

唐云, 闫海彦, 赵亚雄, 等. 碘比色法测定高粱中直链淀粉和支链淀粉的方法探讨 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(13): 272-280. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070293

TANG Yun, YAN Haiyan, ZHAO Yaxiong, et al. Determination of Amylose and Amylopectin in Sorghum by Iodine Colorimetric Method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(13): 272-280. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070293

· 分析检测 ·

碘比色法测定高粱中直链淀粉和支链淀粉的方法探讨

唐 云, 闫海彦*, 赵亚雄, 郇 丹, 宗文文, 宋菲红
(金徽酒股份有限公司, 甘肃陇南 742308)

摘 要:目的: 高粱中淀粉含量与其衍生物的品质密切相关, 对其中直链淀粉(Am)和支链淀粉(Ap)含量的测定很有必要。本文采用碘比色法对高粱籽粒中淀粉(Am、Ap)含量的测定, 探讨最佳预处理与检测方法。方法: 以高粱籽粒中的 Am 与 Ap 为主要研究对象, 比较碘比色法中的三种检测方法, 即: 单波长混标法(I)、双波长单标法(II)及双波长混标法(III), 通过精密度、检出限、定量限等对三种测定方法进行了一系列的方法学验证, 并对预处理及测定过程中 NaOH 和 KOH 分散剂、糊化温度、糊化时间、乙酸和盐酸 pH 调节剂、碘试剂用量和显色时间进行了比较优化, 最后通过重复性验证、回收率验证和常见谷物样品的测定验证了最佳方法的准确性。结果: 三种方法的检出限和定量限均能满足实际样品的测定范围需求, 其中检出限: Am 均 ≤ 0.55 mg/L, Ap 均 ≤ 2.75 mg/L, 定量限: Am 均 ≤ 1.65 mg/L, Ap 均 ≤ 8.33 mg/L; 样品准确率实验发现, 混标溶液标曲得到的误差绝对值较小(0.13%), 但单标溶液标曲误差较大(7.47%), 因此需要选用混标溶液配制标曲; 高粱籽粒中淀粉的最佳预处理与测定条件是: 以 NaOH 作分散剂, 以乙酸或盐酸为 pH 调节剂, 70 ℃ 糊化 10~20 min, 采用标准碘试剂浓度, 显色 20~30 min 内测定结果较为稳定、准确; 测定方法中, 双波长混标法(III)所测定的 Am、Ap 及总淀粉含量准确, 且与理论粗淀粉含量吻合, 重复性和回收率(80%~120%)高。结论: 碘比色双波长混标法是测定高粱籽粒中直链淀粉和支链淀粉含量的最佳测定方法, 可用于实际样品的测定。

关键词: 直链淀粉, 支链淀粉, 碘比色法, 高粱, 分析检测

中图分类号: O656.31

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)13-0272-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070293

本文网刊:



Determination of Amylose and Amylopectin in Sorghum by Iodine Colorimetric Method

TANG Yun, YAN Haiyan*, ZHAO Yaxiong, HUAN Dan, ZONG Wenwen, SONG Feihong
(Jinhui Liquor Co. Ltd., Longnan 742308, China)

Abstract: Objective: The content of starch was closely related to the derivative products of sorghum. It was very important to determination of the content of starch, including amylose (Am) and amylopectin (Ap) in sorghum. In this study, the content of Am and Ap was determined by the iodine colorimetry. And conditions of pretreatment and determination were optimized. Method: Using Am and Ap in sorghum as the main object, the content of starch was measured by the iodine colorimetry with different detection methods, including the single wavelength mixed standard method (I), the dual wavelength single standard method (II), and the dual wavelength mixed standard method (III). A series of methodological verifications, such as the precision, detection limit and quantification limit, were compared. And the conditions of pretreatment, such as NaOH and KOH dispersant, gelatinization temperature and time, acetic acid and hydrochloric acid pH regulator, dosage of iodine reagent and color rendering time were optimized. The repeatability verification recovery rate and the determination of common grain samples of the obtained method was also tested, which verified the accuracy of the

收稿日期: 2022-08-02

作者简介: 唐云(1974-), 男, 本科, 高级工程师, 研究方向: 酿酒生产工艺与白酒质量管控, E-mail: ty@jinhuijiu.com。

* 通信作者: 闫海彦(1994-), 女, 硕士, 研究方向: 食品检测分析, E-mail: 767928507@qq.com。

method. Result: The detection limits and quantification limits of the three methods could meet the requirements of the actual sample measurement range, with detection limits of $A_m \leq 0.55 \text{ mg/L}$, $A_p \leq 2.75 \text{ mg/L}$, quantification limits of $A_m \leq 1.65 \text{ mg/L}$, $A_p \leq 8.33 \text{ mg/L}$. The absolute error of the accuracy experiments was 0.13% from the mixed standard solution calibration curve, the single standard solution calibration curve error was relatively large (7.47%), thus the mixed standard solution was better to prepare the calibration curve. The optimal preprocessing of sorghum: Using NaOH as the dispersant, the gelatinization temperature at 70°C for 10~20 min, with acetic acid or hydrochloric acid as pH regulator, using standard iodine reagent concentration, controlling the coloring time at 20~30 min, the determination results were relatively stable and accurate. The total content of starch was consistent with the starch content in theory, and it had a good repeatability and recovery (80%~120%). Conclusion: In summary, the dual wavelength mixed standard method of iodine colorimetry was a best method for measuring the content of A_m and A_p in sorghum, and it was more suitable for the determination of actual samples in crops.

Key words: amylose; amylopectin; iodine colorimetry; sorghum; analytical detection

白酒酿造的原料包括高粱、玉米、小麦、大米、糯米等多种粮食^[1],其中高粱在白酒酿造中具有出酒率高,醇厚浓郁,香正甘冽等优点,远胜其他酿酒原料^[2]。迄今为止,高粱的种类已经超过了 10000 种,大多数高粱品种在大小、结构、色素沉着、质地、硬度和生化特性上都有差异^[3]。但并不是所有高粱都适合酿酒,只有品质优良的高粱才能酿出品质优异的好酒。高粱的主要成分是淀粉(Starch, St, 占 70% 左右)^[4]。淀粉是由直链淀粉(Amylose, A_m)和支链淀粉(Amylopectin, A_p)两种主要成分组成的复杂微粒,通常伴有水、脂类、磷脂、可溶性/不可溶性纤维和一些矿物质^[5]。 A_m 与 A_p 的比例因淀粉的植物来源而异。除高 A_m ^[6] 和蜡质淀粉^[7] 外,大部分原生淀粉中 A_m 含量在 20%~30% 之间^[8]。用于酿造白酒的高粱中 A_m 和 A_p 的含量直接关系到白酒的质量和产量^[9]。因此需要对酿酒高粱中的 A_m 和 A_p 的含量进行准确测定,从而筛选出最佳的酿酒原料。目前测定 A_m 和 A_p 含量的方法有体积排阻色谱分析法^[10]、差示扫描量热法^[11]、近红外光谱分析法^[12-13]、连续流动测定法^[14]、伴刀豆球蛋白法^[15]、碘亲和滴定法^[16] 等。这几种测定方法都是基于碘比色法衍生而来,但这些测定法由于仪器及试剂价格高、操作复杂等难于推广应用^[17-18]。

碘结合法是最传统且常用的方法^[19],最先由 Mccready 和 Hassid^[20] 提出用于马铃薯淀粉中 A_m 的测定,具有易操作、成本低、速度快、准确度高的特点。国标方法就是采用碘结合法进行测定,如 GB/T 15683-2008 大米直链淀粉含量的测定^[21] 和 GB 7648-1987 水稻、玉米、谷子籽粒直链淀粉测定法^[22] 分别在单波长 720、620 nm 处测定 A_m 的含量,但该方法不能直接测定 A_p 含量,需用理论总淀粉含量减去 A_m 含量计算得到,因此测定结果有一定的局限性。2012 年发布的江苏省地标 DB32/T 2265-2012^[23] 采用双波长分光光度法测定鲜食玉米中 A_m 和 A_p 含量,可以同时测定 A_m 和 A_p 的含量,近些年,许多文献研究也提出碘结合-双波长法,由于排除了相应干扰组分的影响,具有更高的精密度和准确度^[24-25]。双波长法的原理是利用溶液中某溶质对

两个波长的吸光度(Absorbance, ABS)差值消减两类淀粉吸收背景的相互影响,选用了两个测定波长和两个参比波长,可以同时测出 A_m 和 A_p 的含量,因此提高了测定的灵敏度和选择性^[26]。

然而,目前研究报道的双波长法多采用单标溶液绘制标曲^[23],但待测样品中同时含有 A_m 和 A_p 的混合组分,因此单标溶液做标曲是否合理需进一步验证,而单波长法通常采用混标溶液配制标曲,溶液本身可扣除相应支链淀粉的影响,具有一定的合理性^[27]。这两种测定方法和原理不同,对同一样品中 A_m 和 A_p 的测定可能给出不同的值^[28]。因此需要详细地考察单标溶液和混标溶液,单波长法和双波长法对测定结果的影响,以筛选出最佳测定 A_m 和 A_p 含量的方法。另外,相关文献报道大多集中于木薯、玉米、糯米粉等的测定^[29],而测定高粱的相关报道较少。因此,本文以高粱样品为主要测定对象,通过单波长混标法(I)、双波长单标法(II)、双波长混标法(III)三种方法进行检出限、定量限、精密度的方法探讨,并对高粱样品处理过程中分散剂(NaOH、KOH)进行比较,对高粱糊化温度、糊化时间、乙酸和盐酸 pH 调节剂、碘试剂用量和显色时间等因素进行考察,进而筛选出适宜测定酿酒高粱中 A_m 和 A_p 测定的最佳方法,以期酿酒原料的测定方法改进提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

直链淀粉 A_m (马铃薯, A8160)、支链淀粉 A_p (玉米, A8150) 标准品, Solarbio 公司;氢氧化钠、氢氧化钾、乙酸 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;碘 分析纯,天津市科密欧试剂有限公司;碘化钾 分析纯,天津市光复科技发展有限公司;高粱籽粒购自市场。

TU-1810 型双波长紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; Seven Excellence 型 pH 计 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 A_m 标准溶液(1 mg/mL): 取烘干($55\sim 56^\circ\text{C}$ 真空干燥)的马铃薯 A_m 纯品,称取

重量相当于含 0.1000 g 淀粉,放入 100 mL 容量瓶中,加入 1 mL 无水乙醇湿润样品,再加 9 mL 的 1 mol/L 的 NaOH 溶液,于沸水浴分散 10 min,迅速冷却后,用水定容;Ap 标准溶液(1 mg/mL):选择与待测谷物样品相应的蜡质谷物标准品,称取重量相当于含 0.1000 g 淀粉,放入 100 mL 容量瓶中,加 1 mL 无水乙醇,再加 9 mL 的 1 mol/L 的 NaOH 溶液,于沸水浴中加热 10 min,迅速冷却后,用水定容。

1.2.2 标准曲线的绘制 用 50 mL 容量瓶配制三种测定方法的标准溶液,其中单波长混标法(方法 I)参考 GB 7648-1987 绘制 Am 的标准曲线;双波长单标法(方法 II)参考 DB 32/T 2265-2012 中 7.2 绘制单标溶液的双波长 Am、Ap 的标准曲线;双波长混标法(方法 III)按照 St 含量一定,Am 和 Ap 不同比例进行配制,具体用量见表 1;加入一定量 Am 和 Ap 后,加入 25 mL 蒸馏水,0.5 mL 浓度为 1 mol/L 乙酸溶液调节 pH,再加入 0.5 mL 碘试剂后用蒸馏水定容至刻度。其中单波长法的测定波长为 620 nm,双波长法通过 20 mg/L 的 Am 标准溶液和 100 mg/L 的 Ap 标准溶液进行全谱扫描得到测定波长和参比波长。

表 1 三种方法绘制标曲的 Am 和 Ap 用量
Table 1 Amounts of Am and Ap for plotting standard curves by three methods

序号	方法					
	I		II		III	
	Am(mL)	Ap(mL)	Am(mL)	Ap(mL)	Am(mL)	Ap(mL)
1	0	5.00	0.30	2.00	0	5.00
2	0.25	4.75	0.50	2.50	0.50	4.50
3	0.50	4.50	0.70	3.00	1.00	4.00
4	1.00	4.00	0.90	3.50	1.50	3.50
5	1.50	3.50	1.10	4.00	2.00	3.00
6	2.00	3.00	1.30	4.50	2.50	2.50
7	/	/	/	5.00	3.00	2.00
8	/	/	/	/	3.50	1.50

1.2.3 样品测定 按国标法(GB 7648-1987)对样品进行处理,并参考 ZBX 66027-87 粗淀粉测定方法测定样品的水分和粗淀粉含量。具体操作方法为:称取粉碎后的绝干样品 0.1000 g,加入 1.0 mL 乙醇溶液浸润样品,用 9 mL NaOH 溶液分散 10~20 min,加蒸馏水定容至 100 mL,摇匀静置溶液澄清,移取上清液 5.0 mL 至 100 mL 容量瓶中,加入 25 mL 蒸馏水,以 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 3 左右,再加入 1.0 mL 碘试剂,加蒸馏水定容至刻度,于室温静置 10 min 后,以样品空白液为对照,用 1 cm 比色皿,分别用单波长混标法(I)、双波长单标法(II)及双波长混标法(III)三种方法测定样品液吸光值,再通过标准曲线进行定量分析。结果计算:

$$W_{\text{直}} = \frac{C \times 100}{5} \times 0.1 \quad \text{式(1)}$$

$$W_{\text{总}} = W_{\text{直}} + W_{\text{支}} \quad \text{式(2)}$$

式中: $W_{\text{直}}$ 表示 0.1 g 试样中 Am 的质量, mg; 其中 $W_{\text{支}}$ 与 $W_{\text{直}}$ 计算公式相同; C 表示标准曲线查得的样品液中 Am 或 Ap 的浓度, mg/L; $W_{\text{总}}$ 表示 0.1 g 试样中 St 的质量, mg。

1.2.4 高粱样品测定条件的选择 参考 1.2.3 方法进一步对样品测定进行优化实验,主要考察: NaOH 和 KOH 分散剂、糊化温度(50、60、70、80、90 和 100 °C)、糊化时间(5、10、20、30、40、50、60 min)、1 mol/L 盐酸或乙酸溶液调节 pH、碘试剂加入量(0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、5.0 mL)和显色时间稳定性(1、3、5、10、20、30、60 min)。通过以上单因素实验,考察高粱样品中 Am、Ap 含量的最佳测定条件,同时考察三种测定方法的准确性,并对测定方法进行重复性验证,回收率测定和样品普适性验证。

1.2.5 样品准确率测定 分别移取 1 mg/mL 的 Am、Ap 标准贮备液制备三个不同浓度(其中 Am 理论测得值为 30、20、10 mg/L, Ap 理论测得值为 70、80、90 mg/L)混合样品溶液,通过三种方法验证已知浓度溶液中 Am、Ap 含量与理论值的准确率。

1.2.6 精密度、检出限、定量限的测定 称取等量的 10 份高粱样品,分别用三种方法测定样品的 Am、Ap 含量,计算得到样品的 St 含量、平均值、标准偏差(SD)、精密度(RSD)、检出限和定量限,其中,平均值、精密度通过样品的百分含量计算得到,检出限和定量限通过样品吸光度值计算得到。

1.3 数据处理

每组实验均进行三次平行实验,所有结果均以“平均值”的形式表示。数据处理软件、数据分析软件和绘图软件使用 Excel 97-2003、SPSS22.0 软件和 Origin9.0 进行处理;实验结果用 SPSS 22.0 的单因素分析(analysis of variance, ANOVA)法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

单波长混标法在 620 nm 波长处进行测定得到标准曲线,如表 2 所示,双波长法(方法 II 和 III)通过 Am 和 Ap 得到全谱扫描图,如图 1 所示,再根据原理^[24]得到 Am 最大吸收波长 $\lambda_1=635$ nm,参比波长 $\lambda_2=450$ nm, Ap 的测定波长 $\lambda_3=540$ nm,参比波长 $\lambda_4=760$ nm。按照双波长测定原理分别在 λ_{635} 、 λ_{450} 两波长下测定 $\Delta A_{\text{直}}$,在 λ_{540} 、 λ_{760} 两波长下测定 $\Delta A_{\text{支}}$,以 ΔA 为纵坐标, Am 和 Ap 浓度(mg/L)为横

表 2 三种方法测得的标准曲线

Table 2 Standard curves measured by three methods

方法	Am	Ap
I	$y=0.02x+0.1586 \quad R^2=0.9973$	/
II	$y=0.0186x-0.00254 \quad R^2=0.9999$	$y=0.01835x+0.0372 \quad R^2=0.9968$
III	$y=0.00258x+0.0385 \quad R^2=0.9963$	$y=0.00275x-0.00302 \quad R^2=0.9987$

坐标, 绘制双波长混合标曲的 A_m 、 A_p 标准曲线(见表 2), 三种测定方法所得标曲均具有良好的线性回归系数: $R^2>0.996$ 。

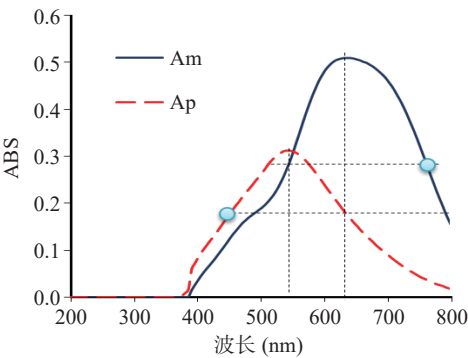


图 1 双波长法测定 A_m 、 A_p 的全谱图
Fig.1 Full spectrum of A_m and A_p determined by dual-wavelength method

2.2 方法学验证

2.2.1 配制已知浓度样品溶液验证方法准确率 结果如表 3 所示。方法 I 和方法 III 具有较高的准确率(绝对误差 $<0.5\%$), 是因为方法 I 和方法 III 均采用 A_m 和 A_p 的混合溶液进行标曲配制, 可以从溶液本身扣除部分彼此之间的吸光度值影响^[30], 其中方法 III 比方法 I 更接近 100%, 主要是因为方法 III 采用了双波长法, 在相应最大吸光波长处能更有效的扣除彼此吸光值之间的干扰^[31]。方法 II 的误差较高(7.47%), 虽然方法 II 采用双波长法测定, 也可以在彼此吸光波长处扣除吸光值的干扰, 但由于采用单标溶液配制标曲, 无法从实际溶液本身扣除干扰, 导致同浓度溶液测得的吸光度小于混标溶液的吸光度, 因此得到的样品溶液浓度偏高, 淀粉含量高于实际值。

表 3 三种方法测定标准样品的准确性分析

Table 3 Accuracy analysis of standard samples determined by three methods

配制样品	方法I (mg/L)	准确率 (%)	方法II (mg/L)	准确率 (%)	方法III (mg/L)	准确率 (%)
30% A_m	29.302	97.67	33.458	111.52	29.782	99.27
20% A_m	19.677	98.39	23.193	115.97	19.936	99.68
10% A_m	10.339	103.39	12.283	122.83	10.021	100.21
70% A_p	70.698	100.98	67.28	96.11	70.056	100.08
80% A_p	80.323	100.40	78.553	98.19	80.015	100.02
90% A_p	89.661	99.62	90.189	100.21	89.948	99.94
平均值	/	100.08	/	107.47	/	99.87
误差(%)	/	0.08	/	7.47	/	-0.13

2.2.2 精密度、检出限和定量限 结果如表 4 所示, 几种测定方法的变异系数均小于 8%, 说明三种测定方法均具有较高的准确度和精密度。通过公式计算检出限和定量限(公式(3)、公式(4)), 发现三种测定方法对于 A_m 的检出限均 ≤ 0.55 mg/L, 而 A_p 在高粱中含量较高, 因此检出限也比 A_m 高, $A_p \leq 2.75$ mg/L, 定量限: A_m 均 ≤ 1.65 mg/L, A_p 均 ≤ 8.33 mg/L, 均符合实际高粱样品的测定需求。因此, 高粱样品的精密

度、检出限和定量限均符合样品中淀粉含量的检测要求。进一步通过酸水解滴定法测得高粱的粗淀粉含量为 64.1%, 与三种测定方法得到的 St 含量进行对比, 其中方法 I 只能测定 A_m 的含量, 具有局限性, 无法与实际粗淀粉含量进行比较, 表 4 中方法 II 得到的 St 含量高于实际淀粉含量 20% 左右, 而方法 III 得到的 St 含量与之接近, 说明方法 III 测定结果更符合实际值, 但方法 III 得到的 St 含量差异较大, 标准偏差 SD 为 3.68, 因此需要对实验方法进行优化, 提高方法的准确率和精密度。

表 4 三种方法对 10 份高粱样品淀粉含量的测定比较(%)

Table 4 Comparison of starch content of 10 sorghum samples determined by three methods (%)

序号	方法I			方法II			方法III		
	A_m	A_p	St	A_m	A_p	St	A_m	A_p	St
1	12.83	87.17	100	16.05	83.95	93.58	22.73	77.27	66.09
2	13.43	86.57	100	15.61	84.39	94.82	19.57	80.43	75.64
3	13.23	86.77	100	12.62	87.38	95.73	17.69	82.31	68.27
4	13.13	86.87	100	15.57	84.43	90.49	21.81	78.19	62.89
5	12.83	87.17	100	15.49	84.51	95.55	21.80	78.20	67.89
6	12.83	87.17	100	15.73	84.27	94.09	22.31	77.69	66.34
7	12.53	87.47	100	15.54	84.46	93.87	22.06	77.94	66.13
8	12.63	87.37	100	15.14	84.86	93.44	21.54	78.46	65.69
9	13.23	86.77	100	13.89	86.11	86.17	19.28	80.72	62.09
10	13.03	86.97	100	16.53	83.47	88.89	22.25	77.75	66.03
平均值	12.97	87.03	100	15.22	84.78	92.66	21.10	78.90	66.71
SD	0.29	0.29	0.00	1.14	1.14	3.13	1.66	1.66	3.68
RSD	2.22	0.33	0.00	7.48	1.34	3.38	7.87	2.11	5.52
检出限(mg/L)	0.49	/	/	0.55	2.75	/	0.53	2.35	/
定量限(mg/L)	1.47	/	/	1.65	8.33	/	1.61	7.13	/

注: A_m 和 A_p 表示占淀粉总量的百分比; St 表示占试样的百分比; 表9同。

检出限和定量限的计算公式:

检出限 = $3.3\delta/S$ 式 (3)

定量限 = $10\delta/S$ 式 (4)

式中: δ 表示 10 份样品空白显色液吸光值的标准偏差; S 表示 A_m 、 A_p 标准曲线的斜率, 斜率的具体数值即对应表 1 中标曲方程中的斜率。

进一步以高粱样品的单因素优化实验考察高粱样品中 A_m 、 A_p 含量的最佳测定条件, 同时考察三种测定方法的准确性, 并对方法进行重复性验证, 回收率测定和样品普适性验证。

2.3 测定高粱样品的优化实验

2.3.1 NaOH 和 KOH 对高粱样品中 A_m 、 A_p 含量的影响 单波长和双波长的测定方法中均包括碱分散样品的步骤, 充分分散样品有利于淀粉溶液的均一性, 最常用的就是 NaOH 溶液, 也有研究提出 KOH 具有更高的分散性^[28]。因此通过实验对比, 考察 KOH 和 NaOH 对高粱淀粉的分散效果。显色结果如图 2 所示, KOH 分散的高粱样品与碘试剂络合显色后, 颜色偏紫, NaOH 分散的样品则颜色偏蓝, 进一步通过三种方法测量 A_m 、 A_p 的含量进行对比, 结果如表 5 所示, 发现 NaOH 分散的样品中 A_m 含量在 15.54%~

16.90% 之间, 而 KOH 分散的样品中, Am 含量仅为 3.75%~6.25%, 两种分散剂测定结果相差较大, 对比文献 [32] 发现 NaOH 分散得到的值更符合理论结果, 与多种仪器方法检测结果一致; 而 KOH 具有更强的碱性, 导致溶液 pH 过高, 虽然对 Ap 分散效果更好(得到的 Ap 含量更高, 见表 5), 但双波长法测定同时含有 Am 和 Ap 的混合样品, 需扣除 Am 和 Ap 之间的干扰, 而 KOH 分散得到的 Am 含量过低, 不符合高粱中 Am/Ap 的正常比例。如果是单一的支链淀粉溶液, 则选用 KOH 能达到更好的分散效果 [33], 但本文中高粱籽粒的测定则选用 NaOH 做分散剂更符合实际结果。



图 2 KOH(左)和 NaOH(右)分散高粱溶液与碘络合后的颜色

Fig.2 Color of KOH (left) and NaOH (right) dispersed sorghum solution complexed with iodine

表 5 NaOH 和 KOH 分散高粱样品测定 Am, Ap 的含量
Table 5 Determination of Am and Ap in NaOH and KOH dispersed sorghum sample

方法	分散剂种类			
	NaOH		KOH	
	Am(%)	Ap(%)	Am(%)	Ap(%)
方法I	15.54	84.46	6.24	93.76
方法II	16.90	83.10	3.75	96.25
方法III	15.75	84.25	6.25	93.75

2.3.2 糊化温度对高粱样品吸光度/St 含量的影响

通过考察高粱样品在不同糊化温度 50、60、70、80、90 和 100 °C 得到的吸光度值(或 St 含量), 考察高粱样品的最佳糊化温度。由图 3 可见, 方法 I(图 3a)高粱样品在 70 °C 时吸光度值最高, 但在双波长法(图 3b、图 3c)的吸光度-糊化温度图中判断不出最佳温度, 是因为 Am 与 Ap 呈现相反的吸光度关系, 彼此需要扣除吸光度的影响, 当 Am 含量高时, Ap 的吸光度则较低 [32]。但通过双波长法糊化温度-St 含量关系图(图 3d、图 3e)可以明显看出糊化温度在 70 °C 时具有最高的 St 含量, 综合考虑, 70 °C 为最佳糊化温度。

2.3.3 糊化时间对高粱样品吸光度值的影响 通过考察高粱样品的糊化时间在 5、10、20、30、40、50、60 min 时测定的吸光度值, 得到高粱样品的最佳糊化时间。由图 4 可见, 通过方法 I(图 4a)可以明显看

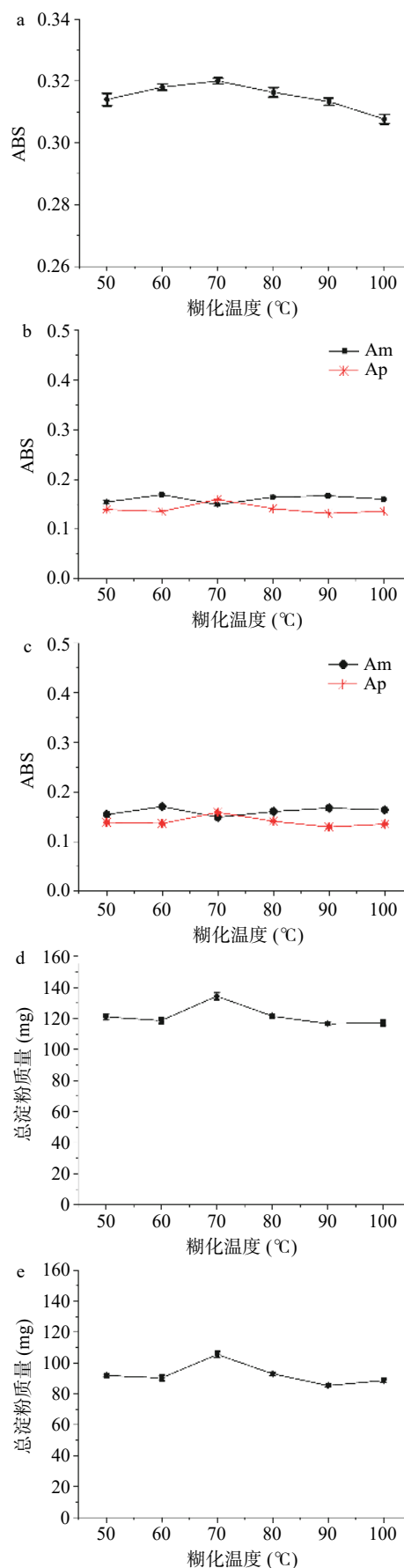


图 3 糊化温度对吸光度/St 含量的影响

Fig.3 Influence of gelatinization temperature on absorbance/total starch content

注: a: 方法 I; b: 方法 II; c: 方法 III; d: 方法 II-St 质量; e: 方法 III-St 质量。

出高粱样品在糊化 10~20 min 时具有稳定且较高的吸光度值,双波长法中(图 4b、图 4c)Am 在 10~30 min 时呈现增长趋势,30 min 时具有最佳吸光度值,Ap 在 10~20 min 时较为稳定。综合考虑,高粱淀粉的糊化时间在 10~20 min 最佳。

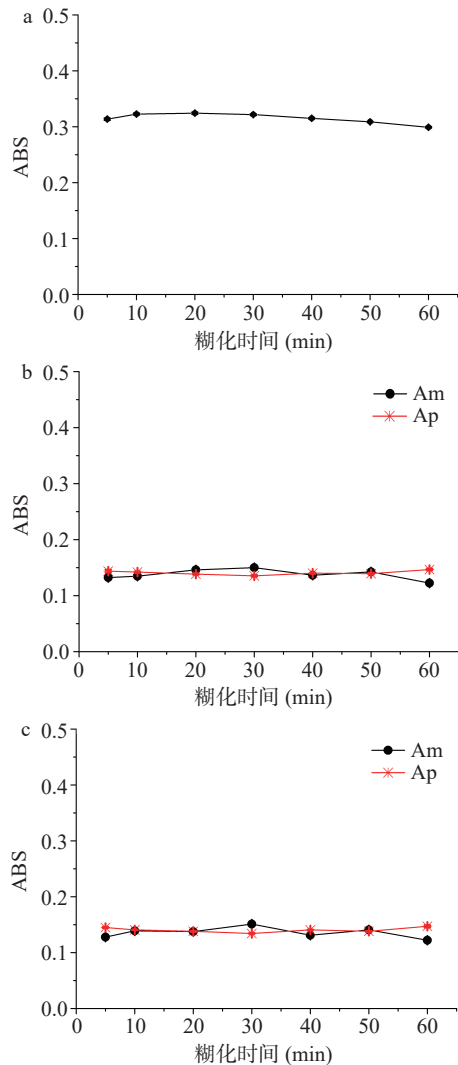


图 4 糊化时间对高粱淀粉吸光度值的影响
Fig.4 Effect of gelatinization time on absorbance value of sorghum starch
注: a: 方法 I; b: 方法 II; c: 方法 III; 图 5、图 6 同。

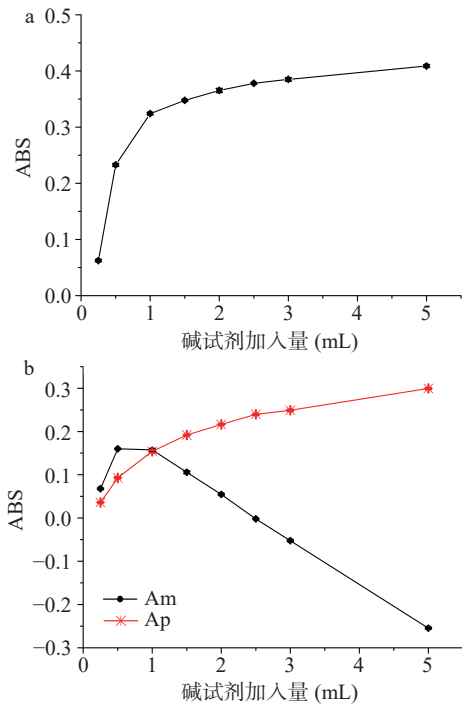
2.3.4 乙酸和盐酸调节溶液 pH 对高粱样品吸光度值的影响 常用于调节溶液 pH 的有盐酸和乙酸两种,如江苏省地标方法(DB32/T 2265-2012)中采用盐酸溶液调节样品的 pH, 国标方法(GB 7648-1987)中采用乙酸用于样品溶液 pH 的调节。本文通过乙酸和盐酸两种方式调节溶液的 pH, 并测定相应溶液的吸光度,考察乙酸和盐酸对高粱样品显色的影响。结果如表 6 所示,GB 7648-1987 法中用乙酸 1 mL(1 mol/L)测得高粱样品的 pH 为 4.65,DB32/T 2265-2012 法给出用盐酸调节 pH 至 3,发现加入 0.5 mL(1 mol/L)的盐酸可达到 pH=3.78;进一步加大乙酸的用量,直到加入量为 4.0 mL 时,得到与以上盐酸相接近的 pH,通过对乙酸(1 mol/L, 1 mL;pH=4.65),乙酸(1 mol/L,

4 mL;pH=3.84)和盐酸(1 mol/L, 0.5 mL;pH=3.78)进行吸光度的对比,发现 pH 相接近的样品溶液,在相同测定方法下测定的吸光度值基本相同,说明乙酸和盐酸仅起到调节溶液 pH 的作用,试剂本身不会对样品产生影响,而尽管 pH=4.65 与 pH 接近 3 时测定的结果值略有不同,但也在误差范围内($\Delta A < 0.01$),因此,只要溶液为弱酸性(pH=3~5),pH 的确切值并不影响测定含量。

表 6 溶液 pH 对吸光度值的影响
Table 6 Influence of solution pH value on absorbance value

名称	pH	方法I	方法II (Am)	方法II (Ap)	方法III (Am)	方法III (Ap)
参比溶液	3.27	0	0	0	0	0
样品溶液	11.65	/	/	/	/	/
乙酸(1 mL, 1 mol/L)	4.65	0.337	0.170	0.164	0.171	0.164
乙酸(4 mL, 1 mol/L)	3.84	0.340	0.163	0.172	0.163	0.172
盐酸(0.5 mL, 1 mol/L)	3.78	0.339	0.163	0.171	0.163	0.169

2.3.5 碘试剂加入量对高粱样品吸光度值的影响 通过考察碘试剂用量(0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、5.0 mL)对高粱淀粉与碘络合的吸光度值变化,得到最佳碘试剂用量。结果如图 5 所示,方法 I(图 5a)中随着碘试剂的加入量增加,吸光度值也增加,这是因为碘试剂本身具有颜色,因此无法从单波长法判断出碘试剂用量的最佳值^[34-35];双波长法(图 5b、图 5c)中,随着碘试剂加入量的增加,Ap 的含量随之增加,而 Am 的含量在碘试剂用量大于 1.0 mL 之后出现下降趋势,甚至降低为负值,这与 1943 年 Bates 等^[36]给出的结论一致,同时采用标准碘化物浓度,可防止由三碘化物的形成而使碘化物浓度发生明显的变化。图 5b 和图 5c 中当碘试剂用量在 0.25~1.0 mL 时,Am 和 Ap 均呈现吸光度增加的趋势,其中在 1.0 mL



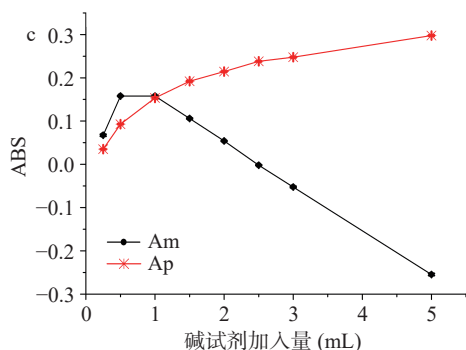


图5 碘试剂用量对高粱淀粉吸光度值的影响

Fig.5 Effect of iodine reagent dosage on absorbance values of sorghum starch

时, Am 和 Ap 的吸光度值均较高, 因此选择 1.0 mL 碘试剂用量作为最佳显色剂用量。

2.3.6 显色时间对高粱样品吸光度值的影响 通过考察显色时间(1、3、5、10、20、30、60 min)与吸光度值的变化, 得到稳定且最佳的样品测定时间。结果如图 6 所示, 由方法 I(图 6a)可以判断显色时间在 10~30 min 内, 吸光度值最大, 较为稳定, 30 min 后吸

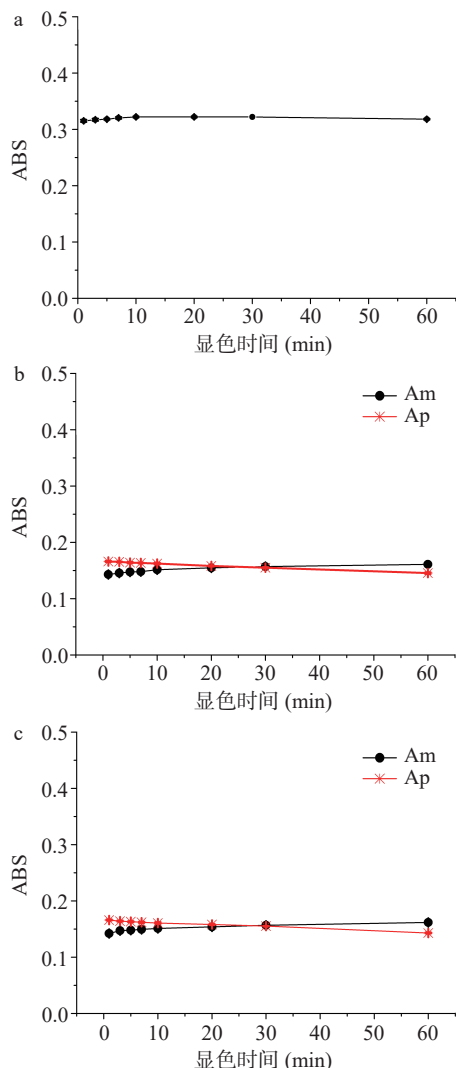


图6 显色时间对高粱淀粉吸光度值的影响

Fig.6 Influence of color development time on absorbance value of sorghum starch

光度值下降。方法 II(图 6b)、III(图 6c)中 Ap 在 10~30 min 较为稳定, Am 在 20~30 min 内较为稳定, 综合考虑, 显色时间在 20~30 min 时比较稳定。

综上所述, 得到最佳测定条件是: 用 NaOH 溶液分散高粱样品 10~20 min, 加 1 mol/L 乙酸或盐酸溶液调节 pH 至 3 左右, 采用 1.0 mL 标准碘试剂, 显色 20~30 min 进行测定, 同时由于方法 III 具有与实际 St 含量相接近的值, 因此更适于实际样品中淀粉含量的测定。

需要注意的是: a: 样品粉碎程度不同, 测定的结果也不同, 因此需要充分粉碎研磨样品, 并对样品进行筛分, 以保证测定的结果具有较好的平行性; b: 样品中含有水分或有吸潮的现象也会影响测定结果的准确性, 因此需要对样品进行烘干处理, 称取绝干样品, 而烘干温度和时间对样品的测定结果影响很大, 因此需要保证样品的烘干温度和时间固定, 建议低温长时间烘干(50~60 ℃ 烘干 3 h); c: 加乙醇和氢氧化钠分散液时, 轻摇瓶底, 缓慢加入液体, 以保证充分分散样品, 不粘黏在瓶底或壁上。

2.4 重复性验证

选取三个不同厂家的高粱对方法 III 进行 3 次重复性测定, 每个样品称取 3 个平行样, 结果如表 7 所示, 三个样品在不同时期测定的 Am 和 Ap 含量之间的差值小于 2%, St 的测定结果小于 5%, 因此样品的测定具有可重复性。

表7 高粱样品中淀粉含量的重复性测定

Table 7 Repeatability of starch content in sorghum samples

样品名称	重复次数	Am(mg)	Ap(mg)	St(mg)	Ap/Am
1号样	1	12.19±0.28	55.42±0.76	67.6±0.47	4.55±0.33
	2	10.88±0.47	60.07±0.54	70.95±0.63	5.52±0.58
	3	10.99±0.35	56.97±0.38	67.95±0.57	5.18±0.40
2号样	1	12.84±0.23	67.82±0.47	80.66±0.55	5.28±0.26
	2	12.08±0.15	68.59±0.59	80.89±0.62	5.68±0.24
	3	12.3±0.18	62.39±0.39	74.47±0.73	5.07±0.21
3号样	1	13.28±0.32	65.49±0.44	78.77±0.58	4.93±0.30
	2	12.19±0.44	71.69±0.56	83.88±0.25	5.88±0.52
	3	12.30±0.37	71.62±0.63	83.92±0.31	5.82±0.45

2.5 回收率验证

通过方法 III 测定样品的加标回收率, 在已测得 Am 和 Ap 含量的高粱样品中, 分别添加一定浓度的 Am 和 Ap 标准品溶液, 测定其含量, 求得回收率, 结果见表 8。回收率实验表明, Am 和 Ap 的回收率在 80%~120% 之间, 符合样品测定要求, 具有较高的准确性。

2.6 测定酿酒常用谷物

选择酿酒常用谷物(高粱、小麦、玉米、大米)进行样品普适性测定, 首先称取磨碎筛分后的 0.1000 g 的谷物样品, 再按照上述优化后的测定方法进行分散测定, 得到结果如表 9 所示。高粱中 Am 含量 14.01%, Ap 含量 85.99% 与文献 [37] 结果相符, 小麦的 Am 含量为 18.85%, Ap 含量为 81.15%, St 含量为 63.51%,

表 8 高粱样品的加标回收率验证

Table 8 Verification of spiked recovery rate of sorghum samples

样品	加入量(mg/L)	实测值(mg/L)	回收率(%)
Am	0.25	0.271	108.40
	1.0	0.872	87.20
	6.0	5.443	90.72
	3.5	3.871	110.60
Ap	20	19.745	98.73
	70	69.253	98.93

这与文献 [38] 给出的 St 含量 65% 左右相符合, 玉米中 Am 占 12.14%, Ap 占 87.86%, 与普通玉米中 Ap 含量 80%~90% 结果相符合, 大米中 Am 含量 15.43% 与文献给出的 12%~19% 结果相符合^[39]。因此方法 III 可以测得常见谷物样品中 Am、Ap 和 St 的含量, 具有普适性。

表 9 不同谷物样品中 Am、Ap 和 St 含量

Table 9 Am, Ap and total starch contents in different grain samples

样品	Am(%)	Ap(%)	St(%)	Ap/Am
高粱	14.01±0.42	85.99±0.18	69.86±0.47	6.14±0.32
小麦	18.85±0.29	81.15±0.32	63.51±0.26	4.31±0.25
玉米	12.14±0.46	87.86±0.42	83.36±0.39	7.24±0.35
大米	15.43±0.28	84.57±0.52	93.75±0.27	5.48±0.44

3 结论

高粱中直链淀粉(Amylose, Am)和支链淀粉(Amylopectin, Ap)含量与白酒的产量和质量息息相关,但现有的检测方法对同一样品的测定结果可能不同。本文通过详实的实验数据比较了基于碘比色法测定高粱中 Am、Ap 含量的三种方法(方法 I: 单波长混标法、方法 II: 双波长单标法、方法 III: 双波长混标法),结果发现,三种方法的检出限和定量限均能满足实际样品的测定范围需求,其中检出限: Am 均 ≤ 0.55 mg/L, Ap 均 ≤ 2.75 mg/L, 定量限: Am 均 ≤ 1.65 mg/L, Ap 均 ≤ 8.33 mg/L; 样品准确率实验发现,混标溶液标曲得到的误差绝对值较小(0.13%),但单标溶液标曲误差较大(7.47%),因此需要选用混标溶液配制标曲;进一步采用三种方法对高粱样品的测定条件进行优化,结果为:用 NaOH 作分散剂,70 ℃糊化 10~20 min,以乙酸或盐酸为 pH 剂,加入 1.0 mL 碘试剂,显色 20~30 min 内为高粱样品的最佳测定条件,并通过测定 Am、Ap 含量得到总淀粉含量与实际粗淀粉含量相比较,发现方法 III 得到的值更接近理论结果,该方法也具有较好的可重复性和回收率(80%~120%),因此方法 III 更适用于实际样品的测定,通过方法 III 测定常见谷物样品中 Am、Ap 及 St 含量,测定结果与文献值相符,具有普适性。本文提供了选用碘比色双波长混标法的实验和理论依据,但该方法仅对高粱样品进行测定优化,其他具体的谷物样品还需具体的实验分析;未来还需深入探明淀粉的

特性和客观因素的干扰,以得出更系统的结论。

参考文献

- [1] PAIANO V, BIANCHI G, DAVOLI E, et al. Risk assessment for the Italian population of acetaldehyde in alcoholic and non-alcoholic beverages[J]. *Food Chemistry*, 2014, 154: 26–31.
- [2] 毛祥, 温雪瓶, 黄丹, 等. 5 种常用酿酒高粱的主要成分及淀粉特性差异分析[J]. *中国酿造*, 2020, 39(3): 57–62. [MAO X, WEN X P, HUANG D, et al. Difference analysis on main components and starch properties in five commonly used liquor-making sorghum[J]. *China Brewing*, 2020, 39(3): 57–62.]
- [3] NNAMCHI C I, OKOLO B N, MONEKE A N. Grain and malt quality properties of some improved Nigerian sorghum varieties[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2014, 120: 353–359.
- [4] SINGH H, SODHI N S, DHILLON B, et al. Physicochemical and structural characteristics of sorghum starch as affected by acid-ethanol hydrolysis[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2021, 15(3): 2377–2385.
- [5] LONDONO-RESTREPO S M, RINCON-LONDONO N, CONTRERAS-PADILLA M, et al. Morphological, structural, thermal, compositional, vibrational, and pasting characterization of white, yellow, and purple Arracacha Lego-like starches and flours (*Arracacia xanthorrhiza*)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113: 1188–1197.
- [6] ESPITIA-HERNÁNDEZ P, CHAVEZ GONZALEZ M L, AS-CACIO-VALDÉS J A, et al. Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) as a potential source of bioactive substances and their biological properties[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(8): 2269–2280.
- [7] JAISWAL S, BANSIRAR A, SINGH A, et al. Diversity in grain and wax characteristics of twelve cultivars of Indian sorghum[J]. *Materials Today: Proceedings*, 2022, 57: 1933–1937.
- [8] SOE HTET M N, WANG H, TIAN L, et al. Integrated starches and physicochemical characterization of sorghum cultivars for an efficient and sustainable intercropping model[J]. *Plants*, 2022, 11(12): 1574.
- [9] 曹文伯. 高粱与酿酒[J]. *酿酒*, 1999(1): 20–21. [CAO W B. Sorghum and winemaking[J]. *Liquor Making*, 1999(1): 20–21.]
- [10] ZHU Y, CUI B, YUAN C, et al. A new separation approach of amylose fraction from gelatinized high amylose corn starch[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 131: 107759.
- [11] JUNG S J, SONG Y B, PARK C S, et al. Different physicochemical properties of entirely α -glucan-coated starch from various botanical sources[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2022, 31(9): 1179–1188.
- [12] NIETO-ORTEGA B, ARROYO J J, WALK C, et al. Near infrared reflectance spectroscopy as a tool to predict non-starch polysaccharide composition and starch digestibility profiles in common monogastric cereal feed ingredients[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2022, 285: 115214.
- [13] 叶沁, 赵紫薇, 徐明雅, 等. 基于中红外漫反射光谱技术测定精米中直链淀粉含量的研究[J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(2): 115–119, 127. [YE Q, ZHAO Z W, XU M Y, et al. Amylose content detection in polished rice based on diffuse reflectance fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2018, 33(2): 115–119, 127.]
- [14] 吴玉萍, 高云才, 徐昭梅, 等. 连续流动法测定新鲜烟叶中的直链淀粉和支链淀粉[J]. *云南大学学报*, 2018, 40(2): 315–320. [WU Y P, GAO Y C, XU Z M, et al. Determination of amylose

- and amylopectin of fresh tobacco by continuous flow method[J]. *Journal of Yunnan University*, 2018, 40(2): 315–320.]
- [15] DHIR A, KAUR C, DEVI V, et al. A rapid single kernel screening method for preliminary estimation of amylose in maize [J]. *Food Analytical Methods*, 2022, 15: 2163–2171.
- [16] YU M, LIU B, ZHONG F, et al. Interactions between caffeic acid and corn starch with varying amylose content and their effects on starch digestion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 114: 106544.
- [17] BUTARDO V M, SREENIVASULU N, JULIANO B O. Improving rice grain quality: State-of-the-art and future prospects[J]. *Rice Grain Quality*, 2019, 1892: 19–55.
- [18] HUANG J, WANG Z, FAN L, et al. A review of wheat starch analyses: Methods, techniques, structure and function[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 203: 130–142.
- [19] CHAVAN P, SINHMAR A, NEHRA M, et al. Impact on various properties of native starch after synthesis of starch nanoparticles: A review[J]. *Food Chemistry*, 2021, 364: 130416.
- [20] MCCREADY R M, HASSID W Z. The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1943, 65(6): 1154–1157.
- [21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 15683-2008 大米直链淀粉含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [The State General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, PRC. GB/T 15683-2008 Determination of amylose content in rice[S]. Beijing: China Standards Press, 2008.]
- [22] 中华人民共和国农牧渔业部. GB 7648-1987 水稻、玉米、谷子籽粒直链淀粉测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987. [Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fisheries of the Peoples Republic of China. GB 7648-1987 Determination of amylose in grains of rice, maize and millet[S]. Beijing: Standards Press of China, 1987.]
- [23] 江苏省质量技术监督局. DB 32/T 2265-2012 鲜食玉米中直链淀粉和支链淀粉含量的测定双波长分光光度法[S]. 江苏: 江苏省地方标准出版社, 2012. [Jiangsu Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision. DB 32/T 2265-2012 Determination of amylose and amylopectin content in fresh maize by dual wavelength spectrophotometry[S]. Jiangsu: Jiangsu Local Standards Press, 2012.]
- [24] REDDAPPA S B, CHHABRA R, TALUKDER Z A, et al. Development and validation of rapid and cost-effective protocol for estimation of amylose and amylopectin in maize kernels[J]. *3 Biotech*, 2022, 12(3): 1–8.
- [25] SHAO Y, ZHU D, YU J, et al. Development of certified reference materials for the determination of apparent amylose content in rice[J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4647.
- [26] SONG Y H, SHI W L, ZHANG J, et al. Development and application of an efficient method for the amylose/amylopectin ratio determination in potato tubers[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(3): 600.
- [27] OKPALA N E, ALORYI K D, AN T, et al. The roles of starch branching enzymes and starch synthase in the biosynthesis of amylose in rice[J]. *Journal of Cereal Science*, 2022, 104: 103393.
- [28] DÍAZ E O, KAWAMURA S, ISHIZU H, et al. Non-destructive assessment of amylose content in rice using a quality inspection system at grain elevators[J]. *Food Chemistry*, 2022, 379: 132144.
- [29] 焦梦悦, 高涵, 王伟娜, 等. 四种测定直链淀粉和支链淀粉方法的比较[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(12): 259–264. [JIAO M Y, GAO H, WANG W N, et al. Comparison of four methods for the determination of amylose and amylopectin[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(12): 259–264.]
- [30] WANG J P, LI Y, TIAN Y Q, et al. A novel triple-wave-length colorimetric method for measuring amylose and amylopectin contents[J]. *Starch-Stärke*, 2010, 62(10): 508–516.
- [31] ZHU T, JACKSON D S, WEHLING R L, et al. Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique[J]. *Cereal Chemistry*, 2008, 85(1): 51–58.
- [32] ZHU F. Structure, physicochemical properties, modifications, and uses of sorghum starch[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, 13(4): 597–610.
- [33] 何洁, 闫飞燕, 黄芳, 等. 双波长法测定薯芋类农产品中直链淀粉和支链淀粉的含量[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(7): 303–309.
- [HE J, YAN F, HUANG F, et al. Determination of amylose and amylopectin contents in yam and taros by dual-wavelength spectrophotometry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(7): 303–309.]
- [34] VAINIO K A. Determination of starch by iodine colorimetry[J]. *Agricultural and Food Science*, 1968, 40(2): 60–66.
- [35] JARVIS C E, WALKER J R L. Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1993, 63(1): 53–57.
- [36] BATES F L, FRENCH D, RUNDLE R E. Amylose and amylopectin content of starches determined by their iodine complex formation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1943, 65(2): 142–148.
- [37] 蒋兰. 酿酒高粱淀粉含量测定及性质研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2013. [JIANG L. Determination of starch content and properties of brewing sorghum[D]. Chongqing: Chongqing University, 2013.]
- [38] 项丰娟, 苏磊, 张秀南, 等. 小麦淀粉的研究现状[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(16): 212–219. [XIANG F J, SU L, ZHANG X N, et al. Research status of wheat starch[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(16): 212–219.]
- [39] 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, 42(3): 24–26. [ZHAI J L, HE R. Comparison of methods for determination of amylose content in rice[J]. *Grain Processing*, 2017, 42(3): 24–26.]