

# pH 示差法测定黑米发酵饮料中花色苷的含量

鲁 明,付 欣,迟吉捷

(辽宁省农业科学院 食品与加工研究所,辽宁 沈阳 110161)

**摘要:**为建立和优化适合黑米发酵饮料中花色苷含量测定的方法,利用 pH 示差法测定黑米发酵饮料中花色苷的含量。结果表明:测定波长为 510 nm,测定吸光度时的 pH 为 1.0 和 4.5,平衡温度为 30 ℃,pH 1.0 缓冲溶液中平衡 70 min,pH 4.5 缓冲溶液平衡时间为 30 min,pH 示差法测定出黑米发酵饮料中花色苷含量为 119.6 mg·L<sup>-1</sup>。该方法操作简单、方便,可以用于黑米发酵饮料中花色苷的定量分析。

**关键词:**黑米发酵饮料;花色苷;pH 示差法

**中图分类号:**TS261 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)04-0100-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.04.0100

黑米发酵饮料是以黑米为主要原料,接种乳酸菌发酵制得的饮料<sup>[1-2]</sup>。黑米的花色苷主要集中在种皮中<sup>[3]</sup>,属于黄酮类色素苷类化合物<sup>[4]</sup>。花色苷类物质除了显色,还具有抗氧化、降血压、降血脂以及抗癌等生理功能<sup>[5-7]</sup>。花色苷成分极不稳定,在发酵过程中随着 pH 的改变会发生变化,而最终饮料颜色取决于总花色苷含量的变化<sup>[8]</sup>。目前对花色苷含量的测定较常用的方法有高效液相色谱法和 pH 示差法,高效液相色谱法精确度高但设备昂贵,而且需要多种花色苷标准品,且标准品很不稳定,从而限制了这种方法的广泛使用。而 pH 示差法不需要标准品,且设备成本低,准确度足够高<sup>[9]</sup>。测定花色苷含量的原理为:花色苷呈色基团间结构的相互转换是 pH 的函数,具有超干扰影响作用的某些褐色降解物不随 pH 的改变而变化。所以通过改变缓冲溶液 pH,就可以确定出两个对花色苷吸光度差值最大,花色苷又相对很稳定的缓冲溶液 pH<sup>[10-11]</sup>。

目前应用 pH 示差法测定黑米发酵饮料中花色苷含量的研究尚无报道,如果直接套用其它物质的检测方法,对检测结果的准确性会有一定的影响。所以建立适合黑米发酵饮料中花色苷含量测定的 pH 示差法,并对测定过程中的反应条件逐一进行优化,为下一步考察黑米发酵过程中花色苷含量的变化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试黑米品种为黑香糯,由辽宁省水稻所提供;黑米发酵饮料由辽宁省农业科学院食品与加工研究所实验室自制。试剂:盐酸、乙酸、柠檬酸、氯化钾、三水合乙酸钠、柠檬酸钠均为分析纯试剂。仪器设备:分析天平(梅特勒-托利多(上海)公司)、电子天平(北京赛多利斯仪器系列有限公司)、数显恒温水浴锅(金坛市双捷实验仪器厂)、紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司)、TGL-15B 离心机(上海安亭科学仪器厂)和 PHS-3C 型实验室 pH 计(上海晓霄实验仪器设备有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 缓冲液的配制** pH 为 0.5~2.0 的缓冲溶液:0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸溶液逐滴加入盐酸,pH 计校正配制。

pH3.0 的缓冲溶液:0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸:0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠 = 82:18,v/v;pH4.0 的缓冲溶液:0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸:0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠 = 59:41,v/v;pH4.5 的缓冲溶液:0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaAc·3H<sub>2</sub>O:0.2 mol·L<sup>-1</sup> HAc = 1:1;pH5.0 的缓冲溶液:0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸:0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠 = 35:65;pH6.0 的缓冲溶液:0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸:0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠 = 11:88.5。

**1.2.2 样品的制备** 吸取 10 mL 黑米发酵饮料样品于离心管中,10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,吸取 5 mL 上清液于 10 mL 小烧杯中,用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液调 pH 至 3.0。

**1.2.3 测定项目及计算方法**<sup>[9]</sup> 稀释后样品的吸光度  $\Delta A$  计算公式为:

收稿日期:2017-02-21

基金项目:公益性行业(农业)科研专项资助项目(2014 03063-2)

第一作者简介:鲁明(1976-),女,硕士,副研究员,从事粮油与功能食品研究。E-mail:13836925@qq.com。

$$A = (A_{510} - A_{700}) \times \text{pH}1.0 - (A_{510} - A_{700}) \times \text{pH}4.5$$

样品的花色苷含量计算公式为:

$$\text{花色苷含量}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{A \times M_w}{\epsilon \times I} \times Df \times$$

1 000

其中: $M_w$ ,矢车菊素葡萄糖苷的相对分子质量(484.82  $\text{mg} \cdot \text{mol}^{-1}$ ); $\epsilon$ ,矢车菊素葡萄糖苷的摩尔消光系数(24 825); $Df$ ,稀释因子(样品总的稀释倍数); $I$ ,比色杯光程(cm)。

同一样品平行测定6次,计算出花色苷含量,精密用相对标准偏差来表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 测定波长的选择

虽然经验公式采用矢车菊素葡萄糖苷为计量标准表示样品花色苷的含量,但其最适测定波长应根据具体样品进行优化<sup>[12-14]</sup>。图1为在200~800 nm扫描样品溶液的紫外吸收光谱,通过图1可以看出在pH1.0和pH4.5缓冲液中,黑米发酵饮料样品的最大吸收波长都为510 nm,因此,选择510 nm为测定波长。

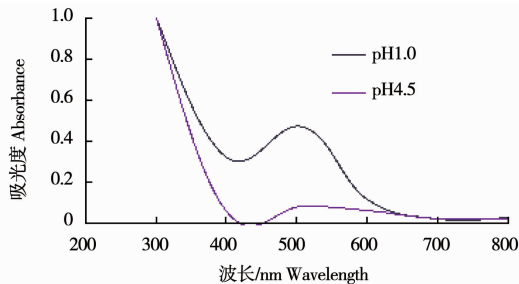


图1 样品在pH1.0和pH4.5缓冲液环境下的吸收光谱

Fig. 1 The absorption spectra of samples in pH1.0 and pH4.5 buffer environment

### 2.2 测定pH的选定

依据pH示差法的原理,所选两个特定pH应符合对花色苷吸光度的差是最大的,但又对花色苷相对很稳定缓冲溶液的pH<sup>[14]</sup>;从图2可以看出,黑米发酵饮料在pH为0.5~2.0和4.0~5.0两个区域内,pH的轻微变动对吸光度值影响很小,而且pH1.0和pH4.5之间的吸光度差值最大,因此选定pH为1.0及4.5两个pH来测定花色苷的吸光度。

### 2.3 平衡温度与时间的确定

花色苷在高温环境下易分解,样品在温度不同缓冲液中达到平衡的时间也不同<sup>[14-16]</sup>,在

510 nm波长下,将样品分别使用pH1.0和pH4.5的缓冲液稀释后,分别在20、30和40℃下,每隔10 min检测1次吸光值,根据吸光值的变化趋势,确定样品在缓冲液中最佳的平衡温度与平衡时间。

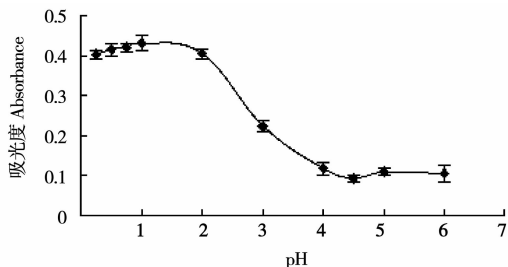


图2 样品在不同pH下的吸光度值

Fig. 2 The absorbance values of samples under different pH

由图3可以看出,在pH为1.0缓冲溶液中随着时间的延长吸光值有上升的趋势,20℃吸光值在120 min趋于稳定,30℃吸光值在70 min趋于稳定,40℃吸光值在80 min趋于稳定,所以选择30℃平衡70 min作为黑米发酵饮料在pH为1.0缓冲溶液中的平衡条件。

由图4可以看出,在pH为4.5缓冲溶液中

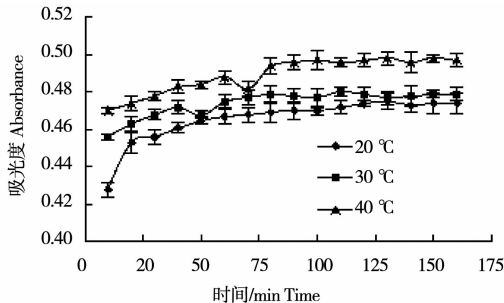


图3 在pH1.0缓冲液中不同平衡温度样品吸光值变化

Fig. 3 The change of the samples absorbance values at different equilibrium temperature in pH1.0 buffer solution

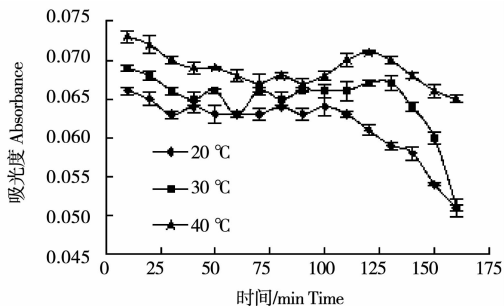


图4 在pH4.5缓冲液中不同平衡温度样品吸光值变化

Fig. 4 The change of the samples absorbance at different equilibrium temperature in pH4.5 buffer solution

吸光值呈下降趋势,在 20、30、40 ℃ 中,前 30 min 下降速度较快,然后趋于平缓,110 min 后急速下降,考虑 30 ℃ 作为黑米发酵饮料在 pH 为 1.0 缓冲溶液中的平衡条件,所以在 pH 为 4.5 缓冲溶液中确定平衡条件为 30 ℃ 平衡 30 min。

2.4 精密度试验

按照最终确定的测定含量的方法,同一样品

表 1 黑米发酵饮料中花色苷测量精密度试验

Table 1 The measurement precision test of anthocyanins in black rice fermented beverage

样品序号 No.	A <sub>pH1.0</sub>	A <sub>pH4.5</sub>	△A	花色苷含量/(mg·L <sup>-1</sup> ) Anthocyanins content	平均值/(mg·L <sup>-1</sup> ) Mean	RSD/%
1	0.341	0.117	0.224	110.0	119.6	6.1
2	0.318	0.066	0.252	125.0		
3	0.291	0.061	0.230	112.5		
4	0.320	0.067	0.253	125.0		
5	0.332	0.072	0.260	127.5		
6	0.307	0.068	0.239	117.5		

3 结论

将 pH 示差法应用到黑米发酵饮料中花色苷含量的测定,并对反应条件逐一优化,确定最佳测定条件为:测定波长为 510 nm,测定吸光度时的 pH 为 1.0 和 4.5,平衡温度为 30 ℃ ,pH1.0 缓冲溶液中平衡 70 min,pH4.5 缓冲溶液平衡时间为 30 min,pH 示差法测定出黑米发酵饮料中花色苷含量为 119.6 mg·L<sup>-1</sup>。该方法操作简单、方便,可以用于黑米发酵饮料中花色苷的定量分析。

参考文献:

[1] 兰文峰,吴斌.黑米乳酸发酵饮料的研制[J].吉林农业,2010(8):79-79.

[2] 刘长海.多菌种混合发酵黑米饮料的研究[J].食品工业科技,2003(6):43-45.

[3] 赵则胜.中国特种稻[M].上海:上海科学技术出版社,1995.

[4] 孔令瑶,汪云,曹玉华,等.黑米色素的组成与结构分析[J].食品与生物技术学报,2008,27(2):25-29.

[5] Kong J M,Chia L S,Goh N K,et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. Phytochemistry,2003,64(5):923-933.

[6] 徐渊金,杜琪珍.花色苷分离鉴定方法及其生物活性[J].食品与发酵工业,2006,32(3):67-72.

[7] 郭红辉,凌文华.黑米花色苷研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(3):133-136.

平行测定 6 次,计算出花色苷含量。由表 1 可以看出,黑米发酵饮料中花色苷含量平均值为 119.6 mg·L<sup>-1</sup>,花色苷含量的相对标准偏差(RSD)为 6.1%,试验表明 pH 示差法应用于黑米发酵饮料中花色苷含量测定中,方法可行,而且重复性强,准确率高。

[8] 侯召华,翟虎渠,万建民,等.黑米花色苷的提取及纯化[J].食品科学,2010,31(10):53-59.

[9] 孙婧超,刘玉田,赵玉平,等. pH 示差法测定蓝莓酒中花色苷条件的优化[J].中国酿造,2011(11):171-174.

[10] Dangles O,Saito N,Brouillard R. Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of Pharbitis nil[J]. J. am. chem. soc, 1993(8):3125-3132.

[11] 李颖畅,孟宪军,张琦,等. 蓝莓果主要物质含量及处理方式对其花色苷的影响[J]. 食品工业科技,2008(5):163-164.

[12] Giusti M M,Wrolstad R E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy[M]//Current Protocols in Food Analytical Chemistry,2001:63-69.

[13] Paolo Rapisarda ,Fabiana Fanella A,Maccarone E. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry,2000,48(6):2249-52.

[14] 宋德群,孟宪军,王晨阳,等. 蓝莓花色苷的 pH 示差法测定[J]. 沈阳农业大学学报,2013,44(2):231-233.

[15] 石光,张春枝,陈莉,等. 蓝莓花色苷稳定性研究[J]. 食品与发酵工业,2008,34(2):97-99.

[16] 桑戈,赵力,谭婷婷,等. pH 示差法测定紫薯酒中花青素的含量[J]. 酿酒科技,2015(6):88-91.

# 不同微量元素对平菇菌丝生长的影响

刘拴成<sup>1</sup>,穆俊祥<sup>1</sup>,曹兴明<sup>1</sup>,张翠英<sup>2</sup>

(1. 集宁师范学院 生物系, 内蒙古 集宁 012000; 2. 北京师范大学 集宁附属中学, 内蒙古 集宁 012000)

**摘要:** 为了促进平菇栽培生产, 以平菇菌种为试验材料, 通过  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  三种微量元素进行三因素四水平正交设计共产生 16 种试验组合。采用固体平板和液体摇瓶培养的方法培养平菇菌种, 测定菌丝日平均增长量、菌丝体干重、过氧化物酶活性, 并通过正交试验设计进行直观分析。结果表明: 综合考虑 3 个因素, 然后针对不同因素的不同指标所对应的最优组合条件, 通过单个指标的直观分析并结合实际进行综合平衡分析, 最终得到综合的优方案, 即  $\text{Fe}^{2+}$  20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的组合。

**关键词:** 平菇; 微量元素; 菌丝体; 过氧化物酶

中图分类号: S646.1<sup>+</sup>4 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2017)04-0103-06 DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2017.04.0103

平菇(*Pleurotus ostreatus*) 又名侧耳, 隶属于真菌门担子菌纲伞菌目白菇科侧耳属<sup>[1]</sup>, 其肉肥质嫩, 味道鲜美, 产量高, 因此平菇的栽培相当广泛。平菇含有 18 种氨基酸, 营养丰富, 而且所含的蛋白多糖可以改善人体的新陈代谢、具有增强机体免疫功能等食疗保健作用。利用深层培养的真菌菌丝体来富集和转化微量元素<sup>[2]</sup>, 使人们在食用菌丝体产品的同时达到摄入微量元素的目的,

近年来, 已有诸多富集微量元素的研究与应用<sup>[3-4]</sup>。平菇含有多种养分及激素、菌糖、甘露醇糖等, 富含各种营养物质, 每 100 g 干品中含有蛋白质 20~23 g, 而且氨基酸成分比较齐全, 矿物质含量也十分丰富, 经常食用平菇可以改善人体的新陈代谢。平菇是一种腐生性真菌, 在其生长发育过程中所需要的营养物质完全依靠培养料提供, 其中 C、N 是必要的营养物质, 其次是 K、Mg、P、Ca 等大量元素, 另外 Fe、Zn、Mn 等微量元素也是平菇生长发育不可缺少的营养物质, 如果严重缺少某种微量元素就会导致微量元素缺乏症, 从而影响菌丝体生长发育和子实体的分化形成, 将直接影响出菇的质量<sup>[5-6]</sup>。

收稿日期: 2017-02-04  
第一作者简介: 刘拴成(1979-), 男, 内蒙古自治区四子王旗人, 硕士, 讲师, 从事园艺方面教学及相关研究。E-mail: Lsc2009jntc@163.com。

## Determination of Anthocyanins Content in Black Rice Fermented Beverages by pH Differential Method

LU Ming, FU Xin, CHI Ji-jie

(Food and Processing Research Institute of Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shengyang, Liaoning 110161)

**Abstract:** In order to setabllish and optimize the suitable determination method for anthocyanins content in the black rice fermented beverages, pH differential method was applied to the determination of anthocyanins content in the black rice fermented beverages, and the optimal determination conditions were determined. The results showed that measuring wavelength was identified as 510 nm, pH was 1.0 and 4.5 when determined the absorbance, the equilibrium temperature was 30 °C, balancing in the buffer solution of pH 1.0 for 70 min, and balancing in the buffer solution of pH 4.5 for 30 min, the anthocyanins content in the black rice fermented beverages was 119.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , which was determined by pH differential method. The method of operation was simple and convenient, and it could be used for quantitative analysis of anthocyanins in black rice fermented beverages.

**Keywords:** black rice fermented beverages; anthocyanins; pH differential method