

连续流动分析仪测定稻米直链淀粉含量的方法研究

刘卫国¹, 余泓洁¹, 姚江华², 李正强², 杨文钰^{1*}

(1. 四川农业大学农学院, 四川雅安 625014; 2. 深圳市一正科技有限公司暨法国爱利安斯中国技术服务中心, 广东深圳 518034)

摘要 [目的] 为稻米品质鉴定及遗传分析提供一种精确的、智能化、自动化的微量分析方法。[方法] 应用紫外可见分光光度计和全自动连续流动分析仪, 分别采用国标法和流动分析法测定了稻米中直链淀粉的含量。[结果] 在样品稳定性试验中, 5个稻米样品分散液的平均标准差为0.000 5, 平均变异系数为0.34%。当分析速度为25~50样/h时, 重复间变异系数比较稳定; 当分析速度为25~45样/h时, 峰形和分离效果均较好。在精确度试验中, 样品液吸光度的平均标准差为0.000 4, 平均变异系数为0.20%。比较两种方法的测定结果的重现性, 用5个品种, 每个品种10次重复测定, 其平均标准差为0.1077, 平均变异系数为0.61%。流动分析法的平均标准偏差和平均变异系数分别为0.082 1和0.49%, 国标法的分别为0.111 9和0.64%。[结论] 该方法对于测定稻米直链淀粉含量是较为理想的。

关键词 连续流动分析仪; 直链淀粉含量; 稻米

中图分类号 S511 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)32-15669-03

Research on the Method of Determining the Amylose Content in Rice with Continuous Flowing Analyzer

LIU Wei-guo et al (College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014)

Abstract [Objective] The research aimed to supply an accurate, intelligent and automatic micro-analytical method for the quality identification and genetic analysis on rice. [Method] The amylose content in rice was determined by national standard method and flow-analysis with UV-visible spectrophotometer and full-automatic continuous flowing analyzer resp. [Result] In the stability test on samples, the average standard deviation of dispersed liquids of the 5 rice samples was 0.000 5 and their average variation coefficient was 0.34%. When the analytical velocity was 25-50 samples/h, the variation coefficient among repeats was relatively stable. When the analytical velocity was 25-45 samples/h, both peak shape and separation effect were better. In precision test, the average standard deviation of the absorbance of sample solutions was 0.000 4 and their average variation coefficient was 0.20%. The average standard deviation of determination results of the 2 methods was 0.107 7 and their average variation coefficient was 0.61%. The average standard deviation and average variation coefficient of flow-analysis were 0.082 1 and 0.49% resp. and that of national standard method were 0.111 9 and 0.64% resp. [Conclusion] This method was relatively perfect for determining the amylose content in rice.

Key words Continuous flowing analyzer; Amylose content; Rice

直链淀粉含量是决定稻米蒸煮食味品质优劣的重要指标^[1-2]。稻米直链淀粉含量的测定方法主要有碘比色法、电流滴定法、电压滴定法和凝胶过滤法等^[3-5]。目前国内外的稻米品质分析实验室多数采用经国际水稻所改进的简易淀粉-碘蓝比色法(常量法)进行测定^[5], 该方法因样品量需100 mg以上, 不适用进行小样或单粒的分析。连续流动分析技术(Continual Flow Analyzer, 简称CFA)具有快速、精度高、灵活性强的优点, 在土壤、植物、烟草、水质、化肥、食品、饲料和酒类等检测领域已广泛应用^[6], 但用于稻米直链淀粉分析鲜见报道。该研究以碘比色法为基础, 国标法^[7]为参照, 对连续流动分析法测定稻米直链淀粉含量的最佳分析速度、稳定性、准确度、精密度和重复性等方面进行了研究, 拟为稻米品质鉴定及遗传分析研究提供精确、智能化、自动化的直链淀粉微量分析方法。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 FUTURA II全自动连续流动分析仪(法国Alliance公司); TU-1901紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司)。

氢氧化钠、乙醇、碘、碘化钾、乙酸等试剂均为分析纯。

1.2 试验材料 标准样品: 4个稻米标样的直链淀粉含量分别为: 1.5%、9.2%、17.1%、26.0%, 均由中国水稻所分析测试中心提供。

供试样品为5个包含低、中、高不同直链淀粉含量的水稻品种: 泰隆II号、绵香576、菲优188、冈优305、K优AG。

1.3 试验方法

1.3.1 样品预处理。 ①国标法: 供试样品经出糙、精白和磨粉后过60目筛后得到精米粉, 与标准样品同室放置48 h以平衡水分。称取100 mg样品或标准样品, 装入15 ml具盖刻度试管中, 用移液管加入1 ml无水乙醇湿润样品, 再用移液管加入9 ml 1 mol/L氢氧化钠溶液, 摇匀。在沸水浴中分散10 min, 迅速冷却, 用蒸馏水定容至100 ml, 摇匀, 4 000 r/min离心10 min, 上清液即为分散液。空白为不加稻米粉的分散液。②流动分析法: 称取经水分平衡后的样品或标准样品10 mg, 装入15 ml具盖刻度试管中, 用移液管加入0.1 ml无水乙醇湿润样品, 再用移液管加入0.9 ml 1 mol/L氢氧化钠溶液, 摇匀。在沸水浴中分散10 min, 迅速冷却, 准确加入9 ml蒸馏水, 摇匀, 4 000 r/min离心10 min, 上清液即为分散液。空白为不加稻米粉的分散液。

1.3.2 含量测定。 ①国标法: 参照国家标准GB-T 15683-1995稻米直链淀粉含量的测定方法进行^[7], 从定容的100 ml分散液中准确吸取5 ml样品液于100 ml容量瓶中, 加入约50 ml蒸馏水后, 再加入1 ml 1 mol/L乙酸溶液及2 ml碘试剂, 定容后摇匀。显色20 min后, 利用紫外分光光度计在620 nm处读取吸光度。标准水稻样品同法操作建立标准曲线, 根据待测样本吸光值计算其直链淀粉含量。②流动分析法: 经反调试, 最终优化形成如图1所示的方法模块流程图。主要配件为880流通池, 620 nm滤光片、各种不同内径的泵管, 开机并设置好各项参数后, 机器调试运行约20 min后, 基

基金项目 四川主要粮食作物丰产科技工程项目(2006BAD02A05)。
作者简介 刘卫国(1979-), 男, 四川中江人, 在读博士, 讲师, 从事作物生理和品质研究。*通讯作者。

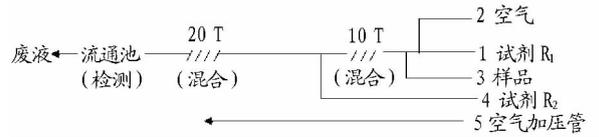
收稿日期 2009-07-10

线平稳,可开始测定。以标准样品的分散液中直链粉含量 (mg/ml)为横坐标,吸收峰高为纵座标,得标准曲线,计算待测样本的直链淀粉含量。

2 结果与分析

2.1 样品稳定性试验结果 得到分散液后,用连续流动分析仪在 0,2,4,12,24,48 h 以 30 样/h 速度测样品的吸光度。结果表明(表 1),5 个稻米样品的分散液的标准差为 0.000 4 ~ 0.000 8,平均值为 0.000 5;变异系数为 0.24% ~ 0.71%,平均值为 0.34,说明分散液在室温条件下 48 h 内具有较好的稳定性。

2.2 最佳分析速度试验 以 K 优 AG 材料为样品,试验设计 25,30,35,40,45,50,55 和 60 样/h,优化分析速度,重复 5 次。在分析速度为 25 ~ 50 样/h 时,重复间变异系数比较稳



注:1. 泵管 1 (绿/绿) R₁: 乙酸;泵管 2 (橙/蓝) 空气;泵管 3 (橙/黄) 样品;泵管 4 (红/红) R₂: I₂/KI 溶液;泵管 5 橙/白空气加压管;2. “T”为混合圈。

Note:1. Pump pipe 1 (green/green); R₁. Acetic acid; pump pipe 2 (orange/blue) air; pump pipe 3 (orange/yellow) sample; pump pipe 4 (red/red); R₂. I₂/KI solution; pump pipe 5 orange/white air pressurized pipe.

图 1 FUTURA 全自动连续流动分析仪流路

Fig.1 FUTURA automatic continuous flow analysis

表 1 样品稳定性测定的吸光度值

Table 1 Absorbancy values tested by sample stability

| 品种名称 Sample name | 0 h | 2 h | 4 h | 12 h | 24 h | 48 h | 平均值 Mean | 标准差 Standard error | CV % |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------|-----------------------|---------|
| 泰隆 1 号 Tailong No. 1 | 0.111 4 | 0.113 5 | 0.111 0 | 0.112 9 | 0.111 9 | 0.112 4 | 0.112 2 | 0.000 8 | 0.71 |
| 冈优 305 Gangyou 305 | 0.155 8 | 0.156 5 | 0.156 3 | 0.155 2 | 0.156 2 | 0.155 5 | 0.155 9 | 0.000 4 | 0.27 |
| 绵香 576 Mianxiang 576 | 0.109 3 | 0.108 4 | 0.108 8 | 0.109 8 | 0.109 1 | 0.109 6 | 0.109 2 | 0.000 4 | 0.40 |
| K 优 AG K you AG | 0.155 1 | 0.154 0 | 0.154 8 | 0.154 8 | 0.155 2 | 0.155 0 | 0.154 8 | 0.000 4 | 0.24 |
| 菲优 188 Feiyou 188 | 0.165 3 | 0.165 0 | 0.163 9 | 0.164 6 | 0.164 7 | 0.164 4 | 0.164 7 | 0.000 4 | 0.25 |

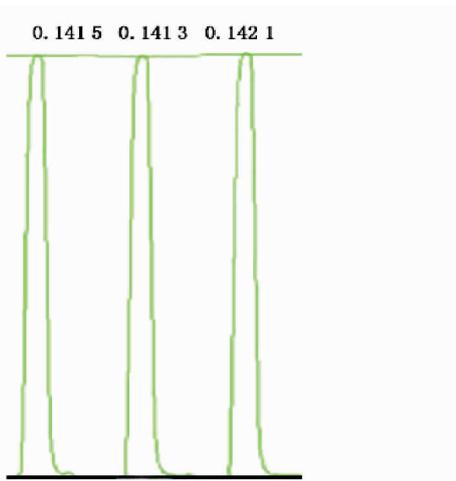


图 2 进样速度 45 样/h 分析

Fig.2 Analysis on the speed of 45 samples per hour

定(图 2,3),当分析速度为 55 ~ 60 样/h 时,变异系数有增大趋势。同时,从峰形来看,在分析速度为 25 ~ 45 样/h 时,峰形较好,且两峰达到基线分离,说明冲洗时间充足,管道内无残留;当分析速度增加到 50 样/h 以后,峰与峰之间的分离效果差,不能达到基线分离,而且基线发生轻微漂移(图 4),说明由于进样速度过快,导致清洗时间减少,管道内仍有残留物,所得结果准确性较差,若不进行基线调整,则测得值偏高。

2.3 精确度试验 准确称取 5 份已磨制成精米粉的菲优 188,经样品分散处理后,检测其吸光度,重复 3 次。结果如表 3 所示,测得的吸光度标准差为 0.000 3 ~ 0.000 4,平均值为 0.000 4;变异系数为 0.17% ~ 0.24%,平均值为 0.20%,表明连续流动分析仪的精密程度能够达到测定稻米直链淀粉含量的水平。

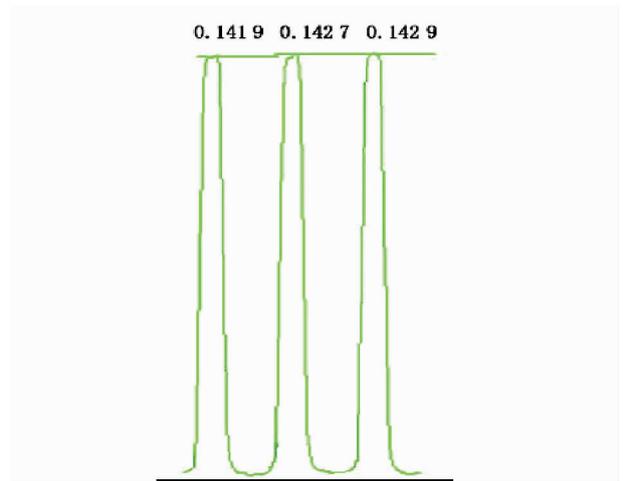


图 3 进样速度 50 样/h 分析

Fig.3 Analysis on the speed of 50 samples per hour

表 2 不同进样速度测定的吸光度值

Table 2 Absorbance with different sample speed

| 进样速度//样/h Sample speed | 吸光度平均值 Mean | 标准差 Standard error | CV % |
|---------------------------|----------------|-----------------------|---------|
| 25 | 0.144 8 | 0.000 3 | 0.20 |
| 30 | 0.144 8 | 0.000 3 | 0.20 |
| 35 | 0.144 9 | 0.000 3 | 0.22 |
| 40 | 0.145 0 | 0.000 3 | 0.21 |
| 45 | 0.145 0 | 0.000 3 | 0.20 |
| 50 | 0.145 3 | 0.000 3 | 0.22 |
| 55 | 0.145 6 | 0.000 4 | 0.24 |
| 60 | 0.146 0 | 0.000 4 | 0.30 |

注:表中吸光度平均值为 5 次重复测定值的平均数。

Note: Absorbance mean in the table are the average of 5 times repeat measurement value.

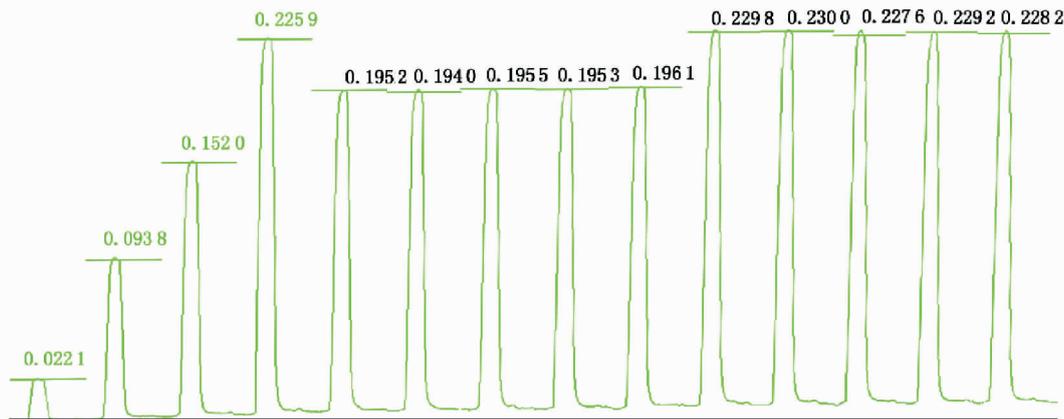


图 4 基线漂移示意图

Fig. 4 Baseline drift schematic diagram

2.4 流动分析法与国标法的比较

2.4.1 重复性比较。利用水稻标准样品建立的直链淀粉含量标准曲线。分别用常规法和连续流动分析法测定 5 个样品直链淀粉含量,每个样品重复 5 次。比较分析结果见表 4。表 4 表明,两种方法测定结果的平均标准偏差为 0.107 7,变异系数为 0.61%,测得的直链淀粉含量无显著性差异,均能得到准确的结果。

2.4.2 测试结果分析。采用两种不同分析方法分别对 5 个供试样品进行 5 次重复测试(见表 5),结果表明,连续流动分析法和国标法测定的稻米直链淀粉含量标准偏差分别为 0.041 9~0.105 0(平均值为 0.082 1)和 0.097 4~0.129 6(平均值为 0.111 9),变异系数平均值分别为 0.49 和 0.64。说明两种方法 5 次重复测试结果都具有较好的重现性,但连

续流动分析法与国标法相比具有更好的重复性。

表 3 精确度试验测定的吸光度值

Table 3 Absorbancy values tested by accuracy experiment

| 样本编号 Sample No. | 吸光度平均值 Mean | 标准差 Standard error | CV % |
|--------------------|----------------|-----------------------|---------|
| 1 | 0.173 3 | 0.000 4 | 0.21 |
| 2 | 0.173 5 | 0.000 4 | 0.21 |
| 3 | 0.173 3 | 0.000 3 | 0.17 |
| 4 | 0.173 5 | 0.000 3 | 0.20 |
| 5 | 0.173 4 | 0.000 4 | 0.24 |

注:表中吸光度平均值为 3 次重复测定值的平均值。

Note: Absorbance mean in the table are the average of 3 times repeat measurement value.

表 4 2 种方法测定稻米直链淀粉含量的重复性结果比较

Table 4 Repeat results comparison of amylase content in rice measured by two methods

| 品种名称 Variety name | 直链淀粉含量 Amylase content//% | | 两种方法测得 值总平均值//% | 标准差 Standard error | CV % | 平均 CV % |
|----------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------|---------|------------|
| | 流动分析法 Flow analysis method | 国标法 National standard method | | | | |
| 绵香 576 Mianxiang 576 | 13.64 ~ 13.88 | 13.57 ~ 13.88 | 13.73 | 0.116 4 | 0.85 | 0.61 |
| 泰隆 1 号 Tailong No. 1 | 14.05 ~ 14.28 | 14.10 ~ 14.32 | 14.21 | 0.100 9 | 0.71 | |
| K 优 AG K you AG | 20.41 ~ 20.58 | 20.35 ~ 20.60 | 20.48 | 0.094 3 | 0.46 | |
| 冈优 305 Gangyou 305 | 20.69 ~ 20.79 | 20.52 ~ 20.76 | 20.69 | 0.098 8 | 0.48 | |
| 菲优 188 Feiyou 188 | 21.93 ~ 22.15 | 22.06 ~ 22.36 | 22.12 | 0.128 0 | 0.58 | |

注: n = 10。

Note: n = 10.

表 5 2 种方法测定稻米直链淀粉含量的比较

Table 5 Analysis on the results of amylase content in rice measured by two methods

| 品种名称 Variety name | 流动分析法 Flow analysis method | | | | 国标法 National standard method | | | |
|----------------------|----------------------------|---------------|-----------------------|---------|------------------------------|---------------|-----------------------|---------|
| | 幅度//% Range | 平均//% Mean | 标准差 Standard error | CV % | 幅度//% Range | 平均//% Mean | 标准差 Standard error | CV % |
| 绵香 576 Mianxiang 576 | 13.68 ~ 13.88 | 13.73 | 0.105 0 | 0.76 | 13.62 ~ 13.88 | 13.72 | 0.126 6 | 0.92 |
| 泰隆 1 号 Tailong No. 1 | 14.05 ~ 14.28 | 14.18 | 0.095 3 | 0.67 | 14.10 ~ 14.32 | 14.24 | 0.097 4 | 0.68 |
| K 优 AG K you AG | 20.41 ~ 20.58 | 20.51 | 0.072 6 | 0.35 | 20.35 ~ 20.60 | 20.46 | 0.105 3 | 0.51 |
| 冈优 305 Gangyou 305 | 20.69 ~ 20.79 | 20.75 | 0.041 9 | 0.20 | 20.52 ~ 20.76 | 20.62 | 0.100 8 | 0.49 |
| 菲优 188 Feiyou 188 | 22.11 ~ 21.93 | 22.06 | 0.095 7 | 0.43 | 22.06 ~ 22.29 | 22.18 | 0.129 6 | 0.58 |

注: n = 5。

Note: n = 5.

3 结论

用流动分析仪测定稻米直链淀粉含量可完全满足国标要求^[7],测得的直链淀粉含量与国标法比较平均标准偏差为

0.107 7,变异系数为 0.61%,无显著性差异。

FUTURA 全自动连续流动分析仪配有自动进样器,可一
(下转第 15712 页)

0.1% HgCl₂ 的常规消毒法)污染率和死亡率高达 96%。

表 1 不同预处理组合对茎段污染率的影响

Table 1 Effects of different pretreatment combinations on the pollution rate of stem segment

| 处理组合 Treatment combination | 多菌灵 mg/L Carbendazim | 青霉素 mg/L Penicillin | 庆大霉素 mg/L Gentamicin | 污染率//% Pollution rate |
|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1 | 0 | 400.0 | 400.0 | 69 |
| 2 | 0 | 500.0 | 300.0 | 71 |
| 3 | 1.0 | 500.0 | 0 | 37 |
| 4 | 1.0 | 0 | 400.0 | 40 |
| 5 | 2.0 | 0 | 300.0 | 32 |
| 6 | 2.0 | 400.0 | 0 | 29 |

2.2 不同激素浓度对比对萌芽和生长增殖的影响 试验结果表明,培养基②(MS + 6-BA 2.0 mg/L)的启动培养效果较好,接种后 15 ~ 25 d 腋芽即开始萌发,且腋芽生长发育正常(图 1)。培养基⑥(MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L)的增殖和生长培养效果较好(图 2)。



图 1 橡胶树茎段腋芽诱导

Fig. 1 Rubber shoot initiation of Rubber

3 结论与讨论

巴西橡胶树是多年生木本植物,经过传统的消毒方法后,茎段接种时真菌和细菌污染还是十分严重,有时甚至高达 100%。在常规消毒前用多菌灵和抗生素进行预处理,可以明显降低茎段污染率和死亡率。

启动培养基以 MS + 6-BA 2.0 mg/L 为好,腋导萌动率可达 85%;以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 为生长增殖培养基较好。低浓度的 6-BA 有利于腋芽萌发,高浓度的 6-BA



图 2 橡胶树再生植株

Fig. 2 Rubber plantlet of Rubber

有利于生长,添加 2,4-D 不利于腋芽萌发及生长。试验中还发现适量椰乳有利于腋芽萌发和生长,顶部茎段易产生愈伤组织,但少量的愈伤组织对腋芽的生长无影响。

在组培成苗过程中如果经过愈伤组织阶段,会导致遗传不稳定,这种现象称作体细胞无性系变异。体细胞无性系变异在后代中出现的频率可达 15% 或更高,高频率的变异会严重影响到造林后的遗传增益,在生产中的应用具有局限性^[2]。该试验是通过腋芽萌动出苗途径,不经过发生愈伤组织而再生,这种途径遗传稳定性好,能够保持品种的优良性状,在生产中具有很大的应用价值。通过切取无菌苗顶芽或带腋芽的茎段不断增殖,可以为橡胶树嫁接苗提供大量的优良无性系接穗材料,为组培工厂化橡胶育苗体系建立奠定基础。

参考文献

- [1] 谭德冠,孙雪飘,张家明. 巴西橡胶树的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2005,41(5):674-678.
- [2] 许智宏. 植物组织培养[M]. 上海:上海科技出版社,1994:244-260,273-283.
- [3] 王泽云,吴胡蝶,陈雄庭. 橡胶花药体细胞植株的优良性状[J]. 热带作物学报,1989,10(2):17-22.
- [4] CARRON M P, ENJALRIC F, LARDET L, et al. Rubber (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.) [J]. Biotechnol Agr Forest, 1989(5):228-245.
- [5] MENDANHA A B L, TORRES R A A, FREIR A B. Micropropagation of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. Genet Mol Biol, 1998, 21(3):395-398.
- [6] HUANG T D, LI W G, HUANG H S. Micropropagation of shoot apex and shoot stem with axils of cotyledon of *Hevea brasiliensis* [C]. Kunming, China: Proceedings of the International Rubber Conference, Parallel Session 2, 2004.

(上接第 15671 页)

次性进行多达 240 个样本的连续分析,检测结果由分析软件自动计算,1 个样本的检测时间仅需要 90 s,将其用于稻米直链淀粉含量的检测,简化了国标法等烦琐的操作过程,降低了检测人员操作技术对测试结果的影响程度。省去了人工移液,添加指示剂、乙酸、蒸馏水,定容摇匀,分光光度计下的比色和数据计算过程,减少了试剂和试样的消耗量,实现了显色、比色和数据处理同时进行,可节约大量的人力成本和时间,同时克服了常规测试方法在微量测试时,由于样本量少而使定容比色难于操作和不能进行平行测试的缺点,可减少操作误差,提高测试准确度,是一种快速、准确,重现性好的测定稻米直链淀粉含量的较理想方法。用于大批量样本和

样本量非常少的珍稀样本测定,更显示了常规法无法比拟的优越性,为稻米品质研究提供了便利技术。

参考文献

- [1] 万向元,胡培松,王海莲,等. 水稻品种直链淀粉含量、糊化温度和蛋白质含量的稳定性分析[J]. 中国农业科学,2005,38(1):1-6.
- [2] 肖文. 直链淀粉的含量决定淀粉的用途[J]. 农产品加工,2009(2):22.
- [3] 明东风,马均,马文波,等. 稻米直链淀粉及其含量研究进展[J]. 中国农学通报,2003,19(1):68-71.
- [4] 杨洁,余绍金,汪莲爱,等. 应用流动注射法测定稻米的直链淀粉含量[J]. 湖北农业科学,2007(9):828-830.
- [5] 王仪春,张小明,石春海. 稻米直链淀粉含量测定方法的探讨[J]. 中国农学通报,2001,17(5):30-32.
- [6] 法国 Alliance 公司. FUTURA 全自动流动分析仪操作手册[Z]. 2008.
- [7] 国家技术监督局稻米直链淀粉含量的测定(GB-T 15683-1995) [S]. 北京:中国标准出版社,1996.