色谱、Vion IMS Qtof 质谱仪,美国 Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 温度和金属离子处理对花青素稳定性的影响

1.3.1.1 花青素的纯化 参考 He 等^[14]的方法,在含有柠檬酸和磷酸氢二钠的 pH 3.0 缓冲液中加入称量好的花青素样品,配置成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,通过 3 ku 超滤膜,4 000 r/min 的转速离心 15 min,超滤去除多糖、蛋白质等大分子物质。将滤液负载于 AB-8 树脂柱(25 mm×100 mm),分别用 50%、70%和 80%的乙醇溶液梯度洗脱,并收集洗脱液至无色为止。将洗脱液于旋转蒸发仪内 40 °C 减压去除乙醇,再冷冻干燥,得到纯化后的花青素粉末,用 pH 示差法^[15]检测花青素的纯度。取 0.025 mol/L 的 pH 1.0 的 KCl 缓冲溶液和 0.4 mol/L 的 pH 4.5 的 CH₃COONa 缓冲溶液各 9 mL,分别加入需检测的花青素样品 1 mL,以去离子水为空白对照,分别测定其在波长 510 nm 处

的吸光度值($A_{510\text{nm}}$)和在波长 700 nm 处的吸光度值($A_{700\text{nm}}$)。

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5} \quad (1)$$

$$\text{花青素含量 (mg/L)} = (A \times M_w \times \text{DF}) \times 1000 / \epsilon \quad (2)$$

$$\text{花青素纯度 (\%)} = (\text{产物中的花青素质量} / \text{产物质量}) \times 100 \quad (3)$$

式中: A 为吸光度; M_w 为分子质量, g/mol,以矢车菊素葡萄糖苷作为计量标准, $M_w = 449.2$ g/mol; ϵ 为消光系数,以矢车菊素葡萄糖苷作为计量标准, $\epsilon = 26\,900$; DF 为稀释倍数, 10 倍。

1.3.1.2 花青素的鉴定 采用高效液相色谱设备,配合质谱仪和 C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)对提纯的花青素进行鉴定。流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),流速为 0.3 mL/min。梯度洗脱程序为:洗脱条件为 0~10 min, 5%~20% B; 10~22 min, 20%~40% B; 22~28 min, 40%~60% B; 28~38 min, 60%~65% B; 柱温为 25 °C, 进样量为 3 μL 。质谱条件:正离子模式电喷雾电离(ESI+)、毛细管电压 3 kV、离子源温度 120 °C、去溶剂温度 450 °C、锥孔电压 30 kV、锥孔气流 50 L/h、去溶剂气流 800 L/h、碰撞能量 6 eV、质荷比检测范围 100~1 000。样品质量浓度约为 1 000 mg/mL,进样量 1 μL 。

1.3.1.3 样品前处理 100 mL 蒸馏水中加入 20 mg 纯化后的花青素。配置 0.2 mg/mL 的花青素溶液,随后进行不同程度的加热和离子处理。

1.3.1.4 加热处理对花青素稳定性的影响 取一定量配置好的花青素溶液于 10 mL 离心管中,放置于 60, 70, 80, 90, 100 °C 的恒温水浴锅中,分别在 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 min 时取样后测定吸光度值。热稳定性分析的参数用色素保留率表示,其计算方法参考杨朝霞^[16]的方法。

$$\text{保留率 (\%)} = (A/A_0) \times 100 \quad (4)$$

式中: A 为处理后的吸光度值; A_0 为处理前的吸光度值。

根据非线性方程(5)拟合得到上述保留率相对于加热时间的曲线,得出平衡浓度和速度常数,以阿伦尼乌斯方程(6)求出活化能(E_a)。

$$y (\%) = ce^{-kt} \quad (5)$$

$$k (\text{mol/L} \cdot \text{s}) = k_0 \exp(-E_a/RT) \quad (6)$$

式中: y 为保留率,%; c 为平衡浓度, mmol/L; k

为速度常数, mol/L·s; t 为加热时间, min; k_0 为频率因子, L/mol·s; E_a 为活化能, kJ/mol; R 为气体常数, 8.314 J/(mol·K); T 为热力学温度, K。

1.3.1.5 金属离子处理对花青素稳定性的影响 分别将一定量的 Na^+ 和 Ca^{2+} 加入到定量的花青素溶液中, 使离子浓度最终达到 20 mmol/L。不同离子强度单因素设定为 0, 10, 20, 30, 40 mmol/L, 热处理时间为 30 min, 温度为 90 °C。

1.3.2 花青素色度测定 参照樊小静等^[17]的方法并稍加修改。取经过不同条件热处理的花青素溶液 5 mL, 冷却至室温后, 在透射模式下用色差仪测定样品色度, 记录 L^* 、 a^* 、 b^* 值。 L^* (亮度)、 a^* (红度)、 b^* (黄度) 表示颜色坐标。

1.3.3 花青素官能团的测定 花色苷单体用水溶解, 最终质量浓度为 0.2 mg/mL (花青素用水溶解, 最终质量浓度为 0.2 mg/mL)。加热处理后冷却至室温, 在波长 200~700 nm 范围进行紫外-可见光扫描, 每个样品设置 3 个平行。

1.3.4 抗氧化能力测定

1.3.4.1 DPPH 自由基清除率的测定 根据 Kumar 等^[18]的方法, 稍加修改, 测定花青素溶液体系的 2,2-二苯基-1-三硝基肼 (DPPH) 的自由基清除活性。取 1 mL 经过不同处理后的样品与 3 mL 现配的 DPPH 甲醇溶液混合均匀, 避光反应 30 min。在波长 517 nm 处测定吸光度值 A_i , 等体积的蒸馏水代替样品溶液为对照组 A_0 , 等体积的无水乙醇代替 DPPH 为空白组 A_j 。DPPH 自由基清除率参考式(7)计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100 \quad (7)$$

1.3.4.2 羟自由基清除率的测定 取 1.0 mL 样品溶液, 分别加入 1.0 mL 邻二氮菲 (0.75 mmol/L)、2.0 mL 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 和 1.0 mL 的 FeSO_4 溶液 (0.75 mmol/L), 混合均匀后加入 1.0 mL 的 H_2O_2 (0.01%), 37 °C 水浴保温 60 min, 然后测定其在波长 536 nm 处的吸光度值。羟自由基清除率参考式(8)计算。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = (A_{\text{样品}} - A_{\text{损}}) / (A_{\text{未损}} - A_{\text{损}}) \times 100 \quad (8)$$

1.3.4.3 还原能力的测定 参考 Kumar 等^[18]的方法, 稍加修改。1 mL 样品溶液中加入 2.5 mL 的磷

酸盐缓冲液 (pH 6.6, 0.2 mol/L) 以及 2.5 mL 的铁氰化钾溶液 (1%), 混合均匀。50 °C 孵育 20 min 后, 加入 2.5 mL 的三氯乙酸 (10%)。充分混匀后进行离心处理 (3 000 r/min, 10 min)。取 2.5 mL 离心后的上清液, 加入 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL 的 FeCl_3 溶液 (0.1%), 混匀后测定其在波长 700 nm 处的吸光度值。还原能力用吸光度值表示。吸光度值越大, 表示还原力越强。

1.3.5 分子动力学模拟 分子动力学模拟可大致分为初始结构模型搭建、体系溶剂化、体系结构优化并升温, 体系平衡优化以及长时间分子动力学模拟等 5 个基本流程^[19]。利用 ChemBioDraw Ultra 14.0 画出所带电荷为 1 的矢车菊素-3-O-葡萄糖苷结构, 导入 ChemBio3D Ultra 14.0 转化为三维结构, 并通过 MM2 能量最小化获得能量最低的结构^[20]。

优化后的矢车菊素-3-O-葡萄糖苷结构利用 gaff 力场生成 GROMACS 所需的拓扑和坐标文件。gmx editconf 将上述体系置于立方体盒子中。所用分子动力学模拟均采用 GROMACS 2021.4 软件进行, 选用 Amber 力场, 水分子采用 TIP3P 模型。

所有模拟的立方水盒子均采用 TIP3P 水分子模型。钠离子和氯离子添加到立方体水盒子中平衡电荷能量最小化, 保持体系中性。分子动力学分为能量最小化、平衡、成品模拟 3 个部分。使用最速下降法运行 5 000 步, 平衡阶段先在 NVT 系综下使用调速温控器耦合方法运行 50 000 步将体系温度升至 363 K, 再在 NPT 系综下运行 50 000 步, 使用 Parrinello-Rahman 恒压器将体系压强保持在 1×10^5 Pa^[21]。在 NPT 系综下使用蛙跳算法运行 100 ns 的成品模拟。整个模拟过程中长程静电截断判定方法使用粒子网格算法, 其截断距离为 1.0 nm。Lennard-Jones 势能法用来判定范德华相互作用, 其截断距离为 1.0 nm, 分子动力学过程中步长为 2 fs, 所有的分析均使用 GROMACS 自带的分析插件。

对模拟之前和模拟之后的花青素构象用 PyMOL 进行可视化展现, 其自带的 Wizard-Measure-Dihedrals 测定二面角。将上述构象采用 GaussView6.0 导入, 采用基组 6-31G(d) 和基态

DFT方法分别对两构象进行几何优化和频率计算(opt+freq),采用的关键字为:# opt freq b3lyp/6-31g(d) em=gd3bj scf=qc。所有计算由 Gaussian16 软件完成,最后将计算结果保存为 log 文件用于结果分析。

2 结果与分析

2.1 提纯花青素的鉴定

采用超高效液相色谱-质谱联用技术对黑米

提取物中花青素的成分鉴定。将质谱中大量分子离子和片段离子与文献数据进行比较来鉴定该化合物。由图 2a 可知,在波长 515 nm 检测波长下,花色苷提取物仅在 5.38 min 处有一个较大的色谱峰。由图 2b 可知,提纯花青素的一级离子峰为 449.10686 m/z ,而碎片离子峰为 287.05438 m/z ,这是由于分子离子峰丢失一分子己糖所致,并结合参考文献[22]可以确定提纯花青素的主要成分花色苷为 C3G(矢车菊素-3-O-葡萄糖苷)。

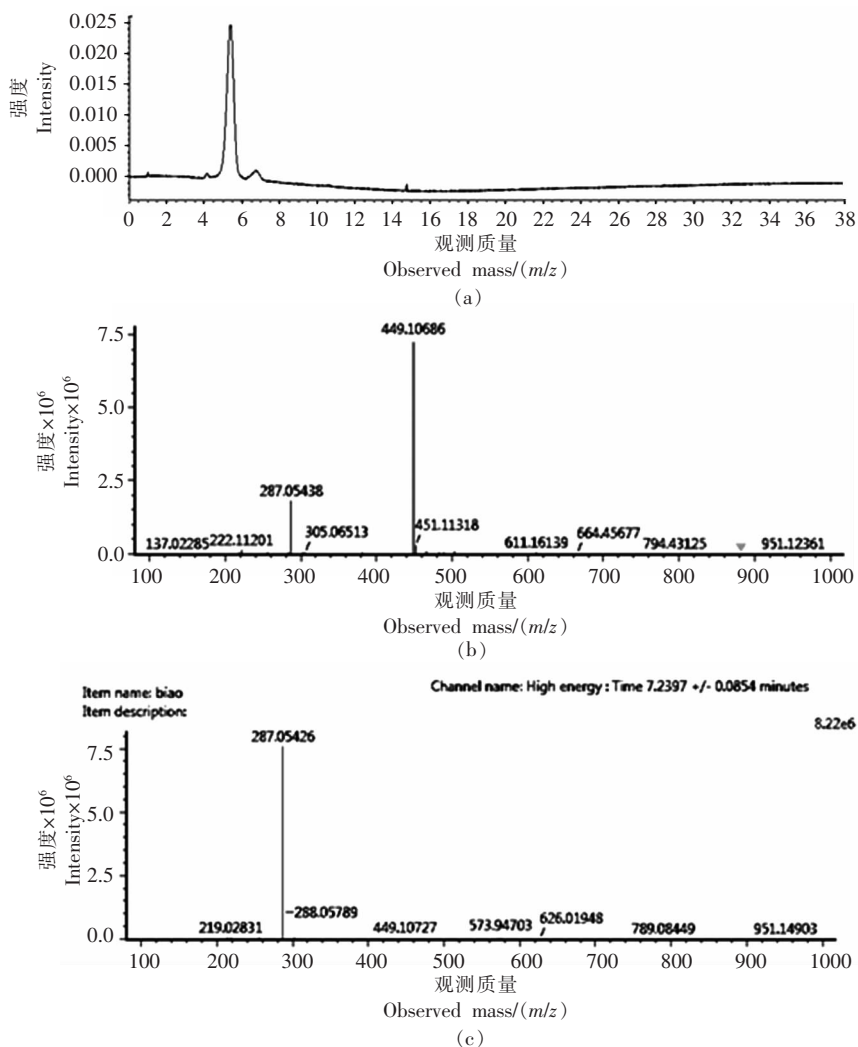


图2 提纯花青素的UPLC分析图(a)和一级(b)、二级(c)质谱鉴定图

Fig.2 UPLC analysis of purified anthocyanins (a) and primary (b) and secondary (c) mass spectrometry identification

2.2 温度和金属离子对花青素稳定性的影响

温度对花青素稳定性的影响如图 3a 所示。花青素的稳定性受加热时间和加热温度的影响。随着加热时间的延长,加热温度的升高,花青素的保

留率呈下降的趋势。由图可知,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热 40 min 时,花青素的保留率下降至 85% 左右。在 100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,加热 40 min 时,花青素的保留率下降至 75% 左右。在板栗壳原花青素稳定性的研

究中^[10],也得到了类似的结论,高温下,板栗壳原花青素发生氧化聚合反应,稳定性会有所下降。因此,花青素对热的敏感性导致含花青素的产品不适宜在高温环境下加工、运输和储存。

对花青素的保留率曲线进行拟合,拟合参数见表 1。花青素在热处理中的降解数据符合一级反应动力学,这与前人的研究成果一致^[5,23]。动力学速率常数 k 表示花青素的降解, k 值越低,则代

表花青素稳定性越高^[24]。从图 3b 中可以看出,花青素的降解速率常数 k 随着温度的升高也呈线性增加趋势。在 60 °C 时, k 值为 0.0034,而 100 °C 时, k 值为 0.0051,说明和高温条件相比,低温环境下的花青素稳定性较强。这是因为花青素的化学结构随着温度的升高发生了改性和降解,稳定性下降,降解速率加快^[24]。

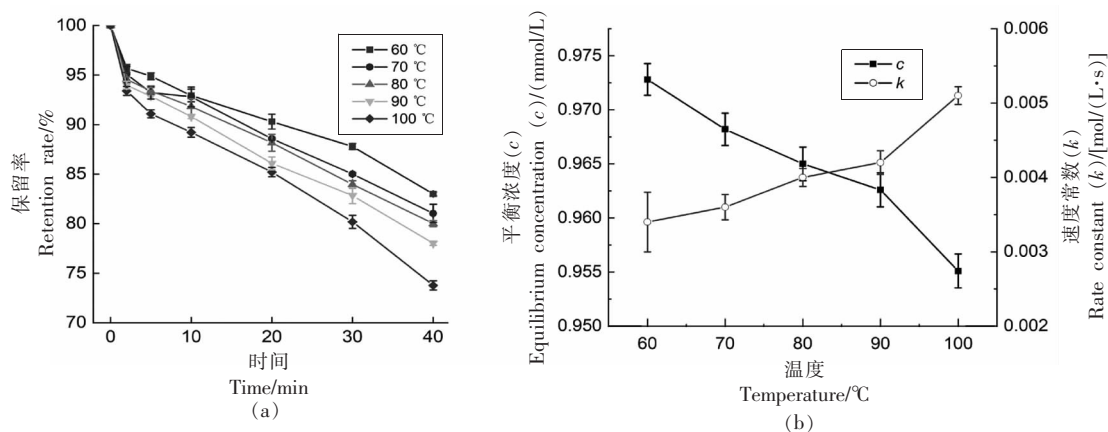


图 3 加热温度对花青素稳定性(a)及保留率拟合参数(b)的影响

Fig.3 Effects of heating temperatures on the stability of anthocyanins (a), and degradation dynamic curves of anthocyanin at different heating temperatures (b)

表 1 非线性拟合参数表

Table 1 Non-linear fitting parameter table

温度/°C	k /[mol/(L·s)]	c /(mmol/L)	F 值	P 值
60	0.0034 ± 0.0004 ^a	0.9728 ± 0.0014 ^a	56.229	0.0070
70	0.0036 ± 0.0002 ^b	0.9682 ± 0.0015 ^b	47.354	0.0010
80	0.0040 ± 0.0001 ^c	0.9650 ± 0.0015 ^b	47.021	0.0010
90	0.0042 ± 0.0002 ^d	0.9626 ± 0.0016 ^b	47.087	0.0010
100	0.0051 ± 0.0001 ^e	0.9551 ± 0.0016 ^c	40.869	0.0014

注:同一列中标注不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。

金属离子对花青素稳定性的影响如图 4 所示。在 Na^+ 和 Ca^{2+} 加入后,花青素的保留率会有所下降,且 Ca^{2+} 对花青素的破坏作用比 Na^+ 更为明显,汪志慧等^[7]在探究金属离子对莲房原花青素稳定性的影响时也证实了这一结果。从图 3a 中可以看出,当加热时间小于 5 min 时,也就是加热初期, Na^+ 和 Ca^{2+} 的加入在一定程度上增大花青素的吸光度,是因为金属离子在水中分解出酸,使得花青素在酸性条件下呈现不同的颜色,在加热初期对花青素有一定的护色作用^[25]。然而,当加热时间大于

5 min 时,金属离子的存在促进了花青素的降解。随着 Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度的增加,花青素保留率明显下降,当离子浓度达到 40 mmol/L 时, Na^+ 和 Ca^{2+} 组保留率下降至 75% 左右,较高的离子浓度促进了花青素的降解。总体来说,花青素的保留率均呈现随温度的升高而下降的趋势,且金属离子的存在使花青素保留率显著降低。因此,含有花青素的产品在加工过程中应尽量避免与高温和金属离子的接触。

进一步对金属离子存在下花青素的保留率曲

线进行非线性指数拟合,拟合参数见表2。与对照组相比,花青素的降解速率常数 k 在20 mmol/L Na^+ 或者 Ca^{2+} 的作用下增加了约1倍,说明花青素的稳定性在金属离子作用下遭到破坏。张乃珣等^[8]

指出,金属离子对原花青素的破坏,可能是由于与原花青素发生螯合,扰乱了原花青素溶液的平衡体系。

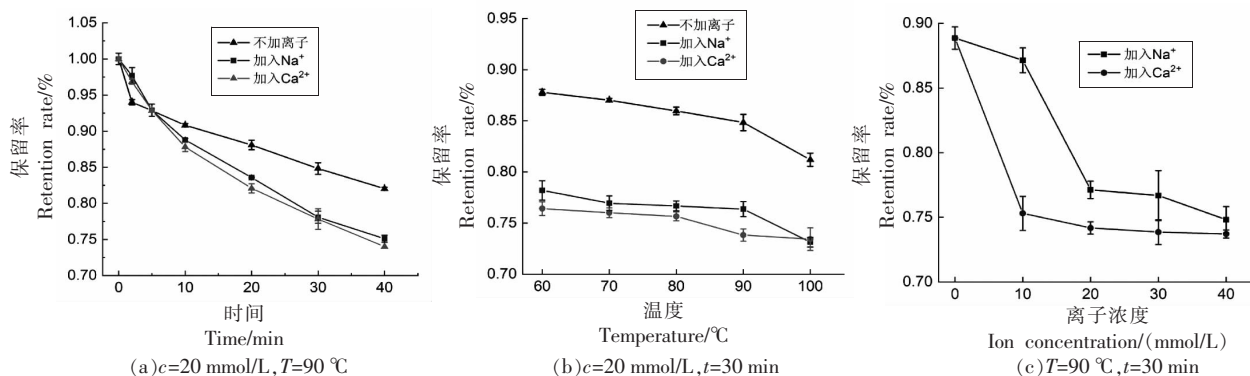


图4 花青素在不同加热时间(a)、不同加热温度(b)、不同离子浓度(c)作用下的稳定性

Fig.4 Stability of anthocyanins under different heating time (a), temperature (b), ionic strength (c)

表2 花青素在离子环境下加热的非线性拟合参数表

Table 2 Non-linear fitting parameters of anthocyanins heated in ionic environment

处理方式	$k/[\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{s})]$	$c/(\text{mmol}/\text{L})$	F 值	P 值
无添加	0.0042 ± 0.0002^a	0.9626 ± 0.0015^a	47.0872	0.0010
加 20 mmol/L Na^+	0.0072 ± 0.0003^b	0.9783 ± 0.0016^b	143.7760	0.0001
加 20 mmol/L Ca^{2+}	0.0075 ± 0.0002^b	0.9744 ± 0.0027^b	128.8980	0.0001

注:同一列中标注不同字母表示有显著性差异($P<0.05$)。

2.3 温度和金属离子对花青素色度的影响

颜色是考量花青素品质的重要指标。表3是在透射模式下利用色差仪测定花青素溶液的 L^* 、 a^* 、 b^* 值结果,其中 L^* 值代表亮度, L^* 值越大,说明样品亮度越高; a^* 值代表红绿色度, a^* 值越大,说明样品红色越深, a^* 值越小代表样品绿色越深; b^* 代表黄蓝色度, b^* 值越大,说明样品黄色度越深, b^* 值越小,代表样品蓝色度越深^[26]。 L^* 、 a^* 、 b^* 数值的变化可以直观地反映热处理和金属离子处理对花青素色度的影响。

在没有金属离子存在时,花青素水溶液的 L^* 值、 b^* 值与加热时间和加热温度呈正相关关系,随着加热时间和温度的增加呈上升趋势,而花青素水溶液的 a^* 值却呈下降趋势。当加热温度为100 °C,加热时间为30 min时,花青素水溶液体系的 L^* 值和 b^* 值分别从 22.08 ± 0.87 , 9.72 ± 0.39 增加至 27.18 ± 0.54 和 21.29 ± 0.52 ,而 a^* 值从

24.34 ± 0.43 下降到 23.14 ± 0.29 。当加热温度恒定,加热时间为40 min时,花青素水溶液的 L^* 值从 22.33 ± 0.49 增加至 28.44 ± 0.42 , b^* 值从 5.75 ± 0.23 增加至 18.42 ± 0.38 , a^* 值下降至 23.36 ± 0.46 。花青素颜色逐渐变亮,由一开始的深红色变为浅红色。 a^* 值没有增大反而变小,说明红色没有加深,并且 b^* 值受温度的影响较大,黄色增加使得颜色变浅。

在金属离子的作用下,花青素水溶液体系的色度变化与没有金属离子存在时呈相同的变化趋势,即 L^* 值和 b^* 值随着温度和时间的增加而显著增加, a^* 值有所下降。在加热温度和加热时间恒定的条件下,随着金属离子浓度的增高, L^* 值呈现上升趋势, a^* 值和 b^* 值总体呈现下降趋势。当 Na^+ 浓度上升到40 mmol/L时, L^* 值上升至 28.44 ± 1.03 , a^* 值和 b^* 值分别下降至 21.53 ± 0.08 和 16.88 ± 0.82 。当 Ca^{2+} 为40 mmol/L时, L^* 值为 27.13 ± 0.70 , a^* 值和 b^* 值分别为 22.71 ± 0.65 和 17.19 ± 0.45 。从

表 3 中可以看到,低浓度的 Ca^{2+} 较 Na^+ 有更大的 L^* 值和 b^* 值,这可能是因为 Ca^{2+} 离子与花青素发生螯合作用生成螯合物^[27],使色素褪色,从而导致 a^* 略低。郭思杙等^[28]的研究表明 Na^+ 和 Ca^{2+} 与其它金属离子相比,其对紫甘蓝花青素颜色稳定性无显著影响。这与本研究结论不一致,这可能是因为花青素种类不同,也有可能是因为评价指标,所用对比参数不同。

2.4 温度和金属离子对花青素抗氧化性的影响

DPPH 自由基清除法常用于评价多酚的体外抗氧化作用,已有研究表明花青素的质量浓度和 DPPH 自由基清除能力呈正相关关系^[29]。从图 5a 中可以看到,加热时间恒定时,金属离子的存在对花青素抗氧化性没有显著影响,且随着加热温度的升高,所有体系 DPPH 自由基清除率没有显著变化,说明此时温度对花青素抗氧化性没有显著影响。在图 5b 中,金属离子的存在,尤其是 Ca^{2+} 降低了花青素的 DPPH 自由基清除率,并且这种影响在加热时间为 20 min 时趋于稳定。此外,当加热温度和加热时间恒定时,低离子强度 ($\leq 30 \text{ mmol/L}$) 下, Na^+ 对花青素 DPPH 自由基清除率的影响显著高于 Ca^{2+} 。

不同加热温度和金属离子处理的花青素体系的羟自由基清除能力如图 5d~5f 所示。和 DPPH 自由基清除率一样,无离子作用时温度对其影响不大,在 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 时加入 Na^+ 的花青素清除率仅为 50% 左右。随着加热时间的增加,加入 Ca^{2+} 组的羟自由基清除率呈现先升高后下降的趋势,在 40 min 时下降明显。随着离子强度的升高,加入 Ca^{2+} 组的羟自由基清除能力较 Na^+ 组高,这说明 Ca^{2+} 对花青素的活性有一定的促进作用。

图 6 是加热温度,加热时间和金属离子对花青素还原能力的影响。在没有金属离子存在下,花青素溶液体系的还原能力均随着加热温度、加热时间和金属离子强度的增加呈下降趋势。在金属离子存在下,加热时间对花青素溶液体系的还原能力无显著影响。值得注意的是,高浓度的金属离子显著降低了花青素溶液体系的还原能力,整体上 Na^+ 对花青素还原能力的破坏作用更强。这是因为高浓度的离子加入后,和花青素进行螯合时,结合了带电基团,使花青素的失电子能力减弱,导致

表 3 不同处理条件下花青素色度变化

Table 3 Chromaticity changes of anthocyanins under different treatment conditions

样品编号	L^*	a^*	b^*
60-0-30	22.08±0.87 ^d	24.34±0.43 ^{ab}	9.72±0.39 ^a
70-0-30	23.28±0.32 ^c	24.54±0.32 ^a	11.84±0.21 ^b
80-0-30	23.99±0.25 ^c	24.55±0.22 ^a	15.47±0.36 ^c
90-0-30	25.17±0.24 ^b	23.78±0.47 ^{bc}	17.70±0.73 ^d
100-0-30	27.18±0.54 ^a	23.14±0.29 ^c	21.29±0.52 ^c
90-0-0	22.33±0.49 ^d	25.47±0.14 ^a	5.75±0.23 ^e
90-0-10	24.14±0.47 ^c	24.88±0.31 ^{ab}	11.59±0.35 ^d
90-0-20	25.52±0.54 ^b	24.55±0.28 ^b	15.22±0.34 ^c
90-0-30	26.76±0.23 ^a	24.18±0.44 ^b	17.20±0.16 ^b
90-0-40	28.44±0.42 ^a	23.36±0.46 ^c	18.42±0.38 ^a
Na^+ 60-20-30	25.01±0.39 ^c	22.61±0.39 ^a	8.60±0.24 ^c
Na^+ 70-20-30	25.56±0.36 ^{bc}	22.79±0.36 ^a	10.86±0.12 ^d
Na^+ 80-20-30	26.27±0.17 ^b	22.72±0.19 ^a	14.08±0.20 ^c
Na^+ 90-20-30	27.19±0.67 ^a	22.31±0.26 ^a	16.63±0.16 ^b
Na^+ 100-20-30	27.76±0.35 ^a	21.21±1.04 ^b	20.24±1.37 ^a
Na^+ 90-20-0	22.33±0.49 ^d	25.47±0.14 ^a	5.75±0.23 ^e
Na^+ 90-20-10	24.14±0.47 ^c	24.88±0.31 ^{ab}	11.59±0.35 ^d
Na^+ 90-20-20	25.52±0.54 ^b	24.55±0.28 ^b	15.22±0.34 ^c
Na^+ 90-20-30	26.76±0.23 ^a	24.18±0.44 ^b	17.20±0.16 ^b
Na^+ 90-20-40	28.44±0.42 ^a	23.36±0.46 ^c	18.42±0.38 ^a
Na^+ 90-0-30	26.31±0.12 ^{ab}	24.41±0.17 ^a	17.74±0.11 ^b
Na^+ 90-10-30	22.81±0.84 ^b	23.93±0.21 ^a	21.26±0.19 ^a
Na^+ 90-20-30	26.81±0.14 ^a	22.71±0.09 ^{ab}	17.20±0.09 ^{ab}
Na^+ 90-30-30	27.47±0.41 ^a	22.72±0.04 ^{ab}	17.20±0.03 ^{ab}
Na^+ 90-40-30	28.44±1.03 ^{ab}	21.53±0.08 ^b	16.88±0.82 ^b
Ca^{2+} 60-20-30	24.25±0.75 ^c	22.73±0.19 ^c	8.97±0.13 ^c
Ca^{2+} 70-20-30	24.57±0.75 ^c	22.52±0.08 ^{bc}	10.88±0.14 ^d
Ca^{2+} 80-20-30	26.55±0.71 ^b	21.95±0.39 ^{bc}	13.57±0.65 ^c
Ca^{2+} 90-20-30	27.48±0.75 ^b	21.82±0.66 ^{ab}	16.27±0.66 ^b
Ca^{2+} 100-20-30	29.62±0.58 ^a	21.26±0.38 ^a	20.18±0.18 ^a
Ca^{2+} 90-20-0	24.70±0.45 ^b	23.36±0.40 ^a	4.79±0.28 ^d
Ca^{2+} 90-20-10	27.86±0.73 ^a	22.08±1.02 ^{abc}	13.55±0.75 ^c
Ca^{2+} 90-20-20	28.37±0.65 ^a	22.89±0.56 ^{ab}	14.11±0.19 ^c
Ca^{2+} 90-20-30	28.64±1.07 ^a	21.63±0.39 ^{bc}	15.70±0.43 ^b
Ca^{2+} 90-20-40	28.58±0.50 ^a	21.16±0.93 ^c	16.83±0.89 ^a
Ca^{2+} 90-0-30	26.31±0.12 ^a	24.41±0.17 ^a	17.74±0.11 ^a
Ca^{2+} 90-10-30	27.23±0.99 ^a	22.70±0.26 ^b	17.07±0.20 ^b
Ca^{2+} 90-20-30	26.44±0.43 ^a	22.41±0.43 ^b	17.13±0.20 ^b
Ca^{2+} 90-30-30	26.71±1.10 ^a	22.62±0.40 ^b	17.10±0.03 ^b
Ca^{2+} 90-40-30	27.13±0.70 ^a	22.71±0.65 ^b	17.19±0.45 ^b

注: 样品编号列 a-b-c 中: a 表示加热温度 ($^\circ\text{C}$), b 表示离子浓度 (mmol/L), c 表示加热时间 (min), 如 60-0-30 表示无离子浓度, 60 $^\circ\text{C}$ 条件下加热处理 30 min; 同一列中标注不同小写字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。

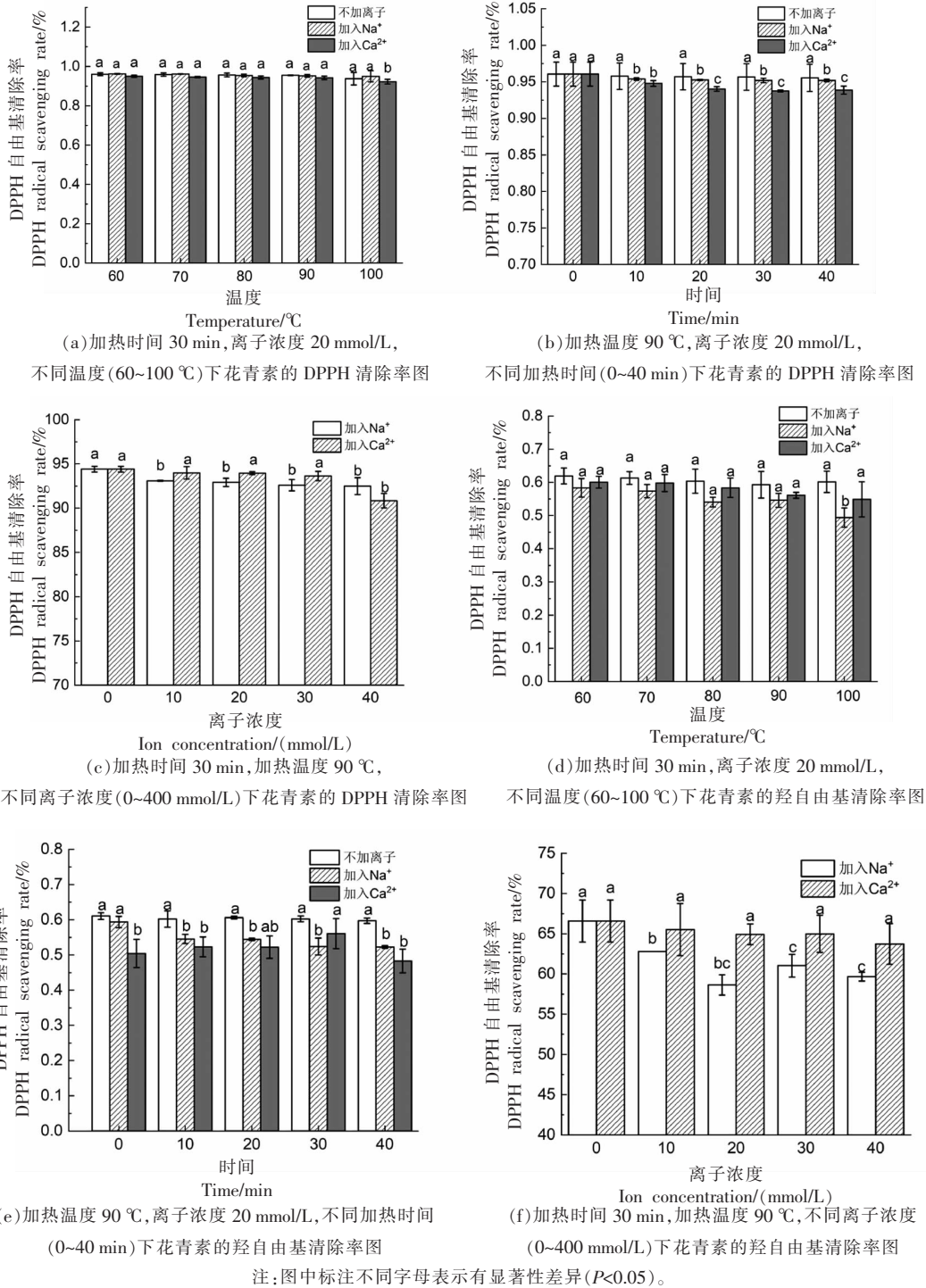


图 5 不同温度、不同加热时间、和不同离子强度热处理下花青素的 DPPH 自由基清除率 (a~c) 和羟自由基清除率 (d~f)

Fig.5 DPPH radical scavenging rate (a~c) and hydroxyl radical scavenging rate (d~f) of anthocyanins under different temperature, heating time and ion intensity

还原能力的降低^[8]。

2.5 温度和金属离子对花青素官能团的影响

图 7a~7f 是加热温度对花青素官能团的影

响。花青素单体紫外-可见吸收光谱图的最大吸收波长分别在可见光区 535 nm 和紫外光区 280 nm 左右, 说明经过热处理的花青素溶液依然具有花

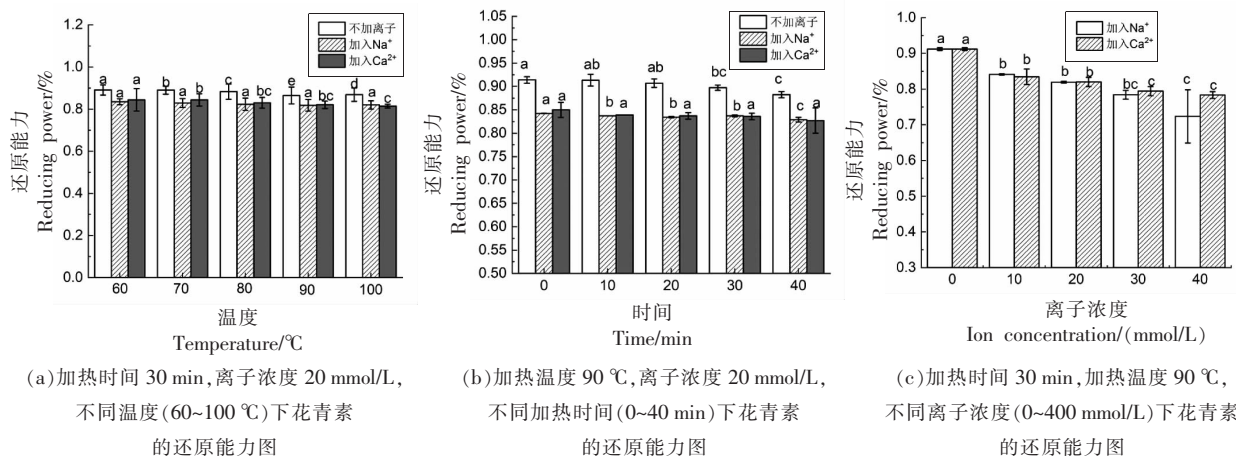


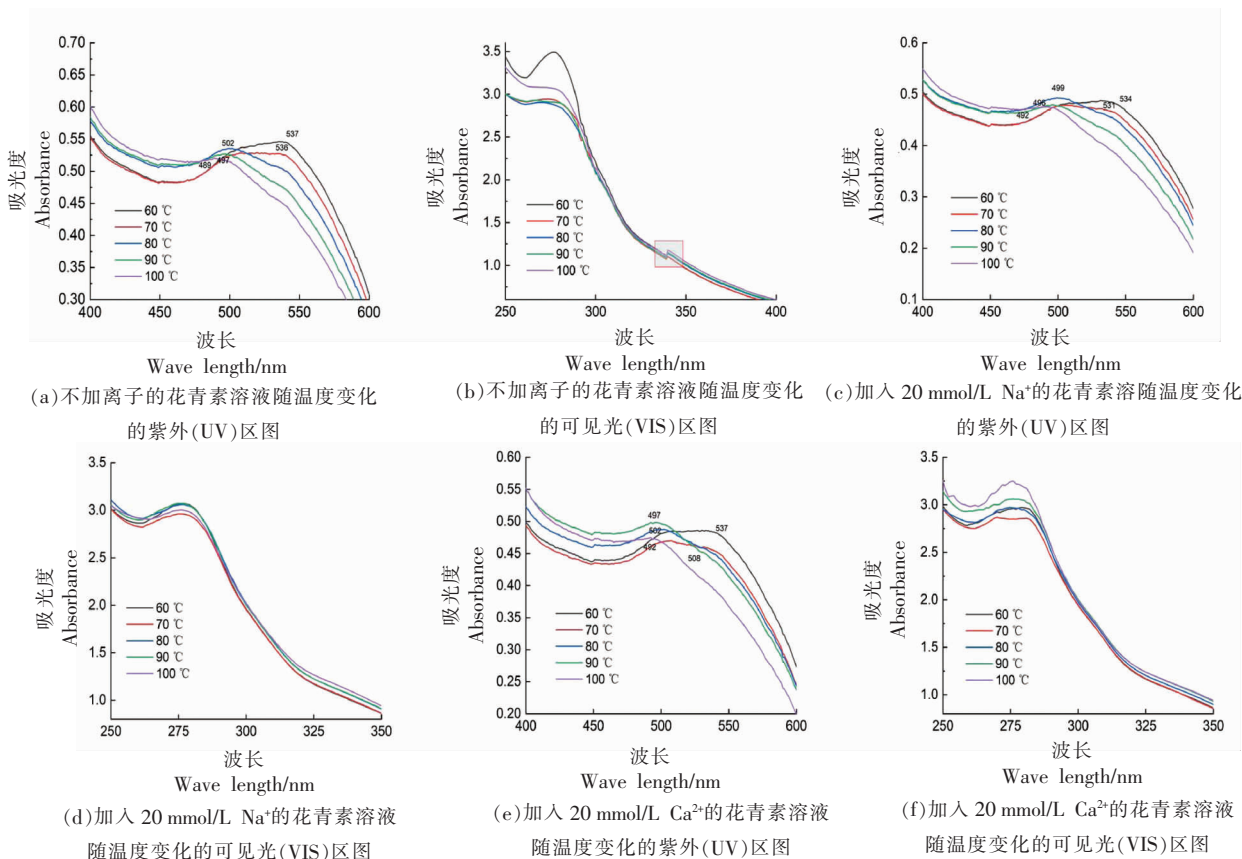
图 6 不同温度 (a)、不同加热时间 (b) 和不同离子强度 (c) 处理下花青素的还原能力

Fig.6 The reducing ability of anthocyanins under different temperature (a), heating time (b), ionic strength (c)

色苷的特征峰^[30]。530 nm 的特征峰位置随着加热温度的增加发生蓝移, 吸光度值也有所下降, 这可能是由于高温破坏了取代基和助色基团。有研究指出, B 环上羟基的减少导致有机物化学结构变化, 出现蓝移的现象^[31]。同时从图 7b 观察到, 无金属离子存在时, 当温度升高到 70 °C 以上时, 在

340 nm 处出现了新吸收峰, 这可能是由于花青素的结构在高温下被破坏。

图 7g~7l 是加热时间对花青素官能团的影响。在不同加热时间下, 花青素单体紫外-可见吸收光谱的最大吸收波长依然在 530 nm 和 280 nm 左右。没有金属离子存在下, 加热 0 min 时的



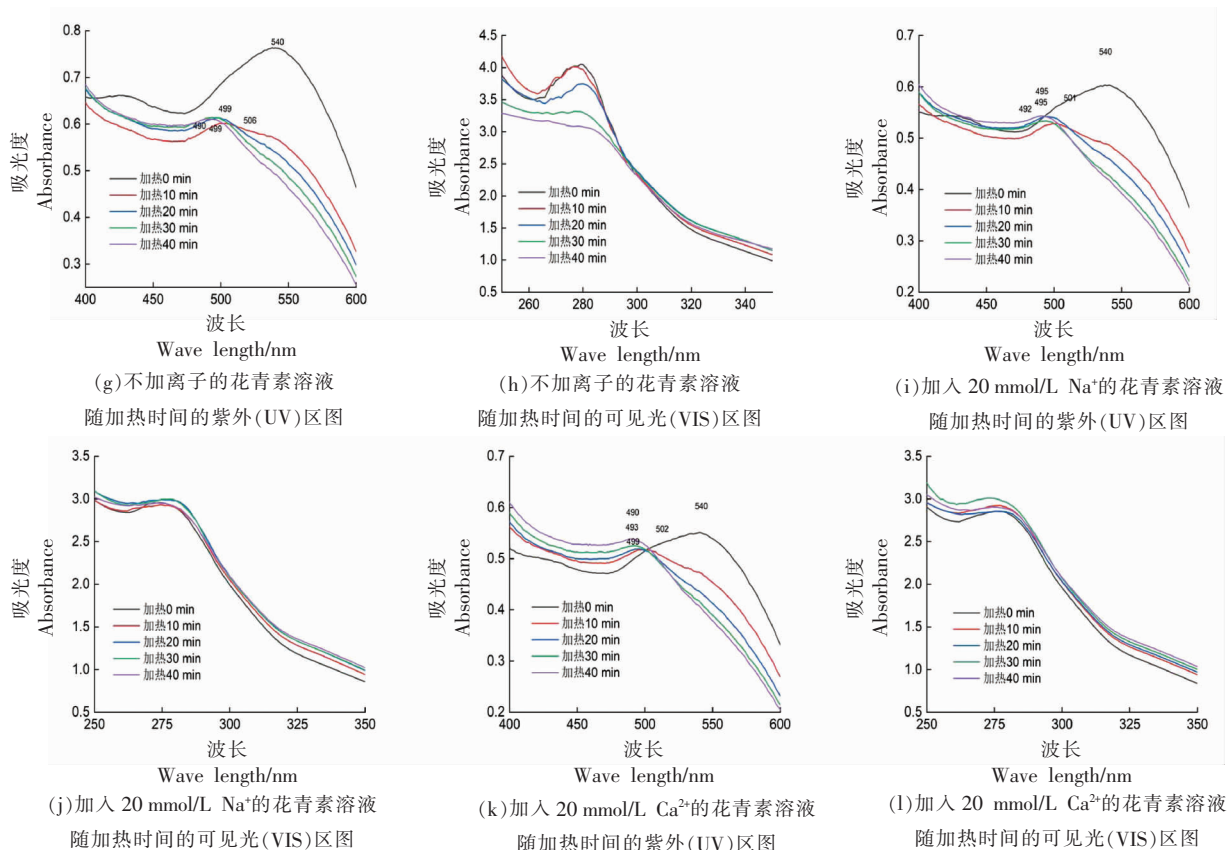


图7 不加离子、加入 20 mmol/L Na^+ 和加入 20 mmol/L Ca^{2+} 的花青素溶液随加热温度(a~f)和加热时间(g~l)变化的UV-VIS图谱

Fig.7 UV-VIS spectra of anthocyanin solutions without ion, with 20 mmol/L Na^+ and 20 mmol/L Ca^{2+} as a function of heating temperature (a~f) and heating time (g~l)

花青素单体吸收峰明显高于加热更长时间的花青素单体的吸收峰,并且加热时间越长,花青素单体的吸收峰高度越低,这说明持续加热会显著降低峰强(即吸光度),影响花青素的稳定性,这也证明了本文前面的结论。

图8是离子强度对花青素官能团的影响。从图中可以看出金属离子存在时,吸收峰的高度在 Na^+ 或 Ca^{2+} 的影响下而降低。然而,当离子浓度达到一定值时,峰高和峰位置的变化并不明显,说明高浓度的 Na^+ 和 Ca^{2+} 对花青素的影响较小。和 Na^+ 相比,加入 Ca^{2+} 后,峰的高度下降更为明显,说明助色基团可能与 Ca^{2+} 螯合,导致峰强降低,颜色减弱,这与色度数据相符合。金属离子导致黑米花青苷色素吸收光谱的变化,原因可能是色素分子与金属离子发生配合作用,使特征吸收峰发生变化;也有可能是因为部分金属离子在水溶液中形成水

合离子本身呈现出的颜色与黑米花青素的颜色彼此复合遮蔽^[30]。

2.6 分子动力学特性

均方根偏差(RMSD)可以反映系统是否处于平衡状态^[32]。图9a是花青素分子相对于初始结构原子位置的RMSD,可以看出花青素在90℃(363K)的MD模拟过程中构象相对于初始位置的变化。同时将其0ns和不同环境下的100ns的构象利用PyMOL进行可视化处理(图10)。可以观察到,在前30ns,无金属离子存在时,花青素分子构象发生了轻微变化,之后的RMSD的振荡范围较小并逐渐趋于稳定。从图10中可以看出,无离子组模拟后的构象对比模拟前更舒展,键角也发生了变化,更加稳定,符合RMSD的结果。 Na^+ 加入后的RMSD值比无离子组的RMSD值高,说明加入 Na^+ 后花青素的稳定性受到影响,这与本文之前金

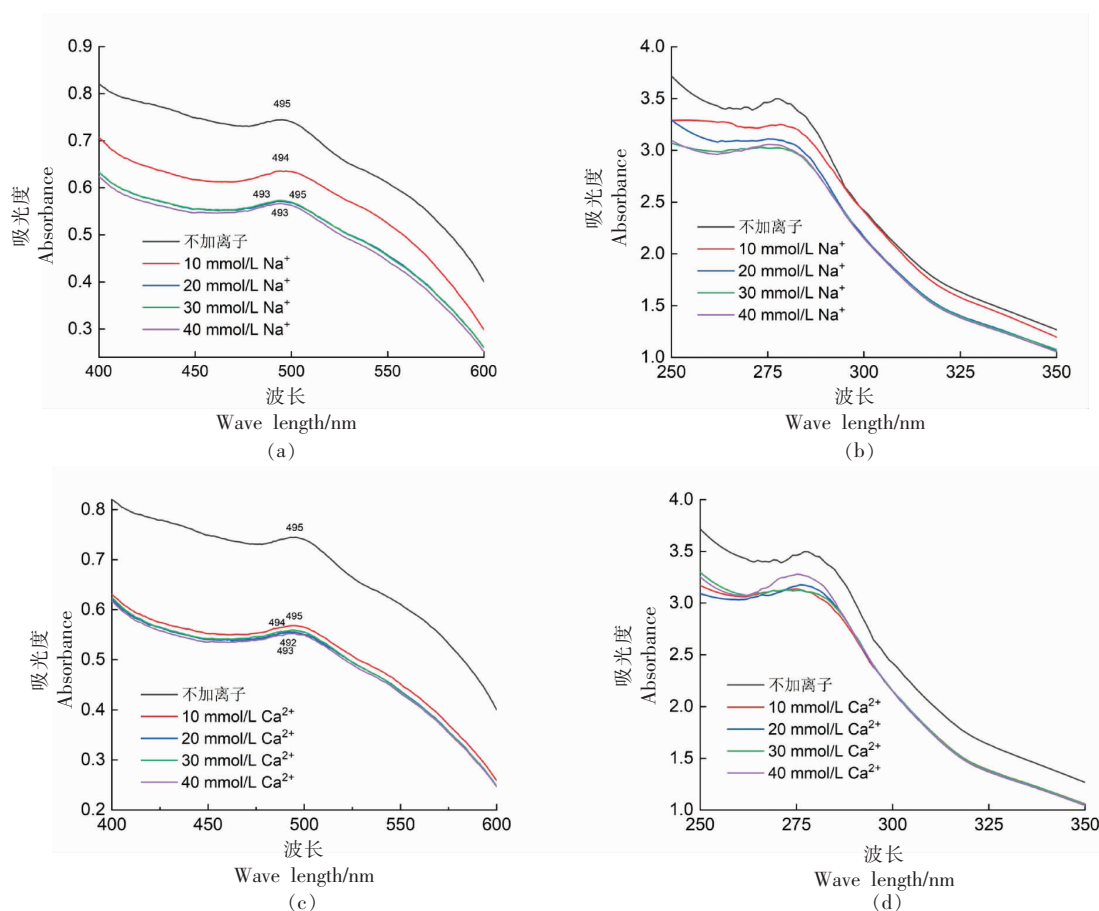
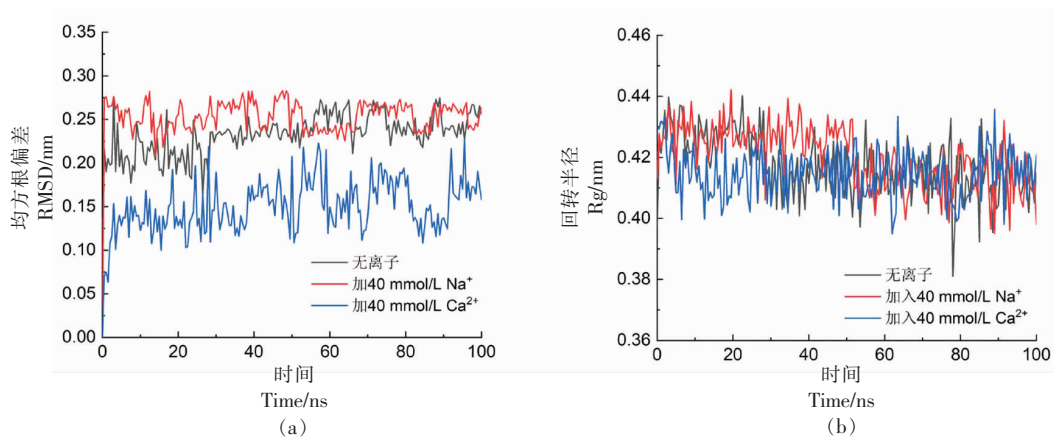
图 8 加入不同浓度 Na^+ (a,b)和加入不同浓度 Ca^{2+} (c,d)的花青素溶液的 UV-VIS 图谱Fig.8 UV-VIS spectra of anthocyanin solutions with different concentrations Na^+ (a, b) and Ca^{2+} (c, d)

图 9 花青素分子在热和离子环境下的 RMSD 值(a)和 Rg 值(b) (90 °C)

Fig.9 RMSD (a) and Rg (b) of anthocyanin molecules in thermal and ionic environments (90 °C)

属离子对花青素稳定性的影响研究结果一致。 Ca^{2+} 加入后的 RMSD 值振荡频率和幅度都有所增加,说明 Ca^{2+} 加入后花青素中各原子的运动幅度增加,引起花青素构象变化较大^[33]。花青素的构象变化就有可能导致花青素稳定性的下降。

回转半径(Rg)可用于评价花青素分子结构的紧凑性。由图 9b 可知,70 ns 之后的分子动力学模拟过程维持在 0.41 nm 左右,趋于稳定,说明在这之后达到了平衡,构象也无较大的变化。在 Na^+ 和 Ca^{2+} 的作用下,花青素的 Rg 变化趋势与无离子组

变化不大,也稳定在 0.41 nm 附近。Na⁺组在 55 ns 左右才开始下降然后趋于平衡,这说明 Na⁺对花青

素的结构影响有一定的滞后作用,而 Ca²⁺组未出现此现象。

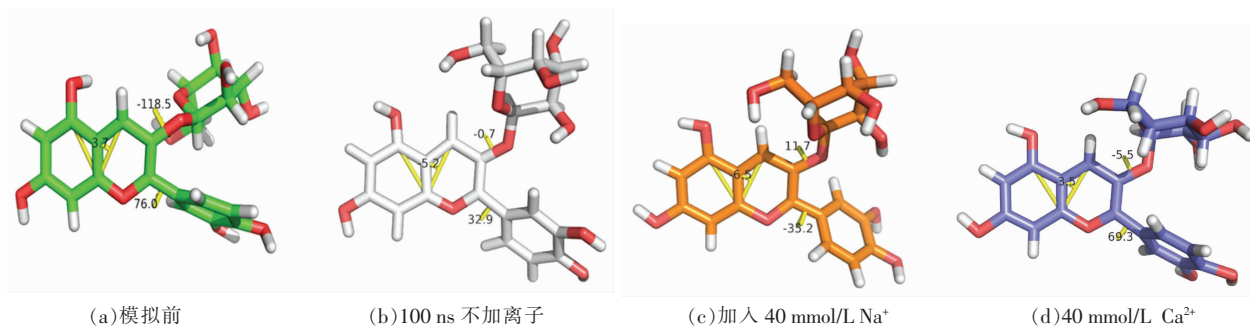


图 10 花青素分子构象

Fig.10 Molecular conformation of anthocyanins

2.7 相关性分析

由表 4 可以看出,热处理温度与花青素溶液体系的 L^* 值和 b^* 呈极显著正相关关系 ($P \leq 0.01$),与体系的还原能力呈显著负相关关系 ($P \leq 0.05$),这是因为高温会加速花青素降解,颜色聚合度显著下降,导致活性下降,从而提高亮度和黄蓝色度。Na⁺与花青素溶液体系的 a^* 和还原能力呈极显著负相关关系 ($P \leq 0.01$),与体系的 DPPH 清除率呈显著负相关关系 ($P \leq 0.05$),说明在一定范围内,Na⁺浓度越高,体系的还原能力和 DPPH 自由基清除率降低, a^* 降低。Ca²⁺与花青素溶液体系的羟自由基清除率和还原能力呈显著负相关关系 ($P \leq 0.05$),即高浓度的 Ca²⁺处理会降低体系的抗氧化能力。总的来说,热处理和金属离子存在均会降低花青素的 DPPH 自由基清除率,羟自由基清除率以及还原能力,也就是影响花青素的抗氧化活性,并最终导致花青素的降解速率增加。

3 结论

本文通过模拟典型的烹饪环境,研究了加热温度、加热时间以及金属离子处理对黑米花青素稳定性、色度和抗氧化性的影响。结果表明,加热温度和时间会影响花青素的稳定性,导致花青素的保留率下降,且降解过程遵循一级反应动力学。此外,金属离子对花青素的降解也有影响,高浓度的金属离子对花青素的降解有一定的促进作用,并且 Ca²⁺对花青素的破坏程度较 Na⁺大。温度和金属离子均使花青素的 L^* 值和 b^* 值增加, a^* 值下

表 4 加热温度和金属离子对与花青素色度、抗氧化活性和动力学参数的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of heating temperature and metal ions on anthocyanin chroma, antioxidant activity and kinetic parameters

	温度	Na ⁺ 浓度	Ca ²⁺ 浓度
L^*	0.984**	0.658	0.434
a^*	0.823	-0.970**	-0.676
b^*	0.996**	-0.503	-0.605
DPPH 清除率	-0.847	-0.890*	-0.825
羟自由基清除率	-0.852	-0.790	-0.953*
还原能力	-0.910*	-0.985**	-0.928*
k	0.956*	0.930*	0.880*
c	-0.981**	0.920*	0.854

注:“*”表示在 0.05 水平(双尾),相关性显著;“**”表示在 0.01 水平(双尾),相关性显著。

降,说明了花青素的红绿色彩减少和黄蓝色彩增加。另外金属离子存在下,颜色变化较快,低浓度的 Ca²⁺较 Na⁺有更大的 L^* 和黄蓝值。温度对花青素的抗氧化活性影响不大,只有随着温度的升高,略有下降的趋势。Ca²⁺处理后的花青素抗氧化活性略高于 Na⁺处理后的抗氧化活性,可能是因为 Ca²⁺与自由基的电子配对,导致了花青素的活性升高,清除率上升。在进行分子动力学模拟时,花青素在 30 ns 结构有轻微重组,在之后趋于稳定,模拟之后结构舒展,离子加入后体系的稳定性下降。相关性结果表明温度作用会显著提高体系的亮度和黄

蓝色度, 加热处理和金属离子存在均会降低花青素的抗氧化活性和提高花青素的降解速率。

参 考 文 献

- [1] 曾茜茜, 雷琳, 赵国华, 等. 花青素加工贮藏稳定性的改善及应用研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 269-275.
ZENG Q Q, LEI L, ZHAO G H, et al. Research progress on improvement of anthocyanin processing and storage stability and its application[J]. Food Science, 2018, 39(11): 269-275.
- [2] 陈骐, 罗小雪, 池云峰, 等. 黑米花青素对大豆 7S/11S 蛋白结构及界面功能特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(7): 166-173.
CHEN Q, LUO X X, CHI Y F, et al. Effect of black rice anthocyanins on the structure and interfacial functional properties of soybean 7S/11S protein [J]. Food and Fermentation Industry, 2023, 49(7): 166-173.
- [3] ZHOU N, PAN F, AI X, et al. Preparation, characterization and antioxidant activity of sinapic acid grafted chitosan and its application with casein as a nanoscale delivery system for black rice anthocyanins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 210: 33-43.
- [4] 李敏. 不同花青素提取物的组成、稳定性及抗氧化性比较研究[D]. 南京: 南京财经大学, 2013.
LI M. Comparative study on the composition, stability and antioxidant activity of different anthocyanin extracts[D]. Nanjing: Nanjing University of Finance and Economics, 2013.
- [5] CHUNG C, ROJANASASITHARA T, MUTILANGI W, et al. Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition [J]. Food Chemistry, 2016, 201: 14-22.
- [6] NORKAEW O, THITISUT P, MAHATHEERANONT S, et al. Effect of wall materials on some physicochemical properties and release characteristics of encapsulated black rice anthocyanin microcapsules[J]. Food Chemistry, 2019, 294: 493-502.
- [7] 汪志慧, 孙智达, 谢笔钧. 莲房原花青素的稳定性及热降解动力学研究[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 77-82.
WANG Z H, SUN Z D, XIE B J. Study on the stability and thermal degradation kinetics of proanthocyanidins[J]. Food Science, 2011, 32(7): 77-82.
- [8] 张乃珣, 郭庆启, 王振宇. 不同金属离子和还原剂对落叶松塔原花青素热稳定性影响的研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(22): 7463-7466.
ZHANG N X, GUO Q Q, WANG Z Y. Study on the effect of different metal ions and reducing agents on the thermal stability of proanthocyanidins in larch [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(22): 7463-7466.
- [9] 张焯, 雷晓柱. 微波辅助萃取蓝莓花青素获取和降解的动力学模型[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(12): 5016-5023.
ZHANG Y, LEI X Z. Kinetic model of anthocyanin acquisition and degradation of blueberry assisted microwave-assisted extraction[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(12): 5016-5023.
- [10] 张海晖, 李金凤, 段玉清, 等. 板栗壳原花青素提取及其稳定性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 5-9.
ZHANG H H, LI J F, DUAN Y Q, et al. Extraction and stability of proanthocyanidins from chestnut shell[J]. Food Science, 2011, 32(8): 5-9.
- [11] 陈虎, 叶英, 秦艳婷, 等. 黑果枸杞花青素在水相体系中的稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(19): 127-131.
CHEN H, YE Y, QIN Y T, et al. Stability of anthocyanins in aqueous system of *Lycium barbarum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(19): 127-131.
- [12] 杨泽南, 张庆路, 李凯凯, 等. 液质联用法测定不同地域种植的“华墨香5号”黑米中花青苷和酚酸类化合物含量[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(5): 266-272.
YANG Z N, ZHANG Q L, LI K K, et al. Determination of anthocyanins and phenolic acids in black rice grown in different regions by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2022, 41(5): 266-272.
- [13] 刘琴, 李敏, 胡秋辉. 黑米麸皮与紫包菜花青素提取物的组成、抗氧化性与稳定性比较研究[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 113-118.
LIU Q, LI M, HU Q H. Comparative study on the composition, antioxidant capacity and stability of anthocyanin extracts of black rice bran and purple cabbage[J]. Food Science, 2012, 33(19): 113-118.

- [14] HE S D, LOU Q Y, SHI J, et al. Water extraction of anthocyanins from black rice and purification using membrane separation and resin adsorption[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, 41(4): 13091.
- [15] GARZÓN G A, WROLSTAD R E. Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate[J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(4): 1288–1299.
- [16] 杨朝霞. 紫甘薯花色苷色素提取纯化工艺研究及组分分析[D]. 青岛: 青岛大学, 2004.
YANG Z X. Study on extraction and purification process of anthocyanin pigment and component analysis of purple sweet potato[D]. Qingdao: Qingdao University, 2004.
- [17] 樊小静, 任广跃, 段续, 等. 不同干燥方式对紫薯全粉物性品质及花青素含量的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(21): 1–10.
FAN X J, REN G Y, DUAN X, et al. Effects of different drying methods on physical properties and anthocyanin content of purple sweet potato powder[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2022, 48(21): 1–10.
- [18] KUMAR S S, CHAUHAN A S, GIRIDHAR P. Nanoliposomal encapsulation mediated enhancement of betalain stability: Characterisation, storage stability and antioxidant activity of *Basella rubra* L. fruits for its applications in vegan gummy candies[J]. *Food Chemistry*, 2020, 333: 127442.
- [19] 李沁. 原花青素类天然产物影响肌蛋白和 Tau 蛋白聚集的分子机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
LI Q. Molecular mechanism of proanthocyanidins affecting prion and tau aggregation[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2021.
- [20] 陈继光. 樟树果实性状及其花青素生物合成途径与降糖功能研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2020.
CHEN J G. Study on fruit traits and anthocyanin biosynthesis pathways and hypoglycemic function of camphora camphora[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2020.
- [21] BUSSI G, DONADIO D, PARRINELLO M. Canonical sampling through velocity rescaling [J]. *Journal of Chemical Physics*, 2007, 126(1): 014101.
- [22] 汪玉玲. 青桑葚中低聚原花青素的分离纯化及其抗氧化和降血糖活性研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2023.
WANG Y L. Isolation and purification of oligomeric proanthocyanidins from green mulberry and their study of antioxidant and hypoglycemic activities[D]. Wuhu: Anhui Polytechnic University, 2023.
- [23] WU J N, GUAN Y G, ZHONG Q X. Yeast mannoproteins improve thermal stability of anthocyanins at pH 7.0[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 121–128.
- [24] NAZARETH M S, SHREELAKSHMI S V, RAO P J, et al. Micro and nanoemulsions of *Carissa spinarum* fruit polyphenols, enhances anthocyanin stability and anti-quorum sensing activity: Comparison of degradation kinetics [J]. *Food Chemistry*, 2021, 359: 129876.
- [25] 崔海鹏, 郭健龙, 王大全, 等. 花青素加工稳定性及其研究进展[J/OL]. *食品与发酵工业*, (2023–09–25) [2024–02–08]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=AGqaFAGiW5-8vAAzQwdWLLiqJxoHeolmnHYB6ezAU054aE_TPWFxFG6-bB7xI39MHSV6V7tb-eF4EkK-KAtuAzUcudLiD6tVwZr9x15yeWe71_aKIVnrA3fuIj7CcDbO95SkkJNh2ap--i7FsiHa5-EpCsXC-ta3l&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- CUI H P, GUO J L, WANG D Q, et al. Anthocyanin processing stability and its research progress [J/OL]. *Food & Fermentation Industry*, (2023–09–25) [2024–02–08]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=AGqaFAGiW5-8vAAzQwdWLLiqJxoHeolmnHYB6ezAU054aE_TPWFxFG6-bB7xI39MHSV6V7tb-eF4EkK-KAtuAzUcudLiD6tVwZr9x15yeWe71_aKIVnrA3fuIj7CcDbO95SkkJNh2ap--i7FsiHa5-EpCsXC-ta3l&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- [26] 刘战, 侯晓琳, 宿莹, 等. 基于色差原理分析赤芍颜色与 HPLC 指纹图谱信息相关性研究[J]. *中药材*, 2020, 43(8): 1933–1936.
LIU Z, HOU X L, SU Y, et al. Correlation between color and HPLC fingerprint information of red peony based on the principle of chromatic aberration [J]. *Chinese Materia Medica*, 2020, 43(8): 1933–1936.
- [27] 王志伟. 关于花青素在小浆果加工过程中的稳定性研究[J]. *农业技术与装备*, 2020(1): 37, 40.
WANG Z W. Study on the stability of anthocyanins in the processing of small berries [J]. *Agricultural Technology and Equipment*, 2020(1): 37, 40.

- [28] 郭思杓, 张薇, 吕远平. 金属离子对紫甘蓝花青素颜色稳定性的影响[J]. 中国调味品, 2017, 42(6): 152-158.
GUO S X, ZHANG W, LÜ Y P. Effect of metal ions on anthocyanin color stability of purple cabbage [J]. China Condiment, 2017, 42(6): 152-158.
- [29] 铁珊珊, 刘梦培, 纵伟, 等. 高压微射流处理对原花青素平均聚合度和抗氧化性能的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(15): 128-131.
TIE S S, LIU M P, ZONG W, et al. Effect of high-pressure microfluidics on average polymerization degree and antioxidant properties of proanthocyanidins[J]. Food Science, 2018, 39(15): 128-131.
- [30] 闵锁田, 吴三桥, 李新生, 等. 金属离子对黑米花青苷色素吸收光谱的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 2001(4): 4-8.
MIN S T, WU S Q, LI X S, et al. Effect of metal ions on pigment absorption spectra of anthocyanins in black rice [J]. Amino Acids and Biological Resources, 2001(4): 4-8.
- [31] SAHA S, SINGH J, PAUL A, et al. Anthocyanin profiling using UV-Vis spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2020, 103(1): 23-39.
- [32] LIU K L, NING M R. Antioxidant activity stability and digestibility of protein from Se-enriched germinated brown rice[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 142 (2021): 11032.
- [33] HAO N N, HUI D, YUN L C, et al. Effects of spray drying and freeze drying on the structure and emulsifying properties of yam soluble protein: A study by experiment and molecular dynamics simulation[J]. Food Chemistry, 2023, 409: 135238.

Effects of Temperature and Metal Ions on the Stability of Anthocyanins from Black Rice

ZHANG Xiaohua^{1,2}, GUO Yabin^{1,2}, ZHEN Yiyuan², ZHAO Siming², Niu Meng², ZHANG Binjia^{1*}

¹College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715

²College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430072

Abstract The study focused on black rice anthocyanins, investigated the effects of temperature and metal ions (Na^+ , Ca^{2+}) on the thermal stability, antioxidant capacity, and color of anthocyanins by simulating typical thermal processing environments (heating temperature 60-100 °C, heating time 0-40 min, ion concentration 0-40 mmol/L) using methods such as color difference meter, UV-visible spectrophotometer, and fluorescence spectrophotometer. The results indicated that under the influence of temperature and metal ions, the stability of anthocyanins decreased. When anthocyanin solutions were treated at 100 °C for 40 min with Na^+ and Ca^{2+} concentrations reaching 40 mmol/L, the retention of anthocyanins dropped to approximately 75%. As the temperature and metal ion concentration increase, the L^* and b^* values of the anthocyanin solution increased, while the a^* value decreased, indicating a reduction in the substituents or chromophore groups of anthocyanins, with a blue shift in the UV characteristic peak at 530 nm, although the UV characteristic absorption peak of anthocyanins remained at a wave length of 280 nm. Prolonged heat treatment (over 30 min) significantly reduced the antioxidant activity of anthocyanins. The degradation of anthocyanins followed first-order reaction kinetics, with an activation energy E_a of approximately 12.30 kJ/mol. The effects of temperature and metal ions accelerated the degradation rate of anthocyanins, with a retention rate of about 79.8% after heating at 100 °C for 30 min. Molecular dynamics simulation results confirmed the impact of metal ions, particularly Ca^{2+} , on the stability of anthocyanins. Correlation analysis results indicated a highly significant negative correlation between Na^+ and the reducing capacity of the anthocyanin solution system, while Ca^{2+} showed a significant negative correlation with the hydroxyl radical scavenging rate of the anthocyanin solution system.

Keywords black rice anthocyanin; temperature; metal ion; antioxidant activity; first order reaction kinetics; molecular dynamics; correlation analysis