

双波长法测定绿豆中的直链和支链淀粉

Determination of amylose and amylopectin in mung bean by dual-wavelength spectrophotometry

黄建蓉 王志江 李丽嫦 区丽 徐金瑞

HUANG Jian-rong WANG Zhi-jiang LI Li-chang OULI XU Jin-rui

(广东药学院食品科学学院, 广东 中山 528458)

(School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan, Guangdong 528458, China)

摘要:建立绿豆中直链淀粉和支链淀粉含量同时测定的双波长分光光度法,研究光度测定的影响因素,并对方法精密度和加标回收率进行考察。直链淀粉的测定波长和参比波长分别为 610 nm 和 498 nm,支链淀粉为 553 nm 和 709 nm。方法精密度良好,直链和支链淀粉平均回收率分别为 94.10% 和 90.94%。建立回归方程并求得 3 种绿豆的直链淀粉含量为 11.70%~12.67%,支链淀粉含量为 32.70%~34.22%。

关键词:绿豆;双波长法;直链淀粉;支链淀粉

Abstract: A method for the determination of amylose and amylopectin content in mung bean was established based on dual-wavelength spectrophotometry. The factors influencing the photometric absorption were also investigated. The precision of the method and the recovery of standard addition were investigated as well. The determination and reference wavelength of amylose were 610 nm and 498 nm, respectively, and that of amylopectin were 553 nm and 709 nm, respectively. The precision of the method was appropriate. The average recovery of amylose and amylopectin were 94.10% and 90.94%, respectively. The regression equation was established to calculate the amylose and amylopectin content in 3 kinds of mung bean being 11.70%~12.67% and 32.70%~34.22%, respectively.

Keywords: mung bean; dual-wavelength spectrophotometry; amylose; amylopectin

绿豆是中国传统的食用豆类作物,富含淀粉等碳水化合物。绿豆淀粉具有广泛的用途,有研究者采用单波长法^[1]或酶法^[2]测定绿豆中总淀粉和直链淀粉含量,也有研究者^[3]将双波长法用于 13 种常用淀粉原料中直链淀粉和支链淀粉的同时测定,其中包括绿豆淀粉。前 2 种方法在进行样品预处理时,先将淀粉从绿豆中分离出来再进行测定,后 1 种方法测定的样品是从绿豆中提取出来的淀粉原料,而不是绿豆。

双波长分光光度法用于同时测定样品中直链淀粉和支链淀粉含量具有高效、准确的优点,应用日益广泛^[4-8]。需要引起注意的是,淀粉样品的显色条件对光度测定结果有一定影响,许多研究者^[4,5,8]对此也进行了相关报道。本研究拟采用双波长分光光度法对绿豆中直链淀粉和支链淀粉进行同时测定,样品预处理时无需将淀粉从绿豆中分离出来,可简化操作步骤。研究碘试剂与淀粉的显色反应中影响吸光度和吸光度差值测定结果的因素,并考察方法精密度和加标回收率,对分析方法的可靠性进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 原料

东北绿豆:深圳市永福元工贸有限公司;

金龙鱼白城绿豆:原料产地吉林白城市,嘉里粮油(深圳)有限公司;

韶扬有机绿豆:原料产地辽宁朝阳,菏泽市韶扬农产品有限公司。

1.1.2 试剂

直链淀粉标准品和支链淀粉标准品:美国 Sigma 公司;

石油醚、无水乙醇、碘、碘化钾、氢氧化钠、盐酸:均为国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器与设备

电子分析天平:AEY-220 型,湘仪天平仪器设备有限公司;

双光束紫外可见分光光度计:TU-1901 型,北京普析通用仪器责任有限公司;

水浴锅:HH-zk8 型,巩义市予华仪器有限责任公司;

高速万能粉碎机:FW1000 型,天津市泰斯特仪器有限公司。

作者简介:黄建蓉(1975—),女,广东药学院副教授,博士。

E-mail: joanjr@126.com

收稿日期:2015-03-25

1.2 试验方法

1.2.1 样品预处理 由于天然淀粉中含有的油脂具有碘值即能与碘反应褪色,碘溶于油脂中,会使得液体呈现红至橙红色,影响显色反应^[9]。因此,先对绿豆进行脱脂处理后再进行显色测定。绿豆用高速万能粉碎机粉碎并过80目筛,然后用索氏提取法进行脱脂处理,得到脱脂绿豆粉保存于干燥避光处,备用。

1.2.2 碘试剂的配制 称取碘化钾2.0 g,溶于少量蒸馏水,再加碘0.2 g,待溶解后用蒸馏水稀释定容至100 mL,即得2 mg/mL的碘试剂,储于棕色瓶中备用。

1.2.3 淀粉标准储备液的制备 准确称取50 mg直链淀粉标准品,置于小烧杯中,加入1 mL无水乙醇润湿,再加入2 mol/L的氢氧化钠溶液9 mL。在90 °C恒温水浴中,分散溶解20 min,用蒸馏水定容至刻度,即成1 mg/mL的直链淀粉标准储备液。

支链淀粉标准储备液制备步骤同直链淀粉。

1.2.4 淀粉标准扫描液的制备及检测波长的确定

(1) 直链淀粉标准扫描液:移取1 mL直链淀粉标准储备液于50 mL容量瓶中,用1 mol/L和0.1 mol/L的盐酸溶液调至pH=3,加0.5 mL碘试剂,用蒸馏水定容至刻度,静置反应30 min,以蒸馏水作参比液,上机进行波长为400~800 nm的可见光波段扫描。

(2) 支链淀粉标准扫描液:移取4 mL支链淀粉标准储备液于50 mL容量瓶中,其余步骤同直链淀粉标准扫描液。

(3) 在同一坐标内绘制直链和支链淀粉标准扫描液可见光波段吸收曲线,根据作图法确定直链淀粉的测定波长(λ_2)和参比波长(λ_1)以及支链淀粉的测定波长(λ_4)和参比波长(λ_3)。

1.2.5 样品显色条件的选择 研究不同显色pH值(2,3,4,5)、显色温度(15,20,25,30 °C)和显色时间(15,30,45,60,75,90,105,120,135,150,165,180 min)对直链和支链淀粉测定波长下吸光度和吸光度差值的影响,选择适宜的显色条件。

1.2.6 标准曲线的绘制 根据1.2.5得出的显色条件,配制直链淀粉和支链淀粉标准溶液,并绘制标准曲线。

(1) 直链淀粉标准曲线的绘制:吸取0.5,0.9,1.3,1.7,2.1,2.5 mL的1 g/mL直链淀粉标准溶液分别加入50 mL的容量瓶中,加入30 mL蒸馏水,以1 mol/L和0.1 mol/L盐酸溶液调至pH=3,加入0.5 mL碘试剂,并用蒸馏水定容,静置30 min,在 λ_2 、 λ_1 两波长下分别测定 A_{λ_2} 、 A_{λ_1} ,得 $\Delta A_{直} = A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1}$ 。以直链淀粉浓度(mg/mL)为横坐标, $\Delta A_{直}$ 为纵坐标,绘制直链淀粉标准曲线,得出回归方程。

(2) 支链淀粉标准曲线的绘制:吸取1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL的1 mg/mL支链淀粉标准溶液分别放入50 mL的容量瓶中,其余步骤同直链淀粉标准曲线绘制,在 λ_4 、 λ_3 两波长下分别测定 A_{λ_4} 、 A_{λ_3} ,得 $\Delta A_{支} = A_{\lambda_4} - A_{\lambda_3}$ 。

以支链淀粉浓度(mg/mL)为横坐标, $\Delta A_{支}$ 为纵坐标,绘制支链淀粉标准曲线,得出回归方程。

1.2.7 精密度试验 对一样品进行直链淀粉和支链淀粉含量的同时测定,重复6次,计算平均值和相对标准偏差(RSD)。

1.2.8 加标回收率试验 分别称取不同量的直链淀粉和支链淀粉标准品,添加到已测得直链淀粉和支链淀粉含量的样品中,测定加标样品中直链淀粉和支链淀粉的含量,计算回收率。

1.2.9 绿豆样品中直链和支链淀粉含量测定 精确称取脱脂绿豆粉样品0.1 g于50 mL烧杯内,加入1 mL无水乙醇润湿,按照1.2.3的分散条件进行分散,以蒸馏水定容至50 mL。抽滤,取2.5 mL的滤液加入50 mL的容量瓶中,加入30 mL蒸馏水,以1 mol/L和0.1 mol/L盐酸溶液调节pH,加入0.5 mL碘试剂,并用蒸馏水定容到刻度,按照1.2.5筛选的显色条件进行显色反应。在 λ_2 、 λ_1 和 λ_4 、 λ_3 波长下测定吸光度值,根据标准曲线计算含量。

2 结果与分析

2.1 测定波长与参比波长的确定

用直链和支链淀粉标准液分别与碘反应,进行可见光波段扫描(400~800 nm),并绘制于同一个坐标系内(见图1),得到直链淀粉的最大吸收波长为 $\lambda_2 = 610$ nm,支链淀粉的最大吸收波长为 $\lambda_4 = 553$ nm。按照等吸收点波长法,通过作图确定直链淀粉的测定波长和参比波长分别为 $\lambda_2 = 610$ nm和 $\lambda_1 = 498$ nm,支链淀粉的测定波长和参比波长分别为 $\lambda_4 = 553$ nm和 $\lambda_3 = 709$ nm。

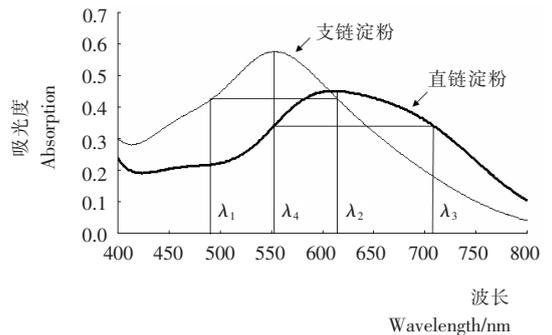


图1 直链淀粉和支链淀粉标准品扫描图(400~800 nm)

Figure 1 Spectrogram of amylose and amylopectin (400~800 nm)

2.2 样品显色条件的选择

2.2.1 pH值对吸光值的影响 由图2可知,在pH 2~4范围内, $A_{610\text{ nm}}$ 、 $A_{553\text{ nm}}$ 、 $A_{直}$ 和 $\Delta A_{支}$ 的测定结果都没有明显差异,pH 5的条件下,吸光度和吸光度差值明显减小,因此适宜的显色反应pH范围为2~4。

2.2.2 显色温度对吸光值的影响 由图3可知,当显色温

度为 20 ℃ 时,测得吸光度和吸光度差值均为最大,因此选择 20 ℃ 作为最适显色温度。

2.2.3 显色时间对吸光值的影响 由图 4 可知,显色反应进行约 15 min 时,反应尚未完全达到平衡,测定结果不稳定;当显色超过 120 min 后,测得值呈现出较明显的下降趋

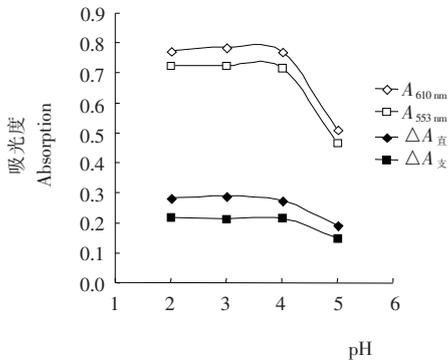


图 2 显色反应 pH 对吸光值的影响

Figure 2 The influence of color reaction pH on photometric absorption

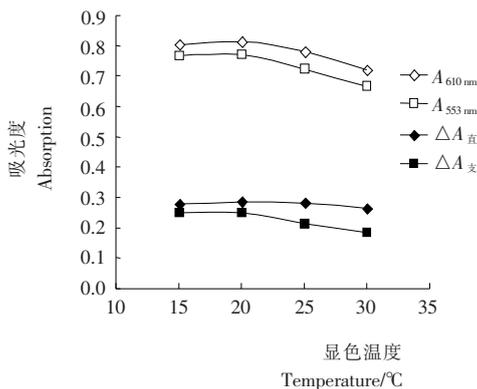


图 3 显色温度对吸光值的影响

Figure 3 The influence of color reaction temperature on photometric absorption

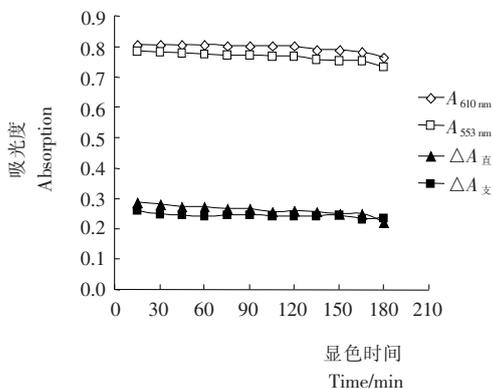


图 4 显色时间对吸光值的影响

Figure 4 The influence of color reaction time on photometric absorption

势。因此建议在显色反应 30~120 min 内对样液进行检测。

2.3 标准曲线的绘制

由图 5 可知,直链淀粉标准曲线的回归方程为: $\Delta A_{直} = 12.411C_{直} - 0.0445$ ($R^2 = 0.9994$),直链淀粉浓度在 10~50 mg/L 时,溶液浓度与吸光度差值有良好的线性关系。

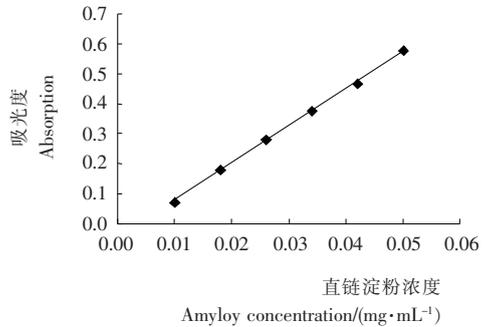


图 5 直链淀粉标准曲线

Figure 5 The standard curve of amylose

由图 6 可知,支链淀粉标准曲线的回归方程为: $\Delta A_{支} = 3.7433C_{支} + 0.0251$ ($R^2 = 0.9991$),支链淀粉浓度在 20~120 mg/L 时,溶液浓度与吸光度差值有良好的线性关系。

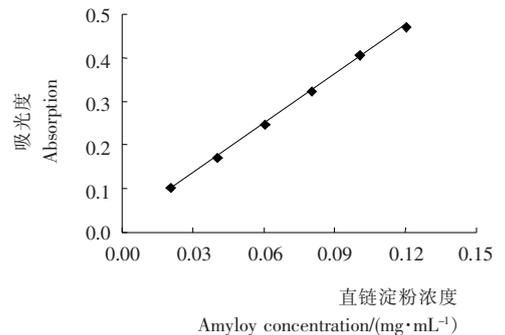


图 6 支链淀粉标准曲线

Figure 6 The standard curve of amylopectin

2.4 方法精密度评价

由表 1 可知,本方法重复性好,用双波长分光光度法同时测定绿豆中直链淀粉和支链淀粉含量精密度高。

2.5 加标回收率

由表 2 可知,直链淀粉和支链淀粉的平均回收率分别为 94.10% 和 90.94%。由此可见,双波长法同时测定直链淀粉和支链淀粉的含量,结果可靠。

2.6 绿豆中直链和支链淀粉含量测定

由表 3 可知,直链淀粉含量在 11.70%~12.67%,支链淀粉含量在 32.70%~34.22%。钟葵等^[10] 采用爱尔兰 Megazyme 公司的淀粉试剂盒测定 20 个绿豆样品中总淀粉和直链淀粉含量,变幅分别为 37.48%~47.63% 和 10.41%~15.84%。林伟静等^[2] 将绿豆淀粉从绿豆中分离出来后,测得 16 个品种来源的绿豆淀粉中总淀粉含量和直

表1 方法精密度试验结果

Table 1 The precision test results of the method

项目	测定结果/(mg·L ⁻¹)						平均值/ (mg·L ⁻¹)	RSD/ %
	1	2	3	4	5	6		
直链淀粉	13.98	13.82	14.06	14.38	14.22	13.90	14.06	1.49
支链淀粉	36.57	37.37	36.57	36.71	37.11	36.84	36.86	0.87

表2 直链淀粉和支链淀粉的回收率试验结果

Table 2 The recovery test results of amylose and amylopectin

项目	编号	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%
直链 淀粉	1	0.55	0.52	93.93	94.10
	2	0.69	0.67	97.95	
	3	0.83	0.75	90.40	
支链 淀粉	1	2.13	1.92	90.28	90.94
	2	2.66	2.42	90.86	
	3	3.19	2.92	91.68	

表3 3种绿豆中直链淀粉和支链淀粉含量

Table3 Amylose and amylopectin content in 3 kinds of mung bean (n=3)

样品名称	直链淀粉 含量/%	支链淀粉 含量/%	直链淀粉:支链淀粉 (m:m)
东北绿豆	12.67±0.22	32.99±0.18	28:72
金龙鱼白城绿豆	11.70±0.15	32.70±0.14	26:74
韶扬有机绿豆	12.19±0.17	34.22±0.55	26:74

链淀粉含量变幅分别为 85.67%~92.98% 和 23.65%~34.08%。由此推算直链和支链淀粉质量比在 26:74~39:61。本研究结果与之一致。李文浩等^[1]测得 9 个品种绿豆总淀粉含量、直链淀粉含量范围分别为 54.73%~57.99%, 40.44%~41.82%。刘襄河等^[3]测得绿豆淀粉中直链和支链淀粉含量分别为 56.31% 和 16.95%, 二者质量比大约为 77:23。本研究结果与之差异较大,原因可能是样品来源或检测方法的不同。

3 结论

双波长分光光度法是对共存组分不分离定量测定的有效方法之一,此法操作简单,精密度高,回收率良好,可以应用于绿豆中直链和支链淀粉含量两个指标的同时测定。

本研究对样品显色反应条件进行探讨,结果表明,适宜的显色反应条件为:pH 2~4,显色温度 20℃,显色时间

30~120 min。

通过双波长吸收光谱图确定了直链淀粉的测定波长和参比波长为 610 nm 和 498 nm,支链淀粉为 553 nm 和 709 nm。建立了直链淀粉和支链淀粉回归方程,直链淀粉在 10~50 mg/L 线性良好($R^2=0.9994$),支链淀粉在 20~120 mg/L 线性良好($R^2=0.9991$),符合比尔定律。并测得 3 种绿豆中直链淀粉含量为 11.70%~12.67%,支链淀粉含量为 32.70%~34.22%,直链淀粉与支链淀粉质量比为 26:74~28:72。

由于样品来源不同或检测方法不同,不同文献报道的绿豆淀粉含量测定结果差异较大,在实际应用中应加以注意,对影响检测结果的各种因素(如样品中其他组分、样品分散条件等)仍有待深入研究。

参考文献

- 李文浩,谭斌,刘宏,等.我国 9 个品种绿豆淀粉的理化性质研究[J].中国食品学报,2013,13(4):58~64.
- 林伟静,曾志红,钟葵,等.不同品种绿豆的淀粉品种特性研究[J].中国粮油学报,2012,27(7):47~51.
- 刘襄河,郑丽璇,郑丽勉,等.双波长法测定常用淀粉原料中直链淀粉、支链淀粉及总淀粉含量[J].广东农业科学,2013(18):97~100.
- 常虹,周家华,兰彦平.葛根淀粉提取及直链、支链淀粉的双波长测定[J].食品工业科技,2009,30(11):239~240,276.
- 林美娟,宋江峰,李大婧,等.用双波长分光光度法测定鲜食玉米中直链淀粉和支链淀粉含量[J].江苏农业科学,2010,22(12):117~119.
- 包锦渊,李军乔,韦梅琴,等.藏药蕲麻中直链淀粉和支链淀粉含量的测定[J].江苏农业科学,2012,40(3):281~283.
- 蒋卉,胡中泽.双波长法测定籼米中直链淀粉和支链淀粉含量[J].粮食与饲料工业,2013(2):22~25.
- 吴仲,梁一池,陈诗强.锥栗中直链和支链淀粉含量同时检测方法研究[J].食品与机械,2014,30(2):72~74,98.
- 崔克宇,吕明,王仁章,等.碘与淀粉反应条件的实验研究[J].科技信息,2007(12):29~31.
- 钟葵,佟立涛,刘丽娅,等.绿豆淀粉性质和糊化特性研究[J].作物杂志,2013(2):134~138.