

谢雨杉,李多伟,李银芳,等. 碘试液比色法测定 α -淀粉酶抑制剂活性[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):301-303.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.100

碘试液比色法测定 α -淀粉酶抑制剂活性

谢雨杉¹, 李多伟¹, 李银芳², 智彩辉²

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西西安 710068; 2. 陕西省西安蓝晓科技新材料股份有限公司, 陕西西安 710075)

摘要:建立 α -淀粉酶抑制剂活性的碘试液比色测定方法,对淀粉基质液浓度、反应温度系列试验条件进行确定。结果显示,最佳测定条件为淀粉基质液浓度为 2.5%,酶促反应的最适温度 40℃,平均回收率为 99.03% ($n=6$),精密程度 $RSD=1.82\%$ 。可见,该测定方法简便、快捷、重复性良好,可作为 α -淀粉酶抑制剂活性的常规测定方法。

关键词:白芸豆;碘试液比色法; α -淀粉酶抑制剂活性

中图分类号: TS201.2⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0301-02

α -淀粉酶抑制剂(α -amylase inhibitor, 简称 α -AI)属于糖苷水解酶。胃肠道内唾液胰淀粉酶的活性能被 α -AI 有效抑制,人体对食物中主要碳水化合物的水解和消化受到阻碍或延缓,降低了食物中淀粉糖类物质的分解吸收,起到了降低血糖、血脂作用并抑制了血糖浓度的升高,在糖尿病患者的饮食治疗中起到了很好的作用; α -AI 可减少糖向脂肪转化,延缓肠道排空,增加脂肪消耗,对肥胖患者减轻体质量也起到了很好的作用。因此, α -AI 可以用来防治糖尿病、动脉硬化症、高血脂、脂肪过多症及肥胖症^[1-2]。从白芸豆中获得 α -AI 具有高效价及耐热性而倍受关注^[3]。

α -AI 能特异性抑制 α -淀粉酶,从而减少 α -淀粉酶对淀粉的水解,碘试液与淀粉呈蓝色反应,并在一定波长下有最大吸光度。通过定量测定添加抑制剂前后淀粉量的变化可测得 α -AI 的活性^[4]。本研究对碘试液比色法测定 α -淀粉酶抑制剂活性的试验条件进行系列试验,以期寻找最佳试验条件,为 α -AI 的科学研究和生产检测提供可借鉴的参考数据。

1 材料与方法

1.1 仪器

德国赛多利斯 ME235S-电子分析天平;上海医疗器械五厂 H·H·S21-6C 电热恒温水浴锅;上海博迅公司 THZ-92A 恒温振荡器;上海大龙医疗器械有限公司 PotPette 100~1 000 μ L 手动单道可调式移液器;日本岛津 UV-1700 紫外可见光分光光度计等。

1.2 试剂

1.2.1 0.2 mol/L 乙酸盐缓冲液(pH 值 5.6)的配制 取 0.2 mol/L 乙酸溶液 90 mL,0.2 mol/L 乙酸钠溶液 910 mL,混匀即为 0.2 mol/L 乙酸盐缓冲液(pH 值 5.6)。其中,0.2 mol/L 乙酸溶液配制:吸取 11.8 mL 乙酸用蒸馏水定容至 1 000 mL;0.2 mol/L 乙酸钠溶液配制:称取 27.22 g 乙酸钠

用蒸馏水溶解,定容至 1 000 mL。

1.2.2 碘试液的配制 称取 0.317 g 碘溶于 4 mL 25% 碘化钾溶液中,加蒸馏水至 200 mL,取 10 mL 加入至 25 mL 25% 盐酸中,再用水稀释至 500 mL。

1.2.3 1.5% 可溶性淀粉溶液的配制 准确称取 105℃ 干燥 4 h 的可溶性淀粉 3.0 g,加 20 mL 蒸馏水使成混悬液,然后缓缓倒入约 100 mL 沸水中,溶解后煮沸至清亮透明,放冷,加 40 mL 0.2 mol/L 乙酸盐缓冲液(pH 值 5.6),用蒸馏水稀释至 200 mL。

1.2.4 淀粉基质液的配制 10 mL 1.5% 可溶性淀粉加 1 mL 蒸馏水混合,取其 0.1 mL 于 10 mL 碘试液中,立即混合后于波长 620 nm 处测定吸光度,取吸光度为 0.9~1.0 的 1.5% 可溶性淀粉溶液作为淀粉基质液。

1.2.5 酶稀释液的配制 1.641 g 乙酸钠、0.176 g 乙酸钙及 5.84 g 氯化钠溶于约 800 mL 蒸馏水中,用 1 mol/L 乙酸调至 pH 值为 6.0 后加蒸馏水至 1 000 mL。

1.2.6 α -淀粉酶试样溶液的配制 准确称取 0.5 g α -淀粉酶(购于北京奥特星生物技术有限责任公司),加酶稀释液溶解至 100 mL,在 40℃ 水浴中悬保温 2 h 后备用。用下述活性测定法进行预试验,试验溶液的蓝色全部消失并变为红色时作为试样溶液。

1.2.7 α -AI 试样溶液的配制 用以下方法从白芸豆中提取供试品 α -AI^[5]:白芸豆→粉碎→水浸提→硫酸铵盐析→透析→浓缩→干燥→产品(灰白色粉末状)。准确称取 0.5 g α -AI 试样,加酶稀释液溶解至 100 mL,在 40℃ 水浴中保温 2 h 后备用。

2 结果与分析

2.1 测定条件的选择

2.1.1 淀粉基质液浓度的确定 配制 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 系列可溶性淀粉溶液,分别取 10 mL 于各试管中,再各加 1 mL 蒸馏水混合,取其 0.1 mL 于 10 mL 碘试液中,立即混合后于波长 620 nm 处测定吸光度,并作为淀粉基质液进行活性测定,观察在波长 620 nm 处试验溶液的蓝色消失并变为红色时管数。确定淀粉基质液的浓度。

从表 1 可以看出,淀粉基质液浓度在 2.0% 及以下时,由

收稿日期:2014-04-03

作者简介:谢雨杉(1989—),女,福建福州人,硕士研究生,主要从事天然药物提取与分离及应用研究。E-mail:122513527@qq.com。
通信作者:李多伟,副教授,硕士生导师,主要从事天然动植物资源提取、分离与植物细胞工程研究。E-mail:duoweili@163.com。

于淀粉少、相对酶量大,待反应 6 min 后观察时几乎看不到蓝色消失而直接是浅红色;而淀粉基质液浓度在 3.0% 及以上时,由于淀粉多、相对酶量少,待反应 6 min 后观察至 20 min 时仍未见蓝色消失的迹象;淀粉基质液浓度在 2.5% 时,待反应 6 min 后,7~20 min 内可观察到蓝色消失转变为浅红色的过程。因此,淀粉基质液浓度确定为 2.5%。

表 1 淀粉基质液浓度的确定

浓度 (%)	取液量 (mL)	加水量 (mL)	吸光度	管数	结果
0.5	10	1	0.1~0.3	第 1 管	无法观察
1.0	10	1	0.3~0.5	第 1 管	无法观察
1.5	10	1	0.5~0.7	第 1 管	无法观察
2.0	10	1	0.7~0.9	第 1 管	无法观察
2.5	10	1	0.9~1.0	第 2 管至第 15 管	可观察到
3.0	10	1	1.0~1.2	15 管以后	无法观察

注: $n=5$ 。

2.1.2 反应温度的确定 取 10 mL 基质液于 25 mL 容量瓶中,分别在 20、30、40、50、60 ℃ 恒温振荡器内振摇 15 min 后,准确加入 1 mL α -淀粉酶试样溶液,立即振摇混匀后放回相应温度振荡器内继续振摇。从计时反应 6 min 后开始每过 1 min 取出 0.1 mL 于 10 mL 碘试液中,立即混合并作为试验溶液。于波长 620 nm 处测定试验溶液的蓝色消失并变为红色时的管数,确定酶促反应的最适温度。从表 2 可以看出,20、60 ℃ 时由于不是酶促反应最适温度,第 30 管以后仍无法观察到蓝色消失;30、50 ℃ 时虽接近酶促反应最适温度,但不是最适温度,在第 20 管至第 30 管可观察到蓝色消失,但时间过长不利于检测;40 ℃ 时是酶促反应的最适温度,在第 2 管至第 20 管可观察到蓝色消失,能满足检测观察的需要。

表 2 酶促反应最适温度的确定

温度(℃)	管数	结果
20	第 30 管以后	无法观察
30	第 20 管至第 30 管	可观察到
40	第 2 管至第 20 管	可观察到
50	第 20 管至第 30 管	可观察到
60	第 30 管以后	无法观察

注: $n=5$ 。

2.2 α -淀粉酶抑制剂活性的碘试液比色测定方法

按照上述确定的最佳基质液浓度、反应温度,对分离纯化的白芸豆 α -AI 进行活性测定。

2.2.1 α -淀粉酶活性的测定 取 10 mL 基质液于 25 mL 容量瓶中,40 ℃ 恒温振荡器内振摇 15 min 后准确加入 1 mL α -淀粉酶试样溶液,立即振摇混匀后放回 40 ℃ 振荡器内继续振摇。从计时反应 6 min 后开始每过 1 min 取出 0.1 mL 于 10 mL 碘试液中,立即混合并作为试验溶液。于波长 620 nm 处测定试验溶液的蓝色消失并变为红色时的吸光度 D_t 。用 1 mL 水代替试样溶液作为空白试验溶液,与试验溶液同样操作,测定吸光度 D_b 。求酶活性。

2.2.2 α -AI 活性的测定 精确吸取 α -AI 1.0 mL 与 α -淀粉酶溶液 1.0 mL 于试管中,充分摇匀后在 40 ℃ 恒温振荡器内反应 15 min,同时另取 10 mL 基质液于 25 mL 容量瓶中,于 40 ℃ 恒温振荡器内振摇 15 min 后,准确加入 1 mL 上述反

应液,立即振摇混匀后放回 40 ℃ 振荡器内继续振摇。从计时反应 6 min 后开始每过 1 min 取出 0.1 mL 于 10 mL 碘试液中,立即混合并作为试验溶液。于波长 620 nm 处测定试验溶液的蓝色消失并变为红色时的吸光度 D_t 。用 1 mL 水代替反应液作为空白试验溶液,与反应液同样操作,测定吸光度 D_b 。求酶活性。

2.2.3 酶活性计算 酶活性单位以 1 g 酶在 1 min 内基质液中蓝色的碘减少 10% 时为 1 U/g。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性 (U/g)} = (D_b - D_t) / D_b \times (100/10) \times (1/t) \times (1/m)$$

式中: t 为反应时间 (min); m 为 1 mL 试样溶液中酶的质量 (g), α -淀粉酶抑制剂活性 (U/g) = 抑制前 α -淀粉酶活性 - 抑制后 α -淀粉酶活性。

2.3 精密度测定

取试验分离纯化的白芸豆 α -AI 样品,精确称取,按照“2.2”节 α -淀粉酶抑制剂活性的碘试液比色测定方法进行测定,6 次连续重复测定,试验结果表明,该比色测定方法测定 α -AI 有良好的精密度, $RSD=1.82\%$ ($n=6$)。

2.4 重复性试验

取同批次试验分离纯化的白芸豆 α -AI 样品,精确称取 6 份,按照“2.2”节 α -淀粉酶抑制剂活性的碘试液比色测定方法进行测定,结果表明,该比色测定方法有良好的重复性, $RSD=2.12\%$ ($n=6$)。

2.5 加样回收率试验

从已知 α -AI 活性的样品溶液中精密吸取 300 μ L,共 6 份,分别准确加入 α -AI 对照品溶液 200 μ L,按照“2.2”节 α -淀粉酶抑制剂活性的碘试液比色测定方法进行测定,测加入量的回收率。从表 3 得出, α -AI 平均回收率为 99.03% ($n=6$)。

表 3 α -AI 加样回收率试验 ($n=3$)

浓度 (%)	α -AI 活性 (U/g)			对照品回收率 (%)	RSD (%)
	样品	对照品	实测		
1	1 208	3 638	4 802	98.79	2.02
2	1 220	3 682	4 835	98.18	1.94
3	1 195	3 657	4 853	100.03	1.97
4	1 213	3 662	4 848	99.26	2.10
5	1 209	3 649	4 817	98.88	1.93
6	1 216	3 655	4 836	99.04	1.95

注: $n=3$ 。

3 结论

通过对淀粉基质液浓度、反应温度系列试验条件的研究,确定 α -AI 的碘试液比色测定方法的最佳试验条件为:淀粉基质液浓度 2.5%,酶促反应的最适温度 40 ℃。此方法精密度为 $RSD=1.82\%$,平均回收率为 99.03% ($n=6$)。可见,该检测方法简便、快捷、重复性好,可用于 α -AI 活性的常规测定。

参考文献:

[1] Uchida R, Nase A. New enzymatic synthesis of 6 - modified maltooligosaccharides and their inhibitory activities for human α - amylases [J]. Carbohydrate Research, 1998, 307: 69.

刘水英,李新生,江海,等.彩色甘薯不同品种中基本物质及功能成分分析[J].江苏农业科学,2015,43(1):303-305.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.101

彩色甘薯不同品种中基本物质及功能成分分析

刘水英¹,李新生^{1,2,3},江海^{1,2,3},米桂¹,赵璇¹,王昕¹,韩豪¹

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院,陕西汉中 723000; 2. 陕西省资源生物重点实验室,陕西汉中 723000;

3. 陕西省黑色有机食品工程技术研究中心,陕西汉中 723000)

摘要:以不同品种的彩色甘薯为试验材料,采用紫外可见分光光度法、高效液相色谱法、参照食品安全国家标准等方法测定该系列彩色甘薯所含的基本物质及功能成分。分析结果可知,10 种彩色甘薯鲜样中水分含量为 58.52% ~ 73.26%,维生素 C 含量为 26.14 ~ 94.87 $\mu\text{g/g}$;干样中总糖含量为 27.58 ~ 33.30 mg/g ,还原糖含量为 6.56 ~ 18.82 mg/g ,淀粉含量为 31.13 ~ 69.86 mg/g ;粗脂肪含量占干粉质量 1.93% ~ 2.88%,花青苷含量为 0.098 7 ~ 4.357 8 mg/g ,总黄酮含量为 1.87 ~ 18.03 mg/g ,脱脂后的彩色甘薯干粉中 B 族维生素含量:维生素 B₁ 为 28.13 ~ 101.70 $\mu\text{g/g}$ 、维生素 B₂ 为 28.37 ~ 138.21 $\mu\text{g/g}$ 、维生素 B₆ 为 20.73 ~ 354.54 $\mu\text{g/g}$ 。结果表明,彩色甘薯中各种基本物质及功能成分的含量与甘薯品种、生长条件、气候环境、栽培条件等诸多因素有关;当生长环境及栽培条件相同时,不同品种甘薯中相同基本物质或功能成分不同,同一品种甘薯中不同基本物质或功能成分的含量不同。在供试薯样中的水分、总糖及脂肪的含量在甘薯品种间差异不显著,不同品种甘薯中水分、总糖及脂肪含量基本一致。而薯样中花青苷、总黄酮、维生素 C、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆ 在不同品种甘薯中的含量差异较大,尤其是花青苷、总黄酮、维生素 B₆。

关键词:彩色甘薯;品种;基本物质;功能成分

中图分类号: S531.01

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)01-0303-03

甘薯(sweet potato)属旋花科甘薯属,别称山芋、红芋、地瓜、红苕,为多年生或 1 年生蔓生草本植物。因其具有抗旱、耐贫瘠、易栽培、高产稳产、适应性强等特点,在我国主要粮食作物中占据相当重要的地位,仅次于水稻、小麦和玉米^[1]。我国甘薯资源丰富,种植面积和总产量均居世界首位^[2-4]。彩色甘薯是甘薯品种中一个重要的分支,在我国甘薯产业中占据很重要的地位^[5-6],除了含有普通甘薯所具有的淀粉、膳食纤维、碳水化合物、糖类物质等基本成分外,还富含天然色素——花青苷^[7-8],以及微量元素、B 族维生素、维生素 C、胡萝卜素、视黄醇、糖蛋白^[9-10]、去氢表雄(甾)酮及不饱和脂肪酸等多种功能因子。《本草纲目》记载“补虚乏,益气力,健脾胃,强肾阴,功效同薯蓣”。

近年来,随着人们物质生活水平的提高和健康基本物质及保健意识的不断增强,甘薯的用途逐渐从原来的单纯食用

转变为加工为主、食饲兼用^[11]。伴随着甘薯产业化发展及产后加工的深入,急需选择出与加工相适应的甘薯品种,如鲜食型、高糖型、高色素型、高淀粉型、保健型、兼容型品种。迄今为止,虽然有对甘薯^[11-12]及彩色甘薯基本物质成分^[13-18]的报道,但还很系统。仍有很多区域及地方的甘薯品种的化学基本物质成分尚不清楚^[19-20],严重制约了甘薯的综合利用及产品开发。

本研究从食品加工的角度出发,根据相关食品安全国家标准及相关卫生标准对 10 种不同品种彩色甘薯的基本理化数据和基本物质成分进行了系统分析与检测,旨在为彩色甘薯品种的选育、栽培、品质分析,以及彩色甘薯不同品种产品深加工及在食品加工领域的应用提供科学、合理依据,为进一步提高甘薯资源的附加值及其资源综合开发利用,推动地方区域经济发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

10 种不同品种彩色甘薯,均由陕西省汉中市农业技术推广中心提供,样品采自陕西省汉中市汉台区洋县龙亭镇彩色甘薯种植基地。不同品种(品系)彩色甘薯及其外观特征见表 1。

收稿日期:2014-03-03

基金项目:陕西省科技统筹创新工程计划(编号:2014KTCL02-18)。

作者简介:刘水英(1987—),女,陕西汉中中人,硕士研究生,主要从事应用生物化学方向的研究。E-mail:snutlsy@163.com。

通信作者:李新生,教授,主要从事生物资源开发应用的研究。

E-mail:lx9@tom.com。

[2] Munck L, Mundy L, Vaag P. Characterization of enzyme inhibitors in barley and their tentative role in malting and brewing[J]. Amer Soc Brew Chem J, 1985, 43: 35-38.

[3] Bernard F G, Alli I. Characterization of a purified α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) [J]. Food Research International, 1998, 31: 217-225.

[4] 张文德. 市售食品生产用 α -淀粉酶活性的统一测定方法[J]. 国外医学:卫生学分册, 1999, 26(4): 65-66.

[5] Ho F M, Whitaker J R. Purification and partial characterization of white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor from two experimental cultivars[J]. Journal of Food Biochemistry, 1993, 17: 15-33.