

双波长比色法测定马铃薯直链/支链淀粉含量

曾凡逵, 赵鑫, 周添红, 刘刚

(中国科学院兰州化学物理研究所环境材料与生态化学发展中心, 甘肃兰州 730000)

摘要: 将新鲜马铃薯中的淀粉提出后, 采用双波长比色法测定了直链/支链淀粉含量。淀粉经 I₂-KI 溶液染色, 直链淀粉呈蓝色, 支链淀粉呈紫色。535 和 570 nm 用于直链淀粉含量测定, 555 和 760 nm 用于支链淀粉含量测定。结果表明, 样品溶解是检测的关键, 淀粉与碘试剂的反应时间会对测定结果造成一定影响。同时通过本方法的检测, 新大坪品种马铃薯的直链淀粉含量为 21.20%, 支链淀粉含量为 78.80%。

关键词: 双波长比色法; 直链淀粉; 支链淀粉; 马铃薯

文章编号: 1673-9078(2012)1-119-122

Dual-wavelength Colorimetric Method for Measuring Amylose and Amylopectin Contents of Potato Starch

ZENG Fan-kui, ZHAO Xin, ZHOU Tian-hong, LIU Gang

(Center for Eco-Materials and Eco-Chemistry, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Dual-wavelength colorimetry was developed to determine amylose and amylopectin contents after the starch was isolated from potato. By staining with I₂-KI solution, amylose displayed a blue color, amylopectin displays a violet color. Absorbancies at 535 and 570 nm were used for amylose content measurement, absorbancies at 555 and 760 nm are used for amylopectin content measurement. The XIN DAPING potato starch (from Dingxi, Gansu province) contained 21.20 % of amylose and 78.80 % of amylopectin. The detection results can be affected by the sample dissolution and the reaction time of starch and I₂-KI solution.

Key words: dual-wavelength colorimetry; amylose; amylopectin; potato

直链淀粉、支链淀粉含量的测定方法包括差示扫描量热法(DSC)^[1], 高效空间排阻色谱法(HPSEC)^[2], 近红外光谱法(NIR)^[3], 热重法(TG)^[4], 酶法^[5]和分光光度法^[6]。分光光度法的原理是: 直链淀粉与碘的结合物呈蓝色, 支链淀粉与碘的结合物呈紫色。1940年, McCready 和 Hassid^[7]将直链淀粉、支链淀粉按不同的比例混合以后与碘试剂(2%碘化钾和 0.2%碘的水溶液)进行反应, 采用单波长法以吸光值为纵坐标、直链淀粉含量为横坐标绘制了用于直链淀粉含量测定的标准曲线, 首次建立了分光光度法测定淀粉组成的方法。然而, 这种单波长法不够精确, 因为直链淀粉-碘结合物的吸收波长为 500~800 nm, 支链淀粉-碘结合物的吸收波长为 500~600 nm, 前者覆盖了后者, 对检测结果造成了干扰。

收稿日期: 2011-11-05

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-15)

作者简介: 曾凡逵(1980-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事马铃薯淀粉和变性淀粉研究

通讯作者: 刘刚, 博士, 研究员

Hovenkamp Hermelink^[8]报道了双波长比色法(618 和 550 nm)测定淀粉样品中直链淀粉的含量。Zhu^[9]将双波长比色法同 DSC 法、HPSEC 法和酶法(直链淀粉/支链淀粉试剂盒)进行了比较, 发现双波长比色法是最准确和最有应用价值的方法。Wang^[10]、Jarvis^[11]、Sene^[12]等报道了能同时测定直链淀粉、支链淀粉和总淀粉含量的三波长比色法, 这些方法结果更精确, 然而由于波长数量多, 结果计算非常复杂。

马铃薯淀粉组成分析对马铃薯遗传育种和加工都具有非常重要的意义, 上一篇文章我们报道了马铃薯直链/支链淀粉的分离^[13], 本文将采用双波长比色法同时测定马铃薯淀粉中直链淀粉、支链淀粉的含量, 并对测定结果的影响因素进行讨论。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UV765 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), 马铃薯直链淀粉(Sigma 公司), 马铃薯支链淀粉(Fluka 公司), 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 马铃薯淀粉的提取

参考曾凡逵等^[13]报道的提取方法,以甘肃省定西市生产的新大坪品种马铃薯为实验原料,从 496.99 g 新鲜马铃薯中提取到 98.83 g 精制淀粉,得率为 19.89%。

1.2.2 检测波长的确定

采用绘图法确定马铃薯直链淀粉检测波长 λ_1 和 λ_2 , 支链淀粉检测波长 λ_3 和 λ_4 。

直链淀粉/支链淀粉标准液: 分别称取直链淀粉/支链淀粉纯品 50.0 mg 于 100 mL 烧杯中,加入 0.5 mol/L KOH 溶液 10 mL 和磁力搅拌子,用保鲜膜封住烧杯口,在沸水浴中搅拌 30 min,待样品完全溶解后,加蒸馏水定容到 100 mL,即为 0.5 mg/mL 直链淀粉/支链淀粉标准溶液。

直链淀粉/支链淀粉光谱测量: 分别取 0.5 mg/mL 直链淀粉和支链淀粉标准液 5 mL 于 100 mL 烧杯中,加蒸馏水 40 mL,以 0.1 mol/L HCl 溶液调 pH 至 3.5 左右,加入碘试剂(2%碘化钾和 0.2%碘, m/V) 1 mL,以蒸馏水定容到 100 mL。静置 20 min 后,以蒸馏水为空白,用双光束分光光度计进行可见光全波段扫描。在同一坐标内获得直链/支链淀粉的吸收曲线。

1.2.3 标准曲线制作

分别吸取 0.5 mg/mL 直链淀粉标准溶液 1、2、3、4、5、6 mL 于 6 只不同的 100 mL 烧杯中,各加蒸馏水 40 mL,以 0.1 mol/L HCl 溶液调 pH 至 3.5 左右,加入碘试剂 1 mL。用蒸馏水定容到 100 mL,静置 20 min,以蒸馏水为空白,用 1 cm 比色杯在 λ_1 、 λ_2 两波长下分别测 A_{λ_1} 和 A_{λ_2} , 得 $\Delta A_{直} = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2}$, 以 $\Delta A_{直}$ 为纵坐标,直链淀粉含量(mg)为横坐标,制备直链淀粉检测标准曲线。

以同样的方法,分别吸取 0.5 mg/mL 支链淀粉标准液 6、8、10、12、14、16 mL 稀释后调 pH,加入 1 mL 碘试剂,再定容到 100 mL,在 λ_3 、 λ_4 两波长下分别测定 A_{λ_3} 和 A_{λ_4} , 即得 $\Delta A_{支} = A_{\lambda_3} - A_{\lambda_4}$, 以 $\Delta A_{支}$ 为纵坐标,支链淀粉含量(mg)为横坐标,制备支链淀粉检测标准曲线。

1.2.4 样品测量

称取约 50.00 mg 待测马铃薯淀粉于 100 mL 烧杯中,加 10 mL 0.5 mol/L 的 KOH 溶液和磁力搅拌子,用保鲜膜封住烧杯口,在沸水浴中加热搅拌 30 min,待样品完全溶解后,以蒸馏水定容到 100 mL。吸取样品液 15 mL 两份(样品测定液和空白液)于 100 mL 烧杯中,分别加蒸馏水 30 mL,以 0.1 mol/L HCl 溶液调 pH 至 3.5,样品中加入碘试剂 1 mL,空白不加碘

试剂,然后均定容到 100 mL。静置 20 min,以空白液为对照,用 1cm 比色杯,测定 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 和 λ_4 的吸光值。另外做 3 次平行实验。

1.2.5 结果计算

$$\text{直链淀粉}(\%) = (x_1 \times 100 \times 100) / (15 \times m \times 1000)$$

$$\text{支链淀粉}(\%) = (x_2 \times 50 \times 100) / (15 \times m \times 1000)$$

式中, x_1 -根据直链淀粉检测标准曲线计算的样品液中直链淀粉含量(mg); x_2 -根据支链淀粉检测标准曲线计算的样品液中支链淀粉含量(mg); m -样品质量(g)

$$\text{总淀粉}(\%) = \text{直链淀粉}(\%) + \text{支链淀粉}(\%)$$

2 结果与讨论

2.1 检测波长的确定

通过作图法确定马铃薯直链淀粉、支链淀粉含量的四个检测波长: λ_1 (535 nm) 和 λ_2 (570 nm) 用于直链淀粉测定, λ_3 (760 nm) 和 λ_4 (555 nm) 用于支链淀粉含量的测定(图 1)。

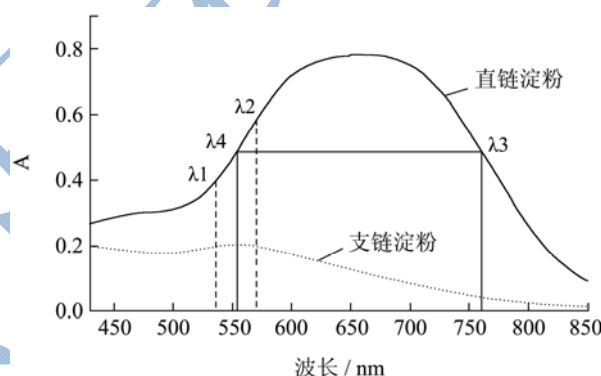


图 1 作图法确定直链淀粉/支链淀粉检测波长

Fig.1 Graphical constructions of detection wavelength for amylose and amylopectin

2.2 标准曲线制作

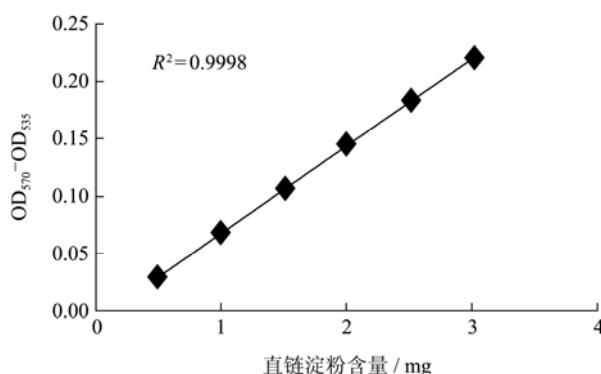


图 2 直链淀粉检测标准曲线

Fig.2 Calibration curve of amylose determination

各种不同浓度马铃薯直链淀粉、支链淀粉与碘的结合物在不同波长下的吸光值见表 1。以直链淀粉含量为横坐标和 $\Delta A_{直}$ (即 $OD_{570} - OD_{535}$) 为纵坐标绘制直链淀粉标准曲线,得 $y = 0.0762x - 0.0077$, 相关系数

为 0.9998 (图 2)。同样, 以支链淀粉含量为横坐标和 $\Delta A_{支}$ (即 $OD_{555}-OD_{760}$) 为纵坐标绘制支链淀粉标准曲线, 得 $y=0.0608x+0.0185$, 相关系数为 0.9979 (图 3)。

表 1 直链淀粉、支链淀粉与碘结合物的吸光值

Table 1 Absorbancies of amylose and amylopectin bind with iodine

序号	直链淀粉			支链淀粉				
	含量 /mg	λ_1 (535nm)	λ_2 (570nm)	$\Delta A_{直}$	含量 /mg	λ_3 (760nm)	λ_4 (555nm)	$\Delta A_{支}$
1	0.5	0.100	0.129	0.029	3	0.056	0.255	0.200
2	1.0	0.169	0.238	0.069	4	0.074	0.332	0.258
3	1.5	0.238	0.345	0.107	5	0.091	0.419	0.328
4	2.0	0.308	0.454	0.146	6	0.107	0.489	0.382
5	2.5	0.379	0.562	0.183	7	0.122	0.573	0.451
6	3.0	0.444	0.663	0.219	8	0.139	0.638	0.496

2.3 样品检测结果

马铃薯淀粉的组成受到品种和栽培条件(如气候、土壤等)等因素的影响。甘肃省定西市生产的新大坪品种马铃薯直链淀粉、支链淀粉含量测定结果见表 2。从表中可以看出, 直链淀粉和支链淀粉含量分别为 21.20 %和 78.80 %。从表观测定值的标准差可以看出,

表 2 马铃薯淀粉样品直链淀粉、支链淀粉含量检测结果 (n=4)

Table 2 Results of amylose and amylopectin determination of starch from potato

淀粉浓度 ^a (μg/mL)	测定值						矫正值 ^b					
	λ_1	λ_2	$\Delta A_{直}$	λ_3	λ_4	$\Delta A_{支}$	直链淀粉/%	支链淀粉/%	总淀粉/%	直链淀粉/%	支链淀粉/%	总淀粉/%
22.92	0.208	0.238	0.031	0.098	0.230	0.132	21.87	81.38	103.25	21.18	78.82	100
28.65	0.249	0.290	0.040	0.115	0.274	0.158	21.99	80.31	102.30	21.49	78.51	100
34.38	0.291	0.337	0.046	0.139	0.318	0.179	20.57	76.97	97.55	21.09	78.91	100
57.30	0.472	0.561	0.089	0.227	0.535	0.308	22.12	83.10	105.22	21.03	78.97	100
平均值±标准差							21.64±0.72	80.44±2.58	102.08±3.26	21.20±0.20	78.80±0.20	

注: a: 淀粉浓度为检测前淀粉与碘试剂的混合物中淀粉的含量; b: 矫正方法为将直链淀粉和支链淀粉的含量之和(即总淀粉)调整为 100%。

实验过程还发现样品的溶解是检测成功与否的关键。天然马铃薯淀粉颗粒是由直链淀粉和支链淀粉组成的混合物(不溶于冷水), 每个淀粉颗粒既含有直链淀粉又含有支链淀粉。直链淀粉与支链淀粉以及支链淀粉之间的氢键相互结合的程度影响着淀粉颗粒的结构: 当这些键很强、很多、很规整时, 就构成淀粉晶体的网络结构; 相反, 在无定形区, 氢键很弱, 这部分高聚物的分子在空间上就更自由^[15]。

本实验采用 0.5 mol/L 的 KOH 溶液通过沸水浴来溶解马铃薯淀粉, 溶解过程中, 淀粉颗粒吸水溶胀, 直链淀粉和支链淀粉之间的氢键被打断, 两种淀粉相互分散开。如果淀粉颗粒溶胀不够充分, 仍然呈颗粒

直链淀粉测定结果准确度高于支链淀粉。

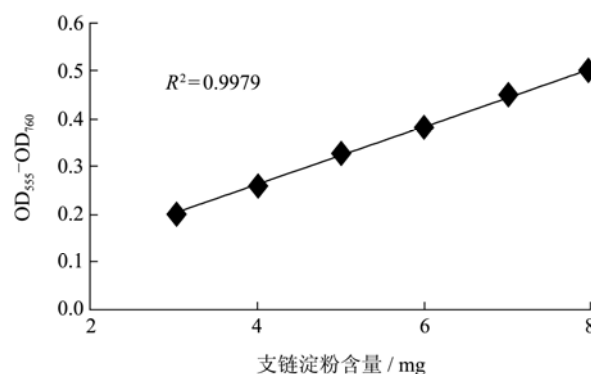


图 3 支链淀粉检测标准曲线

Fig.3 Calibration curve of amylopectin determination

宿飞飞等^[14]报道了几种不同马铃薯品种淀粉组成, 直链淀粉含量为 23.3~27.2%, 支链淀粉含量为 72.8~76.7%。其检测方法同样为比色法(参照《谷子籽粒直链淀粉测定法(NY/T 55-87-1987)》), 只检测了直链淀粉的含量, 支链淀粉含量通过总淀粉减去直链淀粉含量求的。值得注意的是支链淀粉含量的测定需要用相应来源的支链淀粉(如测定马铃薯支链淀粉含量要用马铃薯支链淀粉做标准品), 因为蜡质和非蜡质支链淀粉对测定结果有影响。

状的淀粉与碘试剂反应时, 颗粒表面的淀粉分子与碘结合形成在水溶液中肉眼能观察到的悬浮物, 这种悬浮物静置后会同普通淀粉一样沉降, 由此对检测结果造成影响。一般采用 0.5 mol/L 的 KOH 溶液沸水浴溶解淀粉样品所需要的时间大约为 30min, McGrance 等^[16]采用二甲基亚砜(DMSO) 85 °C 水浴 15 min 来溶解淀粉样品。

2.4 反应时间对检测结果的影响

淀粉与碘试剂的反应时间对检测结果的影响见图 4。从图 4 可以看出, OD_{535} 、 OD_{555} 和 OD_{570} 都随着反应时间增加而降低, OD_{760} 基本不变(20 min 和 50 min 分别为 0.311 和 0.312)。经计算, 50 min 与 20 min 相

比, 直链淀粉测定结果增加 1 个百分点, 支链淀粉测定结果降低了 7.5 个百分点(制作标准曲线的样品反应时间都为 20 min)。由此可以看出淀粉与碘试剂的反应时间对支链淀粉含量测定结果的影响远大于对直链淀粉测定结果的影响, 因此制作标准曲线和样品测定都要严格控制反应时间为 20 min。

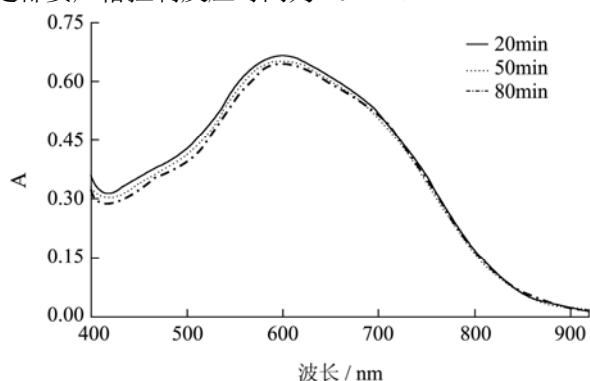


图 4 淀粉与碘反应时间对检测结果的影响 (61.2 g/mL 淀粉-碘溶液)

Fig.4 Effect of reaction time of starch and iodine on the detection results (61.2 μ g/mL starch - iodine solution)

3 结论

双波长比色法是一种比较准确和具有应用价值的直链淀粉、支链淀粉含量测定方法, 甘肃省定西市生产的新大坪品种马铃薯直链淀粉、支链淀粉含量分别为 21.20%和 78.80%。淀粉样品的溶解是检测成功与否的关键, 淀粉与碘试剂的反应时间也对检测结果有影响: 直链淀粉含量的检测结果随着反应时间增加而增加, 支链淀粉含量的检测结果随着反应时间增加降低。

参考文献

- [1] Moorthy S N, Andersson L, Eliasson A C. Determination of amylose content in different starches using modulated differential scanning calorimetry [J]. *Starch/Stärke*, 2006, 58: 209-214
- [2] Grant L A, Ostenson A M, Rayas-Duarte P. Determination of amylose and amylopectin of wheat starch using high performance size-exclusion chromatography (HPSEC) [J]. *Cereal Chem.*, 2002, 79: 771-773
- [3] Fertig C C, Podczek F, Jee R D. Feasibility study for the rapid determination of the amylose content in starch by near-infrared spectroscopy [J]. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, 21: 155-159
- [4] Stawski D. New determination method of amylose content in potato starch [J]. *Food Chem.*, 2008, 110: 777-781
- [5] Barry V M, Trevor S G, David C M. Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- α -amylase method: Collaborative study [J]. *J. AOAC Int.*, 1997, 80: 571-579
- [6] Mahmooda T, Turner M A, Stoddard F L. Comparison of methods for colorimetric amylose determination in cereal grains [J]. *Starch/Stärke*, 2007, 59: 357-365
- [7] McCready R, Hassid W. The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1943, 65: 1154-1157
- [8] Hovenkampf Hermelink J, Vries J, Adamse P. Rapid estimation of amylose/amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf of the potato [J]. *Potato Res.* 1988, 31: 241-246
- [9] Zhu T, Jackson D S, Wehling R L. Comparison of amylase determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique [J]. *Cereal Chem.*, 2008, 85: 51-58
- [10] Wang J, Li Y, Tian Y, et al. A novel triple-wavelength colorimetric method for measuring amylase and amylopectin contents [J]. *Starch/Stärke* 2010, 62: 508-516
- [11] Jarvis C E, Walker J R L. Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin [J]. *J. Sci. Food Agri.*, 1993, 63: 89-92
- [12] Séne M, Thévanot C, Prioul L J. Simultaneous spectrophotometric determination of amylose amylopectin in starch from maize Kernel by multi-wavelength analysis [J]. *Cereal Sci.*, 1997, 26: 211-221
- [13] 曾凡逵, 赵鑫, 周添红, 等. 马铃薯直链淀粉支链淀粉的分离 [J]. *现代食品科技*, 2011, 27(12): 1466-1468
- [14] 宿飞飞, 石瑛, 梁晶, 等. 不同马铃薯品种淀粉含量、淀粉产量及淀粉组成的评价 [J]. *中国马铃薯*, 2006, 20(1): 16-18
- [15] Liu Q, Donner E, Tam R, et al. Advanced analytical techniques to evaluate the quality of potato and potato starch, in Singh J & Kaur L [M]. *Advances in potato chemistry and technology*. Elsevier Inc. 2009
- [16] McGrance S J, Cornell H J, Rix C J. A Simple and Rapid Colorimetric Method for the Determination of Amylose in Starch Products [J]. *Starch-Stärke*, 1998, 50(4): 158-163