

马艳弘,钟小仙,乔月芳,等. 双波长法测定珍珠粟淀粉中直链和支链淀粉的含量[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):331-334.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.103

双波长法测定珍珠粟淀粉中直链和支链淀粉的含量

马艳弘¹, 钟小仙², 乔月芳^{1,3}, 李亚辉¹, 张宏志¹, 李芬芳³

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014;2. 江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏南京 210014;
3. 山西农业大学食品科学与工程学院,山西太谷 030801)

摘要:研究建立同时测定珍珠粟直链和支链淀粉含量的检测方法,并通过测定分析13个种质资源中直链与支链淀粉含量的变化,为筛选适宜的加工品种提供依据。根据双波长选择原理和扫描光谱,确定直链淀粉的测定波长、参比波长分别为634、426 nm,支链淀粉的测定波长、参比波长分别为539、763 nm。直链淀粉浓度在4~44 mg/L之间($r=0.9993$)、支链淀粉浓度在20~120 mg/L($r=0.9993$)之间,其碘复合物与吸光度呈良好的线性关系。结果表明,13个珍珠粟供试样品中直链、支链淀粉的含量分别为16.07%~23.48%、52.34%~73.80%,支链淀粉含量差异是引起总淀粉含量差异的主要因素。样品88、50、59、1-1的品种优良,可作为选种栽培、精深加工的优选品种。

关键词:双波长分光光度法;珍珠粟;直链淀粉;支链淀粉

中图分类号:S515.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)12-0331-04

珍珠粟(pearl millet),即御谷(*Pennisetum glaucum*),亦称美洲狼尾草等,原产于非洲,现已广泛分布于热带、亚热带地区,为世界上六大禾谷类作物之一,是位于印度、非洲等半干旱地区人们的主要杂粮作物。珍珠粟具有生长速度快、茎叶产量高、营养成分高、适应性广、适口性好、抗逆性强等特点,尤其适合在高温、干旱、盐碱地区生长^[1],既是重要的优质牧草和粮食作物来源^[2],同时也是防风固沙、改良土壤的优良先锋草种^[3]。我国珍珠粟的栽培历史悠久,在古代曾将其作为贡品供皇室贵族享用,因而珍珠粟也有“御谷”之称,但是真正从事珍珠粟的研究仅始于20世纪40年代。经过几十年的发展,目前已陆续培育、鉴定、引进包括宁牧26-2美洲狼尾草、宁杂3号美洲狼尾草、宁杂4号美洲狼尾草等国家审定品种在内的300多份品种资源,栽培面积逐年增加,在畜牧养殖业、工业造纸、生物能源等领域发挥着越来越重要的作用^[4-5]。

珍珠粟种子营养丰富,不仅含有大量淀粉,而且还含有比小麦、大米、玉米、高粱更高含量的蛋白、脂肪和钙、铁、锌等营养成分^[6]。此外,珍珠粟还含有丰富的膳食纤维、多酚和黄

酮等生物活性物质^[7],具有清除自由基、抗氧化^[8-9]、预防糖尿病、抗癌、预防便秘、控制血压和低密度脂蛋白水平等生物学功能^[10-11],可作为预防多种疾病发生的重要食疗策略^[12]。但是遗憾的是,迄今为止国内学者对珍珠粟的研究仅集中在栽培育种和茎叶的饲料发酵方面,而对珍珠粟作为杂粮的营养特性、食用品质、检测技术等方面的研究却未见报道。

淀粉是珍珠粟最主要的食用成分,其含量和组成对其功能、营养及食味特性与加工品质影响较大^[13]。差示扫描量热仪法(简称DSC)、高效空间排阻色谱法(简称HPSEC)、近红外光谱法(简称NIR)、热重法(简称TG)、酶法、双波长比色法、三波长检测法^[14-15]均可用于淀粉的检测。这些方法有的操作繁琐,有的易受样品中糖类、脂类等物质干扰,有的虽然精确,但是检测成本高、结果计算复杂,使其应用均受到不同程度的限制。其中,双波长比色法因具有简便快速、成本低、准确度高并可同时检测支链、直链淀粉等特点而在植物淀粉检测中备受关注^[16-18]。本研究采用双波长比色法同时测定不同资源珍珠粟中直链、支链淀粉的含量,在建立同时测定珍珠粟中支链、直链淀粉含量的可靠分析技术的同时,进一步分析不同种质资源珍珠粟淀粉组分比例间的差异,为进一步开展珍珠粟杂交育种、品质分析、保健食品开发以及资源的综合利用提供参考。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

供试珍珠粟资源:采自江苏省农业科学院试验基地,均为 National Academy of Sciences,1996,93(23):12764-12767。

[9]Peruga A,Beltrán J,López F,et al. Determination of methylisothiocyanate in soil and water by HS-SPME followed by GC-MS-MS with a triple quadrupole[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry,2014,406(22):5271-5282。

[10]武邵武,侯润兰,麻耀君. 芹菜农药残留超标原因分析及其对策的研究[J]. 农药科学与管理,2010,31(5):35-37。

收稿日期:2016-04-22

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)1005-7];

国家牧草产业技术体系盐城综合试验站(编号:CARS-35-31);

江苏省农业三新工程(编号: SXGC[2015]334)。

作者简介:马艳弘(1972—),女,山西中阳人,博士,副研究员,主要从事耐盐蔬菜食品加工技术及副产物综合利用研究。Tel:(025)84390613;E-mail:ma_yhhy@126.com。

[6]Ding L P,Wei Y H. Determination of pyridaben and buprofezin residues in tea[J]. Agrochemicals,2011,50(5):352-354。

[7]胡贝贞,蔡海江,宋伟华. 茶叶中氟虫脲等8种农药残留的液相色谱-串联质谱法测定及不确定度评定[J]. 色谱,2012,30(9):889-895。

[8]Hainzl D,Casida J E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity[J]. Proceedings of the

通过美国引进的 Bil3B 综合种套袋自交后采集的具有不同特性的种质资源。种子自然干燥后,用万能粉碎机粉碎,储存于封口袋内并放置于干燥器中保存备用。直链与支链淀粉标准品:美国 Sigma 公司;其余常规试剂石油醚、氢氧化钾、盐酸、碘、碘化钾均为国产分析纯产品。

碘试剂的配制,称取 18.5 g 碘化钾,溶于少量蒸馏水中,再加 6.5 g 碘,待溶解后用蒸馏水定容至 100 mL,贮存于棕色瓶中备用。

1.2 仪器与设备

D-8 紫外可见分光光度计,南京菲勒仪器有限公司;ML204 万分之一天平,梅特勒仪器有限公司;DHG-9076A 电热鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;DK-8D 数显恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;FW100 万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;SZF-06A 粗脂肪测定仪,上海新嘉电子有限公司;FE20 pH 计,梅特勒仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 淀粉标准工作液的制备 准确称取各 0.100 0 g 直链淀粉标准品、支链淀粉标准品,分别放入 100 mL 烧杯中,加 10 mL 1 mol/L 氢氧化钾溶液,置于 85 °C 水浴中充分搅拌溶解。然后用蒸馏水定容至 50 mL,混合均匀,即为 2.0 mg/mL 直链淀粉标准工作液和 2.0 mg/mL 支链淀粉标准工作液。

1.3.2 直链与支链淀粉检测波长的确定 吸取 1.0 mL 直链淀粉标准工作液和 0.5 mL 支链淀粉标准工作液,分别放入 100 mL 烧杯中,加 25 mL 蒸馏水,用 0.1 mol/L 盐酸溶液调 pH 值至 3.0,再加入 0.05 mL 碘试剂,并用蒸馏水定容至 50 mL。室温下静置 25 min 后以蒸馏水为空白对照,分别在紫外-可见分光光度计上进行 400~800 nm 波段光谱扫描,分别获得二者的吸收光谱图,根据等吸收点作图法确定直链淀粉的测定波长(λ_1)、参比波长(λ_2),以及支链淀粉的测定波长(λ_3)、参比波长(λ_4)。

1.3.3 直链与支链淀粉标准曲线的绘制 分别取 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 mL 直链淀粉标准工作液于烧杯中,加 25 mL 蒸馏水,用盐酸溶液调节 pH 值至 3.0,加 0.05 mL 碘试剂,用蒸馏水定容至 50 mL。室温下静置 25 min,在波长 λ_1 、 λ_2 下分别测定吸光度 D_1 、 D_2 ,以二者的差值 ΔD 为纵坐标、直链淀粉浓度为横坐标,即可绘制出双波长直链淀粉标准曲线;分别取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 支链淀粉标准工作液于烧杯中,其他操作同直链淀粉,根据结果即可绘制支链淀粉标准曲线。

1.3.4 珍珠粟种子的处理与淀粉含量的测定 将自然风干的珍珠粟种子用万能粉碎机打成粉末,称质量,置于 60 °C 鼓风干燥箱中烘干至恒质量,测得水分含量 W_1 ;称取 1.000 g 烘干样品(m),加入 80 mL 石油醚,加热回流脱脂 4 h,然后放入干燥箱中烘干至恒质量,利用粗脂肪测定仪测定粗脂肪含量 W_2 。再称取 0.100 g 脱脂样品,加入 10 mL 1 mol/L 氢氧化钾,于 85 °C 水浴中充分搅拌溶解后,用蒸馏水定容至 50 mL,静置 20 min 后过滤。各品种均取 3 mL 滤液,加入 25 mL 蒸馏水,用盐酸溶液调节 pH 值至 3.0,样品测定液中加入 0.05 mL 碘试剂,测定液、空白液均用蒸馏水定容至 50 mL。室温静置 25 min 后,以蒸馏水为空白对照,测定各样品吸光度。根据直链、支链淀粉的双波长标准曲线算出样品的直链、

支链淀粉含量,二者相加即得烘干样品总淀粉含量。直链淀粉、支链淀粉、总淀粉含量计算公式分别如下:

$$\text{直链淀粉含量} = \frac{C_{\text{直}} \times 50 \times 50 \times 10}{3 \times (m \times 1000) \times (1 - W_2)} \times 100\% ;$$

$$\text{支链淀粉含量} = \frac{C_{\text{支}} \times 50 \times 50 \times 10}{3 \times (m \times 1000) \times (1 - W_2)} \times 100\% ;$$

$$\text{总淀粉含量} = \text{直链淀粉含量} + \text{支链淀粉含量}。$$

式中: $C_{\text{直}}$ 、 $C_{\text{支}}$ 分别为根据直链、支链淀粉标准曲线计算的样品液中直链、支链淀粉浓度,mg/mL。

1.3.5 双波长法的测定稳定性、测定精度与加标回收率试验 分别取直链、支链淀粉标准液,每隔 5 min 测定 1 次吸光度,计算平均值、相对标准偏差 RSD 值,评价双波长检测法的稳定性;对于同一珍珠粟样品,同时测定直链、支链淀粉的含量,进行 4 次重复测定,计算结果的平均值与 RSD 值,评价其测定精度;在已测得直链、支链淀粉含量的珍珠粟样品中,分别添加准确称量的不同质量的直链、支链淀粉标准品,测定直链、支链淀粉含量,按照下列公式计算加标回收率及 RSD 值,以此检验双波长法测定珍珠粟淀粉含量的准确度:

$$\text{加标回收率} = (m_1 - m_2) / m_3 \times 100\% 。$$

式中: m_1 为加标准品后样品测定的总质量,g; m_2 为样品中原有直链或支链淀粉的质量,g; m_3 为添加的直链或支链淀粉标准品的质量,g。

2 结果与分析

2.1 直链、支链淀粉测定波长与参比波长的确定

利用淀粉经 I_2 -KI 复合物溶液染色后直链淀粉呈蓝色、支链淀粉呈紫色的原理,将直链与支链淀粉标准品经碘试剂处理后,用紫外-可见分光光度计进行 400~800 nm 的光谱扫描。由图 1 可知,直链、支链淀粉的最大吸收波长分别为 634 nm(λ_1)、539 nm(λ_3)。按照双波长测定的等吸收点作图法,确定直链淀粉测定波长为 634 nm(λ_1),参比波长为 426 nm(λ_2);支链淀粉测定波长为 539 nm(λ_3),参比波长为 763 nm(λ_4)。

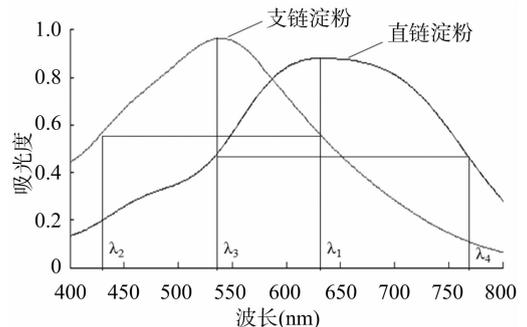


图1 直链、支链淀粉测定波长与参比波长分析结果

2.2 直链、支链淀粉标准曲线的绘制

采用双波长分光光度计法,分别于已确定的双波长条件下测定不同浓度直链、支链淀粉标准工作液的吸光度。根据测定结果绘制的直链、支链淀粉标准曲线分别如图 2、图 3 所示,所得直链淀粉的回归方程为 $y_{\text{直}} = 19.796 0x - 0.050 3$, $r^2 = 0.999 3$;支链淀粉的回归方程为 $y_{\text{支}} = 5.000 0x - 0.021 3$, $r^2 = 0.999 3$ 。结果表明,直链淀粉浓度在 4~44 mg/L 之间,支链

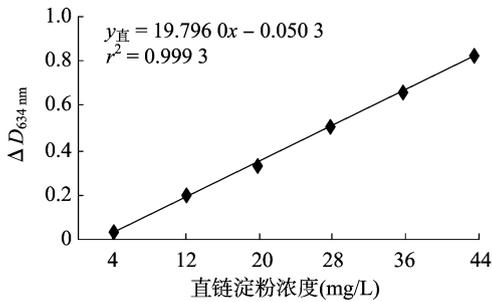


图2 直链淀粉标准曲线

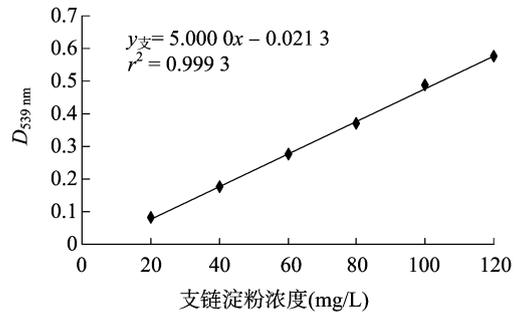


图3 支链淀粉标准曲线

淀粉浓度在 20 ~ 120 mg/L 之间,其碘复合物与吸光度呈良好的线性关系。

2.3 不同资源珍珠粟种子的淀粉含量变化

由表 1 可见,供试样品水分含量为 7.92% ~ 9.48%,脂肪含量为 5.43% ~ 8.27%;烘干样品中直链淀粉含量为 16.07% ~ 23.48%,支链淀粉含量为 52.34% ~ 73.80%,总

淀粉含量为 71.11% ~ 90.55%;品种间支链淀粉变异系数(10.27%)大于直链淀粉的变异系数(9.80%),表明珍珠粟种子间总淀粉差异主要由支链淀粉引起;品种间支链、直链淀粉含量比的变异系数最大(15.83%),表明不同品种珍珠粟种子的食用与加工特性有较大差异,其中样品 1-1 的直链淀粉含量最低,支链淀粉含量最高。

表 1 珍珠粟样品中直链、支链淀粉含量的测定结果

样品编号	水分含量 (%)	脂肪含量 (%)	直链淀粉(失水)含量 (%)	支链淀粉(失水)含量 (%)	总淀粉(失水)含量 (%)	支链、直链淀粉含量比
90	9.05	5.46	18.41	56.35	74.77	3.06
67	8.12	7.35	18.45	59.60	78.05	3.23
88	9.00	6.37	21.47	69.08	90.55	3.22
48	8.78	6.39	18.92	58.08	77.00	3.07
97	8.78	7.30	21.31	58.37	79.69	2.74
1	8.57	5.49	23.48	63.09	86.57	2.69
3	8.24	6.42	18.76	52.34	71.11	2.79
79	8.76	6.39	22.17	61.95	84.12	2.79
55	8.06	8.27	20.58	60.32	80.90	2.93
12	8.72	7.30	18.72	54.85	73.56	2.93
50	9.48	5.43	20.03	68.73	88.76	3.43
69	8.51	6.40	20.21	68.00	88.21	3.36
1-1	7.92	6.90	16.07	73.80	89.87	4.59
变异系数 (%)	5.15	12.82	9.80	10.27	8.15	15.83

2.4 双波长法的测定稳定性试验

取直链淀粉、支链淀粉标准液,每隔 5 min 测定 1 次吸光度。从表 2 可见,直链、支链淀粉溶液在所测时间范围内测定

值的相对偏差 $RSD < 1\%$, 15 ~ 30 min 内检测结果基本稳定,表明试验重复性好,双波长法的检测结果相对稳定。

表 2 直链、支链淀粉在不同测定时间的吸光度

淀粉种类	不同测定时间的吸光度							RSD (%)
	15 min	20 min	25 min	30 min	35 min	40 min	平均值	
直链	0.875	0.880	0.882	0.881	0.873	0.866	0.876	0.698
支链	0.833	0.841	0.842	0.840	0.832	0.830	0.836	0.627

2.5 双波长法测定精确度评价

选择 50、69、1-1 样品,经脱水、脱脂处理后对其中的直链、支链淀粉含量分别进行 4 次重复测定,由表 3 可见,4 次试验值之间的一致性较好,3 个样品的直链、支链淀粉的 RSD 均小于 1%,表明采用双波长法同时测定珍珠粟淀粉样品中直链、支链淀粉具有较高的精确度。

2.6 样品加标回收率测定结果

为了检测珍珠粟资源种子中淀粉含量测定结果的准确性,在已测得直链、支链淀粉含量的样品中,选择 88 号样品,添加准确称量的直链、支链淀粉标准品,求其回收率。由表 4

可见,直链、支链淀粉其回收率在 95.00% ~ 98.29% 之间, RSD 均小于 1.5%,满足检测要求,说明该分析检测方法具有较高的准确度,适用于同时测定珍珠粟种子样品中的直链、支链淀粉含量。

3 结论

双波长比色法是一种相对准确、稳定、被广泛应用于植物淀粉含量精细检测的快速检测方法。本研究利用碘试剂与淀粉发生的显色反应,建立了采用双波长分光光度法同时测定珍珠粟直链与支链淀粉含量的快速检测方法。由其光谱扫描

表3 部分珍珠粟样品测定重复性试验结果

样品编号	淀粉种类	淀粉含量(%)					RSD (%)
		重复1	重复2	重复3	重复4	平均值	
88	直链	21.41	21.22	21.53	21.67	21.46	0.77
	支链	68.97	69.24	68.69	69.32	69.01	0.36
50	直链	19.87	19.83	20.16	20.22	20.02	0.86
	支链	68.36	68.72	68.83	69.02	68.73	0.35
69	直链	20.22	20.35	19.97	20.25	20.20	0.69
	支链	67.70	67.82	68.43	68.07	68.00	0.41
1-1	直链	16.13	16.20	15.90	15.84	16.02	0.94
	支链	73.67	73.84	74.36	74.34	73.80	0.50

表4 直链、支链淀粉回收率试验结果

淀粉种类	加入淀粉 标品量 (mg)	原有样品 淀粉量 (mg)	混合后测 得淀粉量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
直链	10	23.081	32.695	96.14	1.25
	15	23.081	37.520	96.26	
	20	23.081	42.740	98.29	
支链	10	74.283	83.783	95.00	1.45
	15	74.283	88.950	97.78	
	20	74.283	93.617	96.67	

结果发现,珍珠粟直链淀粉的测定波长、参比波长分别为634.426 nm,支链淀粉的测定波长、参比波长分别为539、763 nm;直链淀粉浓度在4~44 mg/L之间线性良好,支链淀粉浓度在20~120 mg/L之间线性良好。此方法精密度高、稳定性好(RSD均小于1.00%)、样品加标回收率在95.00%~98.29%之间,且相对标准偏差小(RSD小于1.5%),可用于珍珠粟直链、支链淀粉含量的准确检测。

禾谷类作物中直链与支链淀粉的含量与比例会直接影响作物的色泽、香气、柔软性等食用品质与出饭率、贮藏加工特性^[19]。有研究认为,含有中等偏低直链淀粉含量的品种或支链淀粉含量高的品种的品质较好^[20-21]。本研究在建立珍珠粟淀粉双波长法检测基础上,对不同品种珍珠粟中直链淀粉、支链淀粉进行测定,结果表明:供试不同珍珠粟种质资源的食用加工特性有较大差异,直链、支链淀粉的含量分别为16.07%~23.48%、52.34%~73.80%,总淀粉含量为71.11%~90.55%,支链淀粉含量差异是总淀粉含量差异的主要因素,其变异系数(10.27%)高于直链淀粉含量的变异系数。样品88、50、59、1-1的品种优良,直链淀粉含量较低、支链淀粉含量较高,可作为选种栽培、精深加工的主要品种。

参考文献:

[1] Yadav O P. Drought response of pearl millet landrace - based populations and their crosses with elite composites [J]. Field Crops Research, 2010, 118(1): 51 - 56.

[2] 吴娟子, 钟小仙, 贡玉清, 等. 杂交狼尾草青贮草料饲喂新西兰肉兔的效果[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 199 - 201.

[3] 王凭青, 段传人, 王伯初, 等. 杂交狼尾草水土保持能力的实验研

究[J]. 水土保持学报, 2005, 19(1): 114 - 116, 135.

[4] 范希峰, 侯新村, 朱毅, 等. 杂交狼尾草作为能源植物的产量和品质特性[J]. 中国草地学报, 2012, 34(1): 48 - 52.

[5] 张德荣, 母军, 王洪滨, 等. 杂交狼尾草制造刨花板工艺研究[J]. 北京林业大学学报, 2008, 30(3): 136 - 139.

[6] Klopfenstein C F, Hoseney R C. Nutritional properties of sorghum and the millets[M]//Dendy D A V. Sorghum and millets: chemistry and technology. St Paul, MN: American Association of Cereal Chemists Inc, 1995: 261 - 270.

[7] Nambiar V S, Sareen N, Daniel M, et al. Flavonoids and phenolic acids from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) based foods and their functional implications [J]. The Journal of Functional Foods in Health and Disease, 2012, 2(7): 251 - 280.

[8] Shahidi F, Chandrasekara A. Millet grain phenolics and their role in disease risk reduction and health promotion: a review [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(2): 570 - 581.

[9] Chandrasekara A, Shahidi F. Bioactivities and antiradical properties of millet grains and hulls [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(17): 9563 - 9571.

[10] Nambiar V S, Dhaduk J J, Sareen N, et al. Potential functional implications of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) in health and disease [J]. Journal of Applied Pharmacological Science, 2011, 1(10): 62 - 67.

[11] Hithamani G., Srinivasan K. Effect of domestic processing on the polyphenol content and bioaccessibility in finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) [J]. Food Chemistry, 2014, 164(164): 55 - 62.

[12] Chandrasekara A, Shahidi F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated *in vitro* digestion and microbial fermentation [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 226 - 237.

[13] 金丽晨, 耿志明, 李金州, 等. 稻米淀粉组成及分子结构与食味品质的关系[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(1): 13 - 18.

[14] 曾凡逢, 赵鑫, 周添红, 等. 双波长比色法测定马铃薯直链/支链淀粉含量[J]. 现代食品科技, 2012, 28(1): 119 - 122.

[15] Séné M, Thévenot C, Prioul J L. Simultaneous spectrophotometric determination of amylose and amylopectin in starch from maize kernel by multi - wavelength analysis [J]. Journal of Cereal Science, 1997, 26(2): 211 - 221.

[16] 黄惠芳, 罗燕春, 田益农, 等. 双波长分光光度法测定木薯块根淀粉含量的动态变化[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(10): 113 - 117.

[17] 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]. 江西农业学报, 2010, 22(12): 117 - 119, 123.

[18] 金玉红, 张开利, 张兴春, 等. 双波长法测定小麦及小麦芽中直链、支链淀粉含量[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(1): 137 - 140.

[19] 刘成, 张佩丽, 沈群. 河北产区9个谷子品种淀粉性质的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(1): 81 - 84.

[20] 马雨洁, 刘航, 许芳溢, 等. 淀粉组成对荞麦面条食用和烹调品质的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 49 - 52.

[21] 马金丰, 李延东, 李辉, 等. 春谷直链淀粉含量与淀粉黏滞性相关性的分析[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(12): 5 - 8.