

双波长分光光度法测定新鲜怀山药中直链与支链淀粉的含量

王丽霞,李彬,杨事维,曹金丽,刘相花,张凯

(食品营养与安全教育部重点实验室,天津科技大学食品工程与生物技术学院,天津 300457)

摘要:以新鲜怀山药为原料制备山药粉,通过石灰水浸泡工艺提取山药淀粉。以碘为显色剂,扫描直链淀粉和支链淀粉与碘形成复合物的全波长吸收光谱。利用不同浓度的直链与支链淀粉标准品分别与碘形成复合物从而得到淀粉含量与吸光度差值之间的线性关系制作出标准曲线,根据标准曲线计算出样品中直链淀粉与支链淀粉的含量。根据双波长选择原理和扫描光图谱,确定直链淀粉的测定波长为 600nm,参比波长为 560nm;支链淀粉的测定波长为 532nm,参比波长 644nm。实验说明直链淀粉与支链淀粉的测定相对标准偏差分别为 0.27% 与 0.63%、回收率也分别达到了 96.18% 与 97.89%,检出限分别为 0.09mg/L 与 1.58mg/L,再经准确性分析验证了用双波长法测定山药淀粉中直链淀粉与支链淀粉的含量的检测方法具有较为准确的效果。

关键词:山药,双波长,直链/支链淀粉

Determination of amylose and amylopectin content in fresh yam by dual-wavelength spectrophotometry

WANG Li-xia, LI Bin, YANG Shi-wei, CAO Jin-li, LIU Xiang-hua, ZHANG Kai

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education;
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Yam starch was extracted through soak process by whitewash with yam powder which was from fresh yam as raw material. A standard curve was got based on the line relationship between absorption difference and content of starch, which the concentration cycle of standard amylose and amylopectin were used. This research had finally got 600nm for measure wavelength while 560nm for reference wavelength of amylose, 532nm for measure wavelength while 644nm for reference wavelength of amylopectin according to the amylose and amylopectin complex full wavelength absorption spectra with iodine as chromogenic agent. The research about content of amylose and amylopectin in the sample with the standard curve had been worked out. According to the experiment, the RSD were 0.27% and 0.63% respectively, recovery data were 96.18% and 97.89%, while detection limit were 0.09mg/L and 1.58mg/L based on the amylose and amylopectin test. Appending accuracy analysis, all confirmed that the dual-wavelength determining the content of amylose and amylopectin had more accurate effect.

Key words: yam; dual-wavelength; amylose/amylopectin

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)05-0292-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.05.053

山药为薯蓣科植物薯蓣 (*Dioscorea opposita* Thunb.) 的块茎,具有补脾养胃、补肺益肾的功效,对于预防治疗脾虚久泄、慢性肠胃、肺虚咳喘、糖尿病等疾病有重要作用^[1]。山药块茎中含多糖、淀粉、蛋白质、游离氨基酸等^[2]。山药中含大量淀粉,是重要的淀粉来源,然而当前对于植物淀粉的研究大都数都集中于马铃薯和玉米淀粉上,对于山药淀粉却研究较少。这些都影响了山药淀粉的应用及其深加工

的发展^[3-5]。

淀粉是植物世界中储备碳水化合物的物质,人类可以利用其中 70%~80% 的热量,淀粉通常以 1~100 μ m 或者更大直径的颗粒状形式存在。淀粉是由脱水葡萄糖通过 α -D-(1-4) 糖苷键连接而形成的高分子碳水化合物。虽然淀粉的精细结构还没有得到阐述,但是已经确定了淀粉是由支链淀粉与直链淀粉两种异构物质按照不同比例构成的。直链淀

收稿日期: 2014-03-24

作者简介: 王丽霞 (1966-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向: 农产品加工与功能食品。

基金项目: 河北省省级省校科技合作开发项目。

粉基本上是由脱水葡萄糖通过 α -D-(1-4) 糖苷键组成的线性聚合物而支链淀粉却是由 α -D-(1-4) 糖苷键连接的分支状聚合物,在 O-6 的位置上有周期性的分支^[6]。

山药淀粉中直链淀粉和支链淀粉含量因山药品种不同以及种植地区的不同而有所差异,决定着山药淀粉的品质,并影响着山药淀粉的加工特性与应用。所以测量山药淀粉中直链淀粉与支链淀粉的含量有着重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜怀山药 产自河南温县。

直链、支链淀粉标准品 购于 Sigma 公司;石油醚、无水乙醇、氢氧化钙、氢氧化钾、盐酸、碘、碘化钾、正丁醇等均为分析纯。

DF-101S 恒温水浴锅 山东甄诚嘉德仪器厂; ESJ205-4 电子分析天平 沈阳龙腾电子称量仪器有限公司; UV-2550PC 紫外-可见分光光度计 日本岛津(中国)仪器公司; DFG801 电热鼓风箱 湖北省黄石市医疗器械厂; G10S 紫外可见分光光度计 美国赛默飞公司。

1.2 实验方法

1.2.1 山药淀粉的提取 山药粉的制备工艺: 山药→清洗→去皮→切片→烘干→粉碎→过筛→山药粉。将得到的山药粉用 pH8 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 按照固液比 1:7 浸泡,浸泡时间 2h 并重复 4 次;将沉淀用 90% 乙醇浸泡 2h 后烘干;利用索氏抽提对所得到的山药淀粉进行脱脂处理^[7]。

1.2.2 直链淀粉与支链淀粉的分离纯化 采用正丁醇反复结晶法,称取 10g 淀粉,加入到 500mL 的烧杯中,加入少量无水乙醇和蒸馏水使样品湿润,再加入 0.5mol/L 的 NaOH 350mL,沸水浴中加热搅拌 20~30min 至完全分散,冷却后离心(4000r/min, 20min)去沉淀,再以 2mol/L 的 HCl 调节 pH 至中性,加入 100mL 正丁醇-异戊醇(3:1 体积比)混合液,然后在沸水浴中加热搅拌至溶液透明后冷却至室温,于 4℃ 冰箱中静置 24h 后离心(4000r/min, 20min),离心后得到的上清液即为粗支链淀粉溶液(A_p),得到的沉淀为粗直链淀粉(A_m)。

支链淀粉的纯化:上清液中加入 20mL 正丁醇于沸水浴中加热搅拌至溶液分散透明后冷却至室温。在 4℃ 冰箱中静置 24h 后离心(4000r/min, 20min)弃去沉淀并重复以上操作 5 次。将收集到的上清液按照 2 倍体积加入无水乙醇进行沉淀,再以无水乙醇洗涤沉淀 5、6 次,所得到的沉淀在 45℃ 的烘箱中干燥即为支链淀粉(A_p)样品。

直链淀粉的纯化:向粗直链淀粉中加入 240mL 的正丁醇-水(体积比为 1:8)溶液,在沸水浴中加热搅拌使其溶解至透明,冷却后于 4℃ 冰箱中静置 24h,取出后离心(4000r/min, 20min)得到的沉淀,重复以上操作 5 次后将收集到的沉淀用无水乙醇洗涤 5~6 次,将样品于 45℃ 烘箱中干燥即得到直链淀粉(A_m)样品。

1.2.3 淀粉标准液的配制 分别称取 0.1000g 支链淀粉和直链淀粉置于 100mL 的烧杯中,加入 1mol/L 的 KOH 溶液 10mL,于 80℃ 水浴中充分搅拌 15min,再用蒸馏水定容至 50mL 为支链淀粉和直链淀粉标准液。采用 1mol/L 的 KOH 溶液在 80℃ 水浴下分散溶解 15min 效果最好^[8]。

1.2.4 直链淀粉标准曲线的绘制 分别取直链淀粉标准液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mL 于 100mL 烧杯中,加蒸馏水 25mL,以 0.1mol/L 的 HCl 溶液调 pH 至 3.0,加 0.5mL 碘试剂后定容至 50mL,静置 30min。

1.2.5 支链淀粉标准曲线的绘制 分别取支链淀粉标准液 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 于 100mL 烧杯中,加蒸馏水 25mL,以 0.1mol/L 的 HCl 溶液调 pH3.0,加 0.5mL 碘试剂后定容至 50mL,静置 30min。

1.2.6 直链淀粉、支链淀粉含量的测定 称取 0.1000g 的脱脂淀粉,加 1mol/L 的 KOH 溶液 10mL 于 100mL 烧杯中,将烧杯置于 80℃ 水浴中充分搅拌 10min,然后用蒸馏水定容到 50mL 的容量瓶中,摇匀后静置。取 3mL 上清液于 100mL 烧杯中,以加蒸馏水 25mL,以 0.1mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 至 3.0,加 0.5mL 的碘试剂后转移溶液到 50mL 的容量瓶中,用蒸馏水加至刻度摇匀后静置。

1.3 山药淀粉中直链淀粉与支链淀粉含量的双波长标准曲线

以蒸馏水为空白,将 1.2.4 中的直链淀粉标准溶液,用紫外-可见分光光度计分别在波长 λ_1 和参比波长 λ_3 下相应的吸光值 A_1 和 A_3 。以 $\Delta A_{直} = \lambda_1 - \lambda_3$ 为纵坐标,直链淀粉质量浓度 ρ_1 (mg/L) 为横坐标作图,利用 excel 绘制双波长直链淀粉标准曲线。采用同样方法,将 1.2.5 中的支链淀粉标准溶液,用紫外-可见分光光度计分别在波长 λ_2 和参比波长 λ_4 下测定吸光度 A_2 和 A_4 ,以 $\Delta A_{支} = A_2 - A_4$ 为纵坐标,支链淀粉质量浓度 ρ_2 (mg/L) 为横坐标作图,绘制双波长支链淀粉标准曲线。

1.4 重复性实验

对同一样品进行重复测定,验证该实验方法的稳定性以及可行性。

1.5 准确性与准确度评价方法

在已测得直链淀粉和支链淀粉含量的样品中,添加准确称量的自制直链和支链淀粉纯品,按照上述方法测定直链和支链淀粉的含量,通过以下公式计算回收率和平均回收率。

回收率(%) = 混合后测得量 - 样品中直链淀粉或支链淀粉含量 / 淀粉纯品的加入量 $\times 100$

准确度主要是通过回收率来反映,分别称取标准品直链淀粉与支链淀粉 5 份,记录数据后按照上述方法分别测定其含量,将实测值与理论值比较,计算回收率。并计算出平均回收率以及相对标准偏差(RSD)。

1.6 检出限实验

检出限的定义可以被认定为:某样品中目标分析物能被检测出的最小量。本文主要采用贝塞尔公式法对该方法进行检出限分析^[9-10]。在同样的条件下对同一样品重复测定 $n = 12$ 次,求得 12 次的测量

结果的平均值 $\bar{x}$ 。于是用贝塞尔公式可以求出单次测量结果的实验方差 $s^2(x_i)$ 和实验标准差 $s(x_i)$ 。计算公式如下所示:

$$s^2(x_i) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad \text{式(1)}$$

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{式(2)}$$

根据下式求得检出限:

$$D_L = k \cdot s_1 \quad \text{式(3)}$$

式中: D_L —检出限, mg/L 或 %; s_1 —浓度或含量测定结果的标准差, mg/L 或 %; k —2 或 3。

2 结果与分析

根据双波长比色原理^[11], 若试样溶液在两个波长处均有吸收, 则两个波长处的吸光值差值与溶液中待测物质的浓度存在线性关系, 从样品溶液中的直链、支链淀粉分别与碘生成络合物的吸收光谱中, 可以确定测定波长和参比波长。

2.1 直链、支链淀粉测定波长的确定

直链淀粉与碘作用产生纯蓝色, 支链淀粉与碘作用生成紫红色。用这两种淀粉的标准溶液分别碘反应, 用紫外可见分光光度计对其分别进行全波长扫描, 扫描结果见图 1。选择波长需要具备两个基本条件, 一是同存组分在这两个波长应具有相同的吸收值, 使其浓度变化不影响到测定值, 二是待测组分在这两个波长的差值应足够大^[12]。因此, 根据上述原理和扫描的图谱, 确定直链淀粉的测定波长 $\lambda_1 = 600\text{nm}$, 参比波长 $\lambda_2 = 560\text{nm}$ 。支链淀粉的测定波长 $\lambda_3 = 532\text{nm}$, 参比波长 $\lambda_4 = 644\text{nm}$ 。

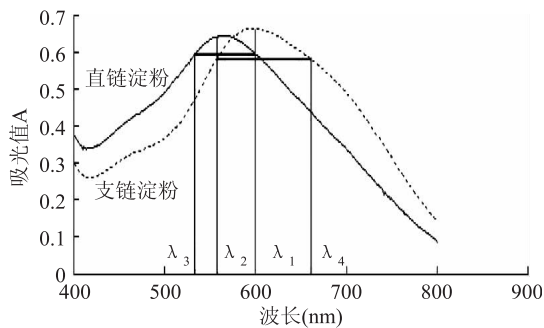


图1 淀粉全波长图

Fig.1 Full wavelength figure of starch

2.2 双波长标准曲线绘制结果

2.2.1 直链淀粉标准曲线 使用紫外可见分光光度计在测定波长 600nm、参比波长 560nm 下分别测定吸光值, 以直链淀粉浓度为横坐标, 以吸光值的差值为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线的方程: $y = 0.0069x + 0.0042$, $R^2 = 0.9990$ 。

2.2.2 支链淀粉标准曲线 使用紫外可见分光光度计在测定波长 532nm、参比波长 644nm 下分别测定吸光值, 以支链淀粉浓度为横坐标, 以吸光值的差值为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线的方程: $y = 0.0010x + 0.0068$, $R^2 = 0.9989$ 。

2.3 重复性实验

对同一样品进行重复四次测定, 结果如表 1

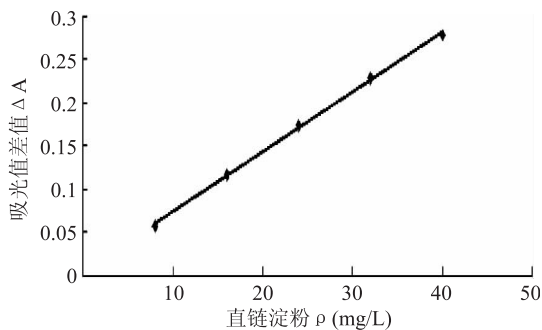


图2 直链淀粉标准曲线

Fig.2 Standard curve of amylose

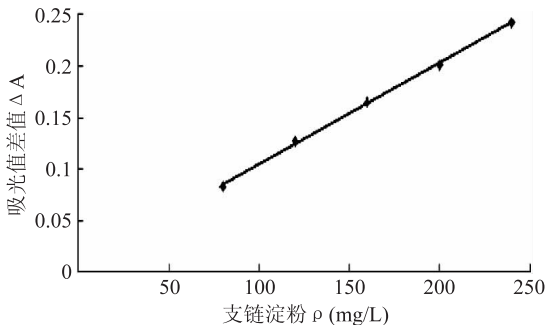


图3 支链淀粉标准曲线

Fig.3 Standard curve of amylopectin

所示。

表1 重复性实验结果

Table 1 Repetitive experimental result

项目	测定结果 (mg/L)				平均值 (mg/L)	相对标准 偏差(%)
直链淀粉	22.41	22.53	22.38	22.51	22.45	0.27
支链淀粉	72.21	69.86	71.27	71.59	71.23	0.63

由表 1 可以看出, 通过四次实验测得怀山药中直链、支链淀粉含量, 相加后求百分比可以得出怀山药中直链淀粉约占 23.96%, 支链淀粉约占 76.04%, 且相对标准偏差不超过 1%, 实验方法重复性良好。

2.4 双波长测定方法的准确性与准确度实验结果分析

取已测知直链淀粉和支链淀粉含量的山药淀粉, 分别在其中添加一定量的直链淀粉或支链淀粉的纯品, 按照 1.2.6 所述的实验方法, 计算回收率, 结果见表 2。

表2 样品回收率测定结果

Table 2 Recovery rate determination result of sample

样品	实验号	加入量 (g)	测得量 (g)	回收率 (%)	平均 回收率 (%)
直链淀粉	1	0.0218	0.0203	93.12	96.18
	2	0.0187	0.0195	100.04	
	3	0.0217	0.0207	95.39	
	4	0.0936	0.0923	98.61	
支链淀粉	5	0.1039	0.1027	98.85	97.89
	6	0.0980	0.0943	96.22	

表3 准确度分析
Table 3 Accuracy analysis

样品	实验号	理论值(g)	测得值(g)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
直链淀粉	1	0.0184	0.0182	98.91	99.91	0.71
	2	0.0398	0.0401	100.75		
	3	0.0572	0.0569	99.48		
	4	0.0746	0.0751	100.67		
	5	0.0831	0.0829	99.76		
	6	0.0582	0.0588	101.03		
支链淀粉	7	0.0674	0.0668	102.08	100.35	1.04
	8	0.0773	0.0771	99.74		
	9	0.0891	0.0885	99.33		
	10	0.0905	0.0901	99.56		

由表2可知:无论是直链淀粉还是支链淀粉,其平均回收率均在96%~98%之间,同时在表3中可以看出,平均回收率在98%到102%之间,且回收率的相对标准偏差也小于2%,在可接受范围内。说明该分析方法具有较高的准确度,适用于测定山药中的直链淀粉和支链淀粉含量。

2.5 检验限实验分析

分别直链淀粉和支链淀粉的样品重复测定12次,结果如下:

表4 检验限测定结果
Table 4 Result of detection limit

实验号	直链淀粉(mg/L)	支链淀粉(mg/L)
1	22.41	72.21
2	22.53	69.86
3	22.38	71.27
4	22.51	71.59
5	22.48	72.19
6	22.43	69.93
7	22.51	70.83
8	22.49	70.27
9	22.44	71.45
10	22.43	71.87
11	22.50	70.56
12	22.49	70.68
平均值	22.467	71.059
标准差	0.0450	0.7917

根据1.6中的式(3)分别计算出直链淀粉的DL=0.09mg/L,支链淀粉的DL=1.58mg/L。证明该方法实用性很强,可检测范围较大。

3 结论

双波长分光光度法作为淀粉含量的快速测定方法,具有准确性高、重复性和稳定性好的特点,可以应用于不同品种的山药以及其他类型的淀粉的测定,根据吸收光谱特性分析结果,新鲜山药直链淀粉的测定波长为600nm,参比波长为560nm。支链淀粉

的测定波长为532nm,参比波长为644nm。实验表明,显色反映在pH3~5范围内影响不大。

参考文献

[1]赵彦青,王爱凤.山药的药理研究进展[J].中医研究,2000,13(5):49-50.

[2]袁丽菊.不同生长期山药中多糖含量的研究[J].应用化工,2011,40(9):1575-1584.

[3]Wang Shujun, Gao Wenyuan, Chen Haixia, et al.Characterization of new starches separated from different Chinese yam (Dioscoreaopposita Thumb) cultivars [J]. Food Chemistry,2006(99):30-37.

[4]MaliS, Beleia A P, Grosamann MVE, et al.Influence of pH and hydrocolloids addition on yam (Dioscoreaalata) starch pastes stability [J]. Lebensmittel - Wissenschaft and Technology, 2003 (36):475-481.

[5]Chien - Chun Huang, Mei - Chen Lin, Chiun - C.R.Wang.Changes in morphological, thermal and pasting propertiesof yam (Dioscoreaalata) starch during growth [J]. Carbohydrate Polymers,2006(64):524-531.

[6]R A Freitas, R C Paula, J P A Feitosa, et al.Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (Dioscoreaalata) and cassava (Manihotutilissima) starches [J]. Carbohydrate Polymers,2004(55):3-8.

[7]李昌文,刘延奇,李延涛.怀山药淀粉性质研究[J].中国粮油学报,2010,25(8):23-26.

[8]金玉红,张开利,张兴春.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.

[9]李海峰.检出限几种常见计算方法的分析和比较[J].光谱实验室,2010,27(6):2465-2469.

[10]Boqué,Ricard; Heyden, Yvan Vander.The limit of detection [J].LC-GC Europe,2009,22(2):82-85.

[11]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与支链淀粉含量[J].江西农业学报,2010,22(12):117-119.

[12]王文超,贺帆,宋朝鹏,等.双波长分光光度法测定烟草中的直链淀粉和支链淀粉[J].烟草化学,2013,6(311):50-52.