

陈莹,杨瑰丽,郭涛,等. 稻米直链淀粉含量的 96 微孔高通量快速测定方法[J]. 江苏农业科学,2020,48(5):185-188.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.039

稻米直链淀粉含量的 96 微孔高通量快速测定方法

陈莹,杨瑰丽,郭涛,吴锐,李日文,黄翠红,周丹华,王慧

(华南农业大学农学院,广东广州 510000)

摘要:直链淀粉含量的快速高通量测定方法对国际标准法(简称“国际法”,BS EN ISO6647-2:2015《稻米 直链淀粉含量的测定 第2部分 常规方法》)进行了改良,可以极大地提高水稻育种材料的筛选效率、适应当前水稻稻米品质育种的新需求。结果表明,高通量法测得的吸光度与直链淀粉含量有良好的相关性,相关系数达 0.991 1,该方法直链淀粉含量的测定值与国际法的测定值无显著差异;同时,高通量法还具有简单、易操作、样品量少、批量(96 个样本)测定等优点,能用于水稻诱变群体后代或品种选育过程中的海量株系大规模初筛,可极大地提高稻米品质研究的效率。

关键词:大米;直链淀粉含量;96 微孔高通量快速测定方法;吸光度;相关性

中图分类号: TS210.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)05-0185-04

大米是世界上最重要的粮食作物之一,我国作为大米最重要的生产国和消费国,对大米的品质也提出了越来越高的要求^[1]。直链淀粉作为大米的重要组成,一直被认为是影响大米蒸煮食味品质的关键因素^[2-4]。直链淀粉是 D-葡萄糖基通过

$\alpha-(1,4)$ 糖苷键连接而成,空间构想卷曲成螺旋形,是带有少量 $\alpha-(1,6)$ 分支(小于 0.1%)的线性小分子^[5-6]。一般来说,大米中直链淀粉含量高,米饭偏硬,饭粒干燥而蓬松,色泽较暗;相反,米饭较柔软而有弹性,饭粒光泽度好^[7]。

目前,国内外测定直链淀粉含量的标准方法主要有以下 3 种:国际标准 BS EN ISO6647-2:2015《稻米 直链淀粉含量测定 第2部分 常规方法》(简称“国际法”)、国家标准 GB/T 15683—2008《大米直链淀粉含量的测定》、原农业部标准 NY/T 2639—2014《稻米直链淀粉的测定 分光光度法》。这 3 种标准方法的原理都是利用碘比色法,主要区

收稿日期:2019-02-22

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0100104)。

作者简介:陈莹(1994—),女,安徽淮南人,硕士,主要从事水稻食味品质改良研究。E-mail:qazwsxedc1577@163.com。

通信作者:王慧,博士,教授,主要从事高产优质常规稻育种、杂交稻恢复系选育和分子改良以及空间诱变机理研究。E-mail:wanghui@scau.edu.cn。

[13]张静,赵昶灵,郭华春. “彩色马铃薯”块茎花色苷分子结构研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2009(4):719-725.

[14]Ieri F, Innocenti M, Andrenelli L, et al. Rapid HPLC/DAD/MS method to determine phenolic acids, glycoalkaloids and anthocyanins in pigmented potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and correlations with variety and geographical origin[J]. Food Chemistry, 2011, 125(2):750-759.

[15]Gutierrez - Quequezana L, Vuorinen A L, Kallio H A. Improved analysis of anthocyanins and vitamin C in blue - purple potato cultivars[J]. Food Chemistry, 2018, 242(1):217-224.

[16]Burgos G, Amoros W, Munoa L, et al. Total phenolic, total anthocyanin and phenolic acid concentrations and antioxidant activity of purple - fleshed potatoes as affected by boiling[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2013, 30(1):6-12.

[17]Agnieszka K, Anna B, Grazyna L, et al. Antioxidant activity and quality of red and purple flesh potato chips[J]. LWT - Food

Science and Technology, 2015, 62(1):525-531.

[18]孙欣,赵林,厉玉婷,等. 紫薯花色苷提取工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2013, 116(1):81-87.

[19]肖海峻,孟利前,施鹏飞. 响应面法优化紫薯花青素的超声波提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(7):33-38.

[20]Adje F, Lozano Y F, Lozano P, et al. Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound - assisted water extraction[J]. Industrial Crops and Products, 2010, 32(3):439-444.

[21]黄琼,陈婵,彭宏,等. 微波法萃取紫色甘薯皮原花青素工艺的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(4):199-203.

[22]王仁雷,周峰,周泉澄,等. 紫马铃薯花色苷的提取纯化与鉴定[J]. 食品科学, 2011, 32(22):55-59.

[23]刘玮,王华平,羊初女,等. 紫甘薯色素的磷酸提取工艺研究[J]. 广州化工, 2017, 45(18):71-74.

别在于脱脂及显色步骤等方面。国家标准规定须要对材料进行甲醇溶液回流抽提脱脂,此步骤操作复杂、耗费时间、技术性强,且上述 3 种方法均需要较多的样品以及试剂,这都不利于对大批量样品实施高效、准确的检测。

基于直链淀粉广泛的应用前景,以及其含量在评价粮食品质和农业选种、育种时的实际意义,本研究报道一种结合微孔板分光光度计高通量、快速测定稻米直链淀粉含量的方法。与以上 3 种方法相比,样品前期处理不须脱脂,简单易行;所需样品量少,最少仅需 10 mg;样品的糊化和显色步骤均在 2 mL 离心管中进行,易于操作,测定周期大大缩短;可以一次完成 96 个样品的测量,单位时间内(1 d)可测定多个批次样品,尤其适用于大规模的突变体及育种材料的直链淀粉含量的初筛。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

蒸馏水;95%乙醇溶液;氢氧化钠溶液:1.0 mol/L 氢氧化钠溶液、0.09 mol/L 氢氧化钠溶液;1 mol/L 乙酸溶液;碘试剂:称取 (2.000 ± 0.005) g 碘化钾,加适量的水以形成饱和溶液,加入 (0.200 ± 0.001) g 碘,碘全部溶解后溶液定量移至 100 mL 容量瓶中,摇匀;已知直链淀粉含量的大米粉标准品:中国水稻研究所;试验用的 12 个品种分别为华航丝苗、胜巴丝苗、华航 33 号、象牙香占、兴宁黑糯、华航 31 号、黄广华占 1 号、合莉油占、金农丝苗、桂育 9 号、桂禾丰、美香占 2 号,分别对应样 1 至样 12。

1.2 试验原理

将大米粉碎至细粉以破坏淀粉的胚乳结构,使其易于分散及糊化,将试样分散在氢氧化钠溶液中,向一定量的试样分散液中加入碘试剂,大米淀粉与碘形成显色复合物,在波长 620 nm 处测定显色复合物的吸光度,其吸光度与直链淀粉含量成正比。

1.3 试样的制备

原始稻谷样品收获后在实验室常温放置 3 个月。经砻谷、碾米过程制成精米,取至少 10 g 精米,用高速粉碎机粉碎成粉末,过 100 目筛,置于密封袋中室温保存备用。

1.4 试验方法

1.4.1 按国际法处理样品 称取 (100 ± 0.5) mg 试样于 100 mL 锥形瓶中,小心加入 1.0 mL 乙醇溶

液到试样中,将粘在瓶壁上的试样冲下。移取 9.0 mL 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液到锥形瓶中,并轻轻摇匀,随后将混合物在沸水浴中加热 10 min 或在封口瓶中静置过夜以分散淀粉,取出冷却至室温(如果是采取加热方式分散淀粉)。转移到 100 mL 容量瓶中。加蒸馏水定容后,剧烈振荡混匀。准确移取 0.5 mL 样品溶液到预先加入 5 mL 水的 20 mL 带盖的比色管中,加 0.1 mL 乙酸溶液,摇匀,再加入 0.2 mL 碘试剂,最后加入 4.2 mL 水至比色管中,使液体容积达到 10 mL,摇匀,用空白溶液调零,利用 7239G 型可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司)在 620 nm 处测定其吸光度(表 1)。

1.4.2 按高通量法处理样品 称取 (10 ± 0.2) mg 试样于 2 mL 离心管中,小心加入 0.1 mL 乙醇溶液到试样中,再移取 0.9 mL 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液到离心管中,涡旋,混匀,随后顺时针离心约 5 s,并置于其林贝尔仪器制造有限公司生产的 GL-1800 型干式恒温器中 85 °C 加热 20 min 以分散淀粉,取出冷却至室温。准确移取 0.01 mL 样品溶液到预先加入约 2 mL 水的 2 mL 离心管中,加 0.02 mL 乙酸溶液,摇匀,再加入 0.04 mL 碘试剂,摇匀,静置 10 min,用空白溶液调零,使用移液枪准确移取 4 个标准样以及 91 个待测的样品各 300 μ L 至 96 孔塑料微孔板中,借助微孔板分光光度计(美国伯腾仪器有限公司)在 620 nm 处测定吸光度(表 1)。

2 结果与分析

2.1 2 种方法操作过程的差异分析

国际法和高通量法测定大米直链淀粉含量的差异主要表现在使用的材料与试剂用量、测定时间等方面。前者对试剂以及去离子水消耗大,测量耗时较长;而后者测量耗时短,涉及的试剂用量少且更易操作。

2.2 标准曲线的建立

选取直链淀粉含量分别为 0.4%、10.6%、16.2%、26.5% 的 4 个标准品,同时利用本试验的高通量法与国际法测定其吸光度,国际法参照国际标准 BS EN ISO6647—2:2015《稻米 直链淀粉含量测定 第 2 部分 常规方法》,所测结果绘成标准曲线(图 1)。国际法的线性相关系数 r^2 为 0.999 7,高通量法标准曲线的线性相关系数 r^2 为 0.991 1,说明 2 种方法测得的吸光度均与直链淀粉含量有良好的线性关系。

表 1 高通量法和国际法的样本处理步骤的差异

操作过程	国际法	高通量法
淀粉糊化	80 ~ 100 目	100 目
	不脱脂	不脱脂
	试样用量(100 ± 0.5) mg	试样用量(10 ± 0.2) mg
	95% 乙醇 1 mL	95% 乙醇 0.1 mL
	1 mol/L NaOH 9 mL	1 mol/L NaOH 0.9 mL
	沸水浴 10 min, 或静置过夜	95 ℃ 金属浴 20 min
	定容 100 mL	不定容(离心管)
显色	取 0.5 mL 样品液	取 0.01 mL 样品液
	1 mol/L 乙酸 0.1 mL	1 mol/L 乙酸 0.02 mL
	碘试剂 0.2 mL	碘试剂 0.04 mL
	9.2 mL ddH ₂ O(比色管)	2 mL ddH ₂ O(离心管)
	620 nm/720 nm(混匀后立即测)	620 nm
单人测量用时	16 个样, 6 次重复约 20 h 测完	16 个样, 6 次重复约 2 h 测完

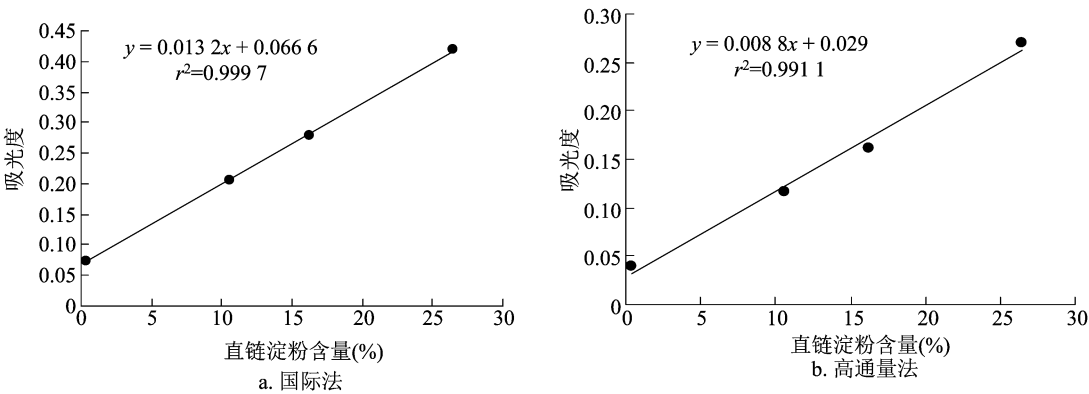


图1 2种方法标准曲线的线性分析

2.3 2种方法的显著性分析

分别按国际法和高通量法测定 12 份大米样品的直链淀粉含量,每份材料设置 6 个平行样,取 6 次测定值的平均数为最终结果(表 2)。用 SAS 统计软件对数据 *t* 检验分析结果,得到 *P* 值 = 0.445 9 > 0.05,说明直链淀粉含量测定的国际法与高通量法之间并无显著性差异。

表 2 2 种方法测得的直链淀粉含量

样品编号	直链淀粉含量(%)	
	国际法	高通量法
1	14.3	16.6
2	11.9	12.6
3	12.0	13.9
4	14.5	15.3
5	3.3	4.6
6	10.9	11.7
7	12.6	13.9
8	25.5	30.3
9	13.4	14.6
10	13.8	15.8
11	12.7	14.3
12	13.6	15.2

2.4 2种方法测定结果的描述性分析

分别按国际法和高通量法对 12 份大米样品进行 6 次重复测定,并对测定结果进行分析。由表 3 可知,高通量法的变异系数范围为 3.77% ~ 10.15%,国际法测定结果的变异系数范围为 1.48% ~ 12.91%,高通量法中的变异系数普遍高于国际法,但其直链淀粉含量的测定结果所呈现的趋势基本相同。*F* 检验结果表明,这 2 种方法所得的各个样品间差异均不显著,证明高通量法测定结果可靠,完全可以满足对大批量样品的初步测定和筛选。

3 讨论与结论

稻米的淀粉包括直链淀粉和支链淀粉 2 个部分,两者之和约占稻米成分的 90%,其中直链淀粉含量变化为 0 ~ 40%,是决定稻米食味品质的重要性状之一^[8]。自首次提出通过碘比色法测量稻米直链淀粉含量以来,稻米直链淀粉含量的测定技术一直在不断发展变化。从单波长比色法,经过改进

表 3 2 种方法测定结果的比较

样品编号	直链淀粉含量(%)							
	国际法				高通量法			
	均值	方差	标准差	变异系数(%)	均值	方差	标准差	变异系数(%)
1	14.32	0.10	0.32	2.23	16.63	1.01	1.00	6.03
2	11.87	0.05	0.23	1.90	12.62	0.38	0.61	4.87
3	12.05	0.07	0.26	2.15	13.88	1.11	1.05	7.59
4	14.48	0.13	0.37	2.52	15.30	0.46	0.68	4.43
5	3.35	0.19	0.43	12.91	4.57	0.21	0.46	10.15
6	10.95	0.05	0.23	2.06	11.68	0.61	0.78	6.68
7	12.58	0.07	0.26	2.04	13.85	0.58	0.76	5.49
8	25.52	0.21	0.45	1.78	30.32	6.31	2.51	8.29
9	13.42	0.06	0.25	1.85	14.62	0.63	0.79	5.43
10	13.75	0.11	0.33	2.38	15.83	1.43	1.20	7.56
11	12.65	0.03	0.19	1.48	14.33	0.77	0.88	6.14
12	13.57	0.05	0.23	1.72	15.17	0.33	0.57	3.77

提出了双波长比色法和多波长比色法,进一步发展出基于碘比色法的一系列新测定技术,如碘亲和力测定法、伴刀豆球蛋白法、自动分析检测仪。甚至利用稻米理化特性,引进新的检测仪器,开发出近红外光谱分析法、高光谱法、RVA 快速黏度分析法等检测手段;以及基于分子基团特性开发出色谱分析法、差示扫描量热法、非对称流场流分离技术等^[8-15]。

基于碘比色法的大米直链淀粉含量测定方法因成本较低且结果可靠,成为目前各实验室最常使用的方法。本研究摒弃了标准法中使用 100 mL 容量瓶定容的操作,采用 2 mL 离心管,不仅大大节省了试剂和水资源,而且便于通过干式恒温器进行加热,能在保证充分糊化的同时也利于操作,并开创性地使用了微孔板分光光度计,配套器材是 96 孔塑料微孔板,利用 96 孔微孔板分光光度计,对稻米直链淀粉含量进行快速高通量的测定。试验结果表明,大米直链淀粉含量高通量测定法与国际法无显著性差异,标准曲线相关系数 $r^2=0.991\ 1$,呈现良好的线性关系,操作简单,是一种快速高效的测定直链淀粉含量的方法,可用于水稻诱变群体后代或品种选育过程中的海量株系大规模初筛,极大地提高了稻米品质研究的效率。

参考文献:

[1]黄伟,周广斌,贾继荣. 大米直链淀粉含量快速测定方法[J].

粮食科技与经济,2016,41(3):41-42,53.
[2]段传玲,兰静,张宏坤. 分光光度法测定大米直链淀粉含量的误差分析[J]. 黑龙江农业科学,2015(4):129-133.
[3]翟佳丽,何睿. 大米中直链淀粉含量测定方法的比较[J]. 粮食加工,2017(3):24-26.
[4]代继松,张华,朱英,等. 高通量快速检测稻米中表观直链淀粉含量的方法[J]. 浙江农业学报,2014,26(6):1421-1424.
[5]梅淑芳,贾莉萌,高君恺,等. 一种稻米直链淀粉含量的简易测定方法[J]. 核农学报,2007,21(3):246-248.
[6]焦桂爱,胡培松,唐绍清,等. 稻米直链淀粉含量的简易测定方法[J]. 中国稻米,2009(3):23-24.
[7]程海涛,刘桂林,马兆惠,等. 不同直链淀粉含量稻米品质特性研究[C]//中国作物学会 2015 年学术年会论文集,2015.
[8]刘姗姗,王建军,范小娟,等. 稻米直链淀粉检测技术的研究现状与展望[J]. 中国粮油学报,2015,30(3):140-146.
[9]杨有仙,赵燕,李建科,等. 直链淀粉含量测定方法研究进展[J]. 食品科学,2010,31(23):417-422.
[10]严松,孟庆虹,卢淑雯,等. 优良粳稻中日食味评价的比较研究[J]. 食品科技,2017(2):170-175.
[11]王晓玲,周治宝,余传元,等. 籼粳稻米食味品质差异的相关研究[J]. 江西农业大学学报,2011,33(4):643-649.
[12]杨胜男,牛德新,张洪映,等. 双波法测定烟草淀粉组分含量的前处理改进[J]. 河南农业大学学报,2017,51(1):8-12.
[13]郭运玲,孔华,左娇,等. 双波长法测定木薯的直链和支链淀粉含量[J]. 热带作物学报,2016,37(6):1213-1217.
[14]冯光,杨亚春,宋丰顺,等. 近红外反射技术建立合肥地区精米直链淀粉含量测定模型[J]. 核农学报,2012,26(6):942-946.
[15]黄立飞,房伯平,陈景益,等. 单波长比色法测定甘薯直链淀粉含量[J]. 中国粮油学报,2010,25(5):100-104.