

优化毛细管电泳法测定山药淀粉中直链/支链淀粉

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: 以市售新鲜怀山药为原料通过石灰水浸泡法制备山药粉, 并通过正丁醇反复结晶法分离纯化直链淀粉与支链淀粉。利用碘做显色剂, 使用毛细管电泳法测定山药淀粉中直链淀粉与支链淀粉的含量以及比率, 本文分别对柠檬酸-磷酸盐缓冲液以及醋酸-醋酸盐缓冲液等不同缓冲液作为流动相进行了对比, 实验发现醋酸-醋酸盐缓冲液对于分离测定直链淀粉与支链淀粉的效果较好。随后分析了不同 pH 条件下的醋酸-醋酸盐缓冲液进行的分离效果进行了比较, 并测定其迁移率, 当 pH 4.8 时分离效果最佳且其迁移率达到 15.4。利用最佳条件使用纯的马铃薯直链淀粉与支链淀粉标准品, 得出支链淀粉的保留时间约为 1.8 min, 而直链淀粉的保留时间约为 2.9 min, 对怀山药淀粉进行分析, 从而得出怀山药中直链淀粉含量为 19.49%。利用重复性试验以及回收率试验该方法的准确性与精确度能达到很好的效果。

关键词: 淀粉; 毛细管电泳; 直链/支链淀粉

文章编号: 1673-9078(2014)12-282-286

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.047

Optimization of Capillary Electrophoresis for the Determination of Amylose/Amylopectin Content in Chinese Yam Starch

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: Chinese yam powder was prepared by limewater immersion with fresh, commercially available *Dioscorea opposita* as the raw material; amylose and amylopectin were separated and purified by repeated recrystallizations using *n*-butanol. Using iodine ions as chromogenic agents, capillary electrophoresis was used to determine the content and ratio of amylose and amylopectin in Chinese yam starch. In this study, the use of different buffers, such as citrate-phosphate and acetate acid-acetate, was compared. The acetate acid-acetate buffer was found to be superior in the separation of amylose and amylopectin. Subsequently, the separation effects of acetate acid-acetate buffer under different pH values were compared and the electrophoretic mobilities were measured. When the pH was 4.8, the best separation effect was obtained, with an electrophoretic mobility of 15.4. Under the optimized conditions, the retention time of amylopectin and amylose was 1.8 min and 2.9 min, respectively, with pure potato amylose and amylopectin as the standards. *Dioscorea opposita* starch was analyzed, and the amylose content was found to be 19.49%. Repeatability and recovery experiments confirmed the suitable accuracy and precision of this method.

Key words: starch; capillary electrophoresis; amylose/amylopectin

淀粉是一种多糖, 主要作为植物存储能量的物质, 通常以颗粒的形式存储在细胞中, 直径大小在 1~100 μm 范围内^[1]。淀粉主要包含两个组分, 分为直链淀粉与支链淀粉。直链淀粉(图 1)是线性的单独由 α -1, 4 糖苷键链接脱水葡萄糖形成的一种聚合度在 1600 左右的一种聚合物, 而支链淀粉(图 2), 聚合度在 6000~8000 之间, 由 α -1, 4 糖苷键链接葡萄糖形成主链, 但是不同的是支链淀粉会有 α -1, 6 糖苷键形成的支链结构。淀粉的性质会受淀粉的来源、产地以及淀粉中直链/支链淀粉的比例等方面的影响, 因此, 研究淀粉中直链淀粉的含量和直链/支链比率的检测方法

收稿日期: 2014-05-10

是个值得关注的问题。

谷物中直链淀粉的含量以及直链/支链淀粉的比率通常使用碘结合法测定, 包括分光法、安培法、电位法等。但是这些方法都是依靠直链淀粉与碘形成螺旋复合物, 从而产生一种蓝色并且最大吸收峰在 650 nm 的波长, 但是这些方法都会有所偏差, 通过比色法时, 支链淀粉也会与碘形成复合物从而减少游离碘的含量。因此寻找一种高效的测定直链淀粉含量以及直链/支链比率的方法是值得研究的问题^[2]。

毛细管电泳(CE)指以高压电场为驱动力, 以毛细管为分离通道, 依据样品各组分之间淌度和分配行为上的差异而实现分离的一类液相分离技术, 毛细管

电泳所用的石英毛细管柱内存在着两种电迁移现象,分别为电泳和电渗。电泳现象是指带电粒子在电场作用下的迁移,在 pH 值>3 的情况下,其内表面带负电,与缓冲液接触时形成双电层,在高压电场作用下,形成双电层一侧的缓冲液由于带正电而向负极方向移动,从而形成电渗流^[3]。同时,在缓冲溶液中,带电粒子在电场作用下,以各自不同速度向其所带电荷极性相反方向移动,形成电泳。带电粒子在毛细管缓冲液中的迁移速度等于电泳和电渗流的矢量和。前人已经证明了毛细管电泳在分离多糖混合物方面展现出了极其高效的性能,在淀粉的分离方面也具有较好的效果。直链和支链淀粉与碘形成以 I⁵⁻为核心的螺旋形复合物,在 560 nm 存在最大吸收,可用于检测这类反映的特点是:复合物的稳定性随糖链的延长,先呈指数型增加,而后变化趋缓,拐点大致在 125 糖残基处。利用淀粉的碘复合物,可以电泳分离马铃薯淀粉、玉米淀粉、麦芽糖精等^[4]。

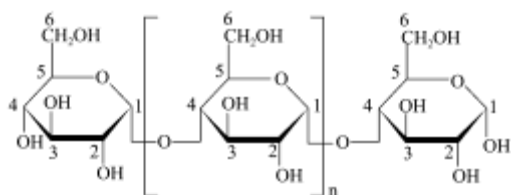


图1 直链淀粉结构图

Fig.1 Structure of amylose

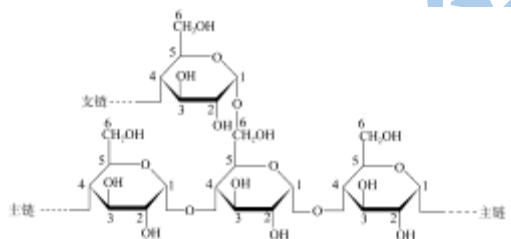


图2 支链淀粉结构图

Fig.2 Structure of amylopectin

1 材料与方法

1.1 实验材料

怀山药(河南)。直链、支链淀粉标准样品购于 Sigma 公司;无水乙醇、氢氧化钙、氢氧化钾、盐酸、碘、碘化钾、醋酸、醋酸钠、磷酸、硼酸、DMSO 等均属于分析纯。

1.2 仪器与设备

SJ205-4 电子分析天平,沈阳龙腾电子称量仪器有限公司;DFG801 电热鼓风箱,湖北省黄石市医疗器械厂;装备紫外检测器的毛细管电泳仪,美国加利

福尼亚贝克曼库尔特公司;毛细管 40 cm,有效长度 32 cm。

1.3 实验方法

1.3.1 山药淀粉制备

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 Ca(OH)₂ 按照固液比 1:7 浸泡,浸泡时间 2 h 并重复 4 次;将沉淀用 90% 乙醇浸泡 2 h 后烘干;利用索氏抽提对所得到的山药淀粉进行脱脂处理。^[5]

1.3.2 直链淀粉与支链淀粉的分离纯化

采用正丁醇反复结晶法^[5],称取 10 g 淀粉,加入到 500 mL 的烧杯中,加入少量无水乙醇和蒸馏水使样品湿润,再加入 0.5 mol/L 的 NaOH 350 mL,沸水浴中加热搅拌 20~30 min 至完全分散,冷却后离心(4000 r/min, 20 min)去沉淀,再以 2 mol/L 的 HCl 调节 pH 至中性,加入 100 mL 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 °C 冰箱中静置 24 h 后离心(4000 r/min, 20 min),离心后得到的上清液即为粗支链淀粉溶液(Ap),得到的沉淀为粗直链淀粉(Am)。

支链淀粉的纯化:上清液中加入 20 mL 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 °C 冰箱中静置 24 h 后离心(4000 r/min, 20 min)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 °C 的烘箱中干燥即为支链淀粉样品。

直链淀粉的纯化:向粗直链淀粉中加入 240 mL 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 °C 冰箱中静置 24 h,取出后离心(4000 r/min, 20 min)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 °C 烘箱中干燥即得到直链淀粉样品。

1.3.3 缓冲液配置

称取 1.000 g KI 置于 100 mL 烧杯中,加入少量水溶解,称取 1.000 g I₂ 逐渐加入到 KI 溶液中并且搅拌使其溶解,定容至 100 mL 的容量瓶中常温避光保存。

取醋酸原液 11.55 mL,加超纯水稀释并定容至 1000 mL 配置成 0.2 mol/L 的醋酸母液;称取 16.4 g 醋酸钠(C₂H₃O₂Na)加超纯水溶解并定容至 1000 mL 配置成 0.2 mol/L 的醋酸钠母液。分别配置成 pH 为 4.2、4.4、4.6、4.8、5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液。

柠檬酸-磷酸盐缓冲液的配置:称取 28.4 g 磷酸氢

二钠 (Na₂HPO₄) 用超纯水溶解并定容至 1000 mL 配置成 0.2 mol/L 的磷酸盐母液, 称取柠檬酸 (C₆H₈O₇·H₂O) 21.01 g 用超纯水溶解后定容至 1000 mL 配置成 0.1 mol/L 的柠檬酸母液。分别移取不同的量配置成 pH6 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液^[7]。

1.3.4 样品处理

称取样品 100 mg 溶于 50 mL 20 mg/mL 的二甲基亚砷 (DMSO) 溶液中, 并于沸水浴中搅拌直至样品完全溶解后备用。

分别取不同 pH 的醋酸缓冲液以及柠檬酸-磷酸盐缓冲液 50 mL, 向其中加入 1 mL 碘缓冲液作为流动相。

1.3.5 条件优化

在每天进行毛细管电泳之前, 需要分别用 1 mol/L NaOH、0.1 mol/L NaOH、水、流动相冲洗毛细管。所有的样品以及流动相都需要经过微孔过滤膜处理以除去杂质。分离电压 20 kV, 温度 25 °C, 进样量 20 μL。

1.3.6 重复性试验

采用最佳流动相, 按照 1.3.4 中条件对同一样品重复 5 次进样测定, 验证该方法的稳定性以及可行性。

1.3.7 回收率测定

在已测得含量的山药淀粉中, 分别加入提取得到的山药直链淀粉与支链淀粉纯品, 根据有关文献^[8]得出回收率计算公式(1)如下:

$$\text{回收率} = \frac{\text{加标试样测定值} - \text{试样测定值}}{\text{加标值}} \times 100\% \quad (1)$$

分别对加标试样以及试样进行测定, 再通过已知浓度的标准品峰面积等关系分别计算出样品中的直链淀粉与支链淀粉的含量。从而根据上式得出回收率。

2 结果分析

2.1 不同流动相的选择

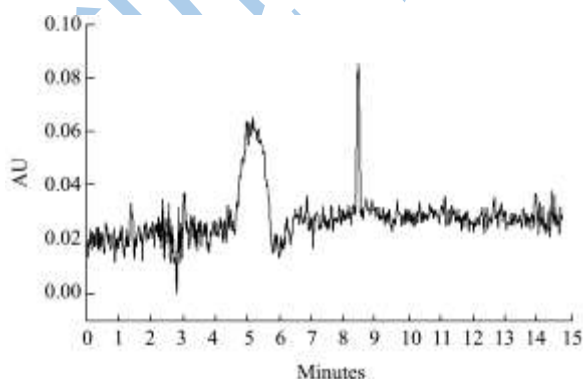
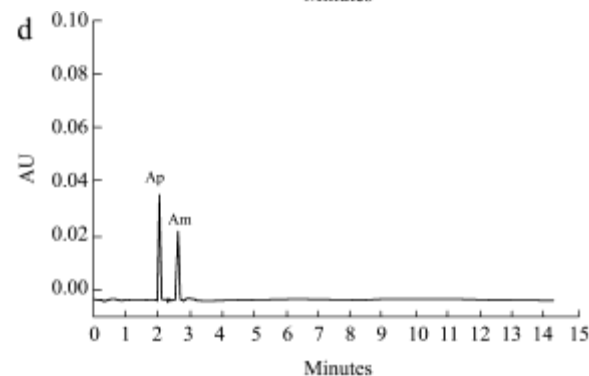
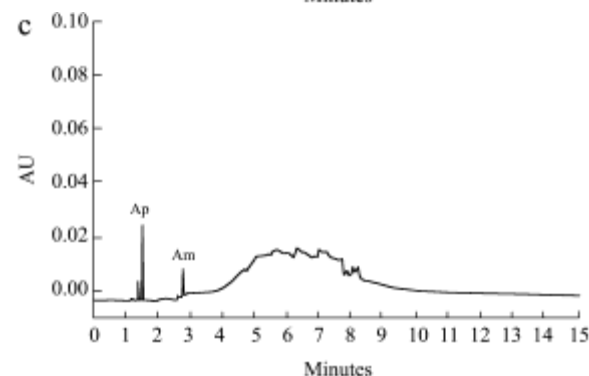
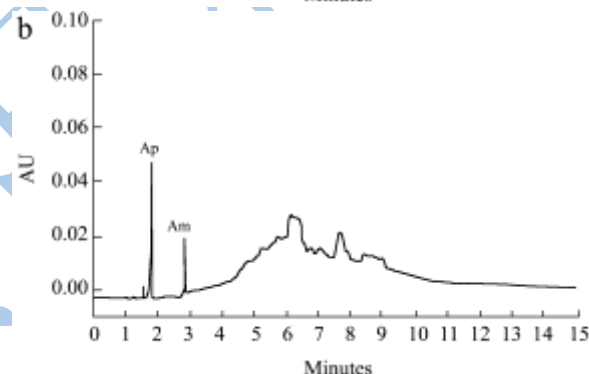
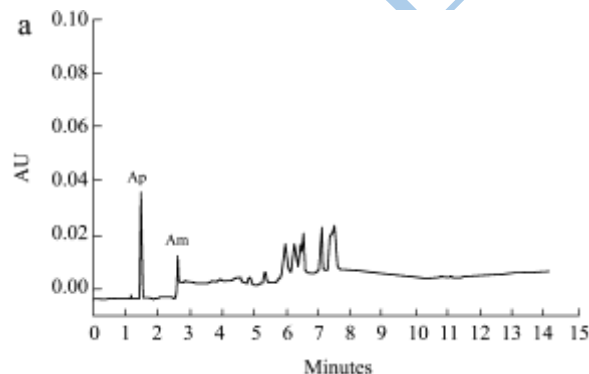


图3 山药淀粉在柠檬酸-磷酸盐作为缓冲液电泳图

Fig.3 CE electropherogram of Chinese yam starch in citrate-phosphate buffer

图3是在柠檬酸-磷酸盐缓冲液 pH 6 条件下山药淀粉在 560 nm 处的电泳图, 由图3可知, 用柠檬酸-磷酸盐缓冲液作为流动相分离效果不是很明显, 并且出现很多杂峰, 其他 pH 条件下的分离效果也不明显, 因此本实验不将柠檬酸-磷酸盐作为流动相。

2.2 不同 pH 条件下的醋酸-醋酸盐缓冲液的选择



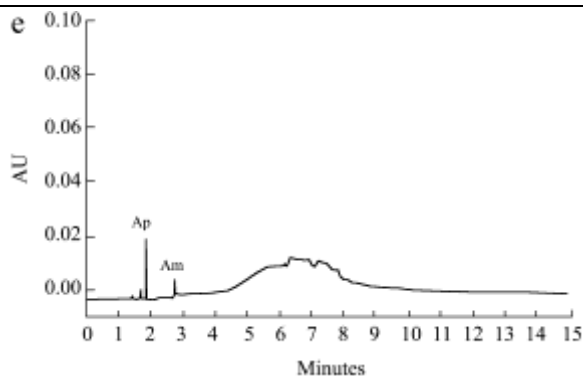


图4 山药淀粉在不同 pH 的醋酸-醋酸盐缓冲液下的电泳图

Fig.4 CE electropherograms of Chinese yam starch under different pH conditions in acetate acid-acetate buffer

如图4所示,图a、b、c、d、e分别表示了醋酸-醋酸盐缓冲液分别是 pH 在 4.2、4.4、4.6、4.8、5.0 下得到的电泳图,因支链淀粉比直链淀粉平均长度要小很多,因此与碘结合后先出峰,且保留时间大约在 1.5 min,而直链淀粉的保留时间约在 2.9 min。并且根据图中的迁移率列出表格 1,从图中以及表格中数据可以看出,在 pH 4.8 条件下,分离效果较为明显,且在此条件下的迁移率最高。但随着 pH 的增大或者减小,出现了杂峰,且分离效果不明显,因此确定了最佳条件为 pH 4.8 的醋酸-醋酸盐作为流动相分离直链淀粉与支链淀粉。

表1 不同 pH 条件下的山药淀粉迁移率

Table 1 Electrophoretic mobilities of Chinese yam starch under different pH conditions

pH	迁移率/(10 ⁻⁶ m ² /Vs)	
	直链淀粉	支链淀粉
4.2	2.9	9.6
4.4	5.7	11.8
4.6	8.4	14.3
4.8	8.6	15.4
5.0	8.1	14.9

2.3 直链淀粉与支链淀粉标品

根据最佳测定条件对来自马铃薯的支链淀粉与直链淀粉标准品进行测定。可以看出支链淀粉与直链淀粉的保留时间分别为 1.8 min 与 2.9 min。如图 5 所示。

2.4 怀山药淀粉毛细管电泳图

利用最佳测定条件对怀山药淀粉进行测定,得到的毛细管电泳图谱如图 6 所示,由图中可以得到直链淀粉与支链淀粉的峰面积分别为 18479 与 76337,从而计算出怀山药中直链淀粉的含量约占淀粉总量的 19.49%^[9]。

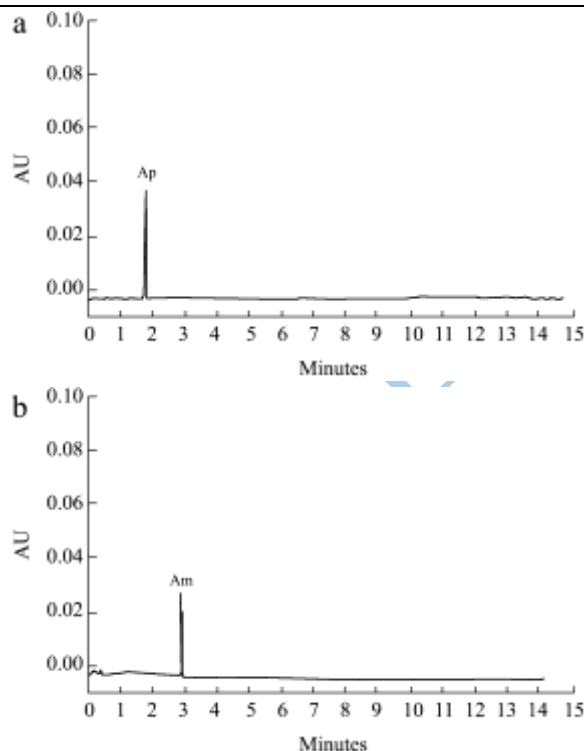


图5 标准品图谱支链淀粉(a)与直链淀粉(b)

Fig.5 CE electropherograms of amylopectin(a) and amylose(b) standards

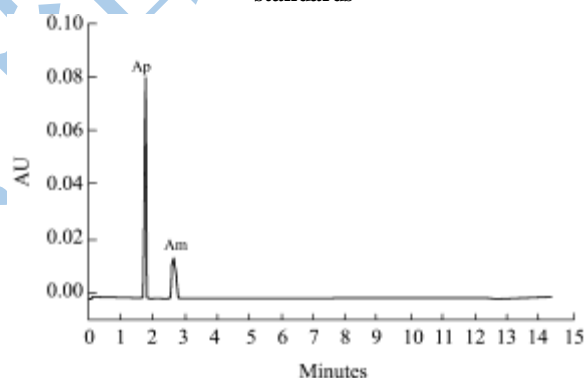


图6 怀山药毛细管电泳图

Fig.6 CE electropherograms of Dioscorea opposita starch

2.5 重复性试验

表2 重复性试验结果

Table 2 Repeatability of test results

名称	直链淀粉	支链淀粉	直链淀粉比例%	相对标准偏差%
	18479	76337	19.49	
	18471	76331	19.48	
峰面积	18488	76322	19.50	0.03
	18474	76339	19.48	
	18481	76331	19.49	

重复性实验测定结果如表 2 所示,根据表中数据算出直链淀粉比例,以及相对标准偏差 RSD=0.03%,

因此该方法具有很高的精密密度。

2.6 回收率测定结果分析

表 3 回收率分析

Table 3 Recovery analysis

实验分类	项目	1	2	3	4	5
直链淀粉	Am 加入量/g	0.0113	0.0132	0.0113	0.0121	0.0109
	试样中 Am 量/g	0.0185	0.0191	0.0194	0.0186	0.0179
	实测 Am 量/g	0.0300	0.0321	0.0306	0.0309	0.0286
	回收率/%	101.77	98.48	99.12	101.65	98.17
	平均回收率/%	99.84				
	RSD/%	1.74				
支链淀粉	Ap 加入量/g	0.0158	0.0143	0.0125	0.0149	0.0152
	试样中 Ap 量/g	0.0781	0.0779	0.0792	0.0788	0.0783
	实测 Ap 量/g	0.0937	0.0925	0.0916	0.0938	0.0933
	回收率/%	98.73	102.10	99.20	100.67	98.68
	平均回收率/%	99.88				
	RSD/%	1.48				

回收率实验如表 3 所示，由表中数据可以看出，直链淀粉与支链淀粉的平均回收率分别为 99.84% 与 99.88%，在 99% 到 100% 之间，而直链淀粉与支链淀粉回收率测定的相对标准偏差(RSD)分别为 1.74% 与 1.48%，在 2.0% 以内，因此认为该方法具有较高的精确度与准确度。

3 结论

毛细管电泳法 (CE) 是一种测定淀粉中直链淀粉与支链淀粉含量及其比率的高效快捷的检测手段，文中对其测定方法进行了优化，从而确定最佳流动相是醋酸-醋酸盐缓冲液 pH 4.8 能达到最佳的分离效果。通过上述方法测定出怀山药淀粉中直链淀粉约占总淀粉含量的 19.49%。并通过重复性试验计算相对标准偏差 (RSD) 为 0.03%，说明实验重复性较好，而回收率试验也证明了该实验方法的精确度较高。

参考文献

[1] 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

[2] José Manuel Herrero-Martínez, Peter J Schoenmakers, WimTh Kok. Determination of the amylose-amylopectin ratio of starch by iodine-affinity capillary electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1053: 227-234

[3] 孟祥平, 刘建学. 毛细管电泳在食品分析中的应用进展 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(11): 88-92

MENG Xian-ping, LIU Jian-xue. Advances of capillary electrophoresis in food analysis [J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(11): 88-92

[4] 陈义. 毛细管电泳技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006

CHEN Yi. Capillary electrophoresis technology and application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006

[5] 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

LI Chang-wen, LIU Yan-qi, LI Yan-tao. Study of yam starch properties [J]. Chinese Cereals and Oils Association, 2010, 25(8): 23-26

[6] 敖自华, 王璋, 许时婴. 银杏淀粉的分离和纯化 [J]. 食品科学, 2001, 22(1): 23-26

AO Zi-hua, WANG Zhang, XU Shi-ying. The separation and purification of ginkgo starch [J]. Food Science, 2001, 22(1): 23-26

[7] Jeffrey D. Brewster, Marshall L Fishman. Capillary electrophoresis of plant starches as the iodine complex [J]. Journal of Chromatography A, 1995, 693: 382-387

[8] 吴国旭, 毕富春, 翟立红. 回收率计算常见的错误解析 [J]. 天津科学技术, 2012, 1: 88-89

WU Guo-xu, BI Fu-chun, ZHAI Li-hong. Parsing of common mistake in recovery calculation [J]. Tianjin Science & Technology, 2012, 1: 88-89

[9] Wang Shu-jun, Liu Hong-yan, Gao Wen-yuan et al. Characterization of new starches separated from different Chinese yam (*DioscoreaoppositaThunb.*) cultivars [J]. Food Chemistry, 2006, 99: 30-37