

重力场流分离等技术对 5 种药用淀粉的分离和表征

高也, 梁启慧, 宋宇, 邹悦, 舒琳, 韩南银* (北京大学药学院, 北京 100191)

摘要:目的 研究 5 种药用淀粉的大小颗粒数目比、颗粒形态、结晶结构和支链淀粉、直链淀粉比例。方法 利用重力场流分离技术(GrFFF)分离表征 5 种淀粉,并计算大小颗粒数目比。利用光学显微镜(OM)和扫描电镜(SEM)表征形态学特征,傅立叶红外光谱(FT-IR)和 X-射线衍射(X-ray)得到结晶结构和结晶度,双波长方法测定直链淀粉和支链淀粉的比例。结果 5 种淀粉的大小颗粒数目比存在明显差异;颗粒大小差异明显,形态不同;不同种类淀粉的有序和无定形结构的比例变化趋势和其相对结晶度的变化一致;支链淀粉含量越高,直链/支链淀粉比例越低,结晶度越好。结论 GrFFF 能够分离表征淀粉颗粒且能粗略计算大小颗粒数目比,GrFFF 和 OM、SEM 和 LDSA 的表征结果具有一致性。

关键词:重力场流分离技术;形态学表征;结晶度;直链淀粉;支链淀粉

doi:10.11669/cpj.2019.04.010 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)04-0312-09

Separation and Characterization of Five Kinds of Medicinal Starches by Gravitational Field-Flow Fractionation (GrFFF)

GAO Ye, LIANG Qi-hui, SONG Yu, ZOU Yue, SHU Lin, HAN Nan-yin* (School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To study the large/small granule number ratio, granule morphology, crystal structure, amylopectin and amylose ratio of five kinds of medicinal starches. **METHODS** Five kinds of medicinal starches were separated and characterized by self-assembled gravitational field-flow fractionation (GrFFF) instrument and the proportion of large and small starch granules was calculated according to the results. Optical microscopy and scanning electron microscopy were applied to characterize the morphological property of starch. FT-IR and X-ray diffraction were used to obtain the starch crystalline structure and crystallinity. The contents of amylose and amylopectin were determinate by double wavelength method. **RESULTS** The large/small granule number ratios of the five kinds of medicinal starches had obvious difference. The size difference was obvious and the shape was different. The change trends of the order and the amorphous structure of different kinds of starches were the same as that of its relative crystallinity; the higher the amylopectin content, the lower the amylopectin/amylopectin was, the better the crystallinity was. **CONCLUSION** GrFFF can be used to characterize and separate large and small starch granules, and the results are in agreement with that of other methods.

KEY WORDS: gravitational field-flow fractionation (GrFFF); morphological characterization; crystallinity; amylose; amylopectin

重力场流分离(GrFFF)是场流分离技术的一个分支,也是场流分离技术中设备最简单的一种分离技术。该技术利用重力场为外力场,可用于分离粒径在几微米到几百微米的颗粒^[1]。微米级的颗粒在重力场流保持空间或者超层洗脱模式,即大粒径的颗粒先于小粒径的颗粒洗脱,并基于保留时间等指标可表征颗粒尺寸信息。GrFFF 因操作简单、成本低、分析时间短和条件温和等特点,目前已应用于分离淀粉颗粒^[2-7]。淀粉含 2 种粒径的淀粉颗粒,粒径 10~100 μm 的大淀粉颗粒(称为 A 颗粒)和粒径小于 10 μm 的小淀粉颗粒(称为 B 颗粒),且淀粉

A、B 颗粒比会影响淀粉的性质^[8]。天然淀粉根据来源的不同其颗粒结构,分子结构和结晶结构显著不同。对于颗粒结构,光学显微镜(OM)、扫描电镜(SEM)、透射电镜(TEM),粒度仪(LDSA)是常规观察淀粉颗粒形态、尺寸及尺寸分布的方法^[9]。对于分子结构,淀粉分子是由直链淀粉分子和支链淀粉分子组成,两者的含量和比例与淀粉的结构和性能如老化,糊化,流变学性能等有关^[10-13]。双波长紫外可见分光光度法作为一种 2 种淀粉含量的快速测定方法通常应用于淀粉的开发利用研究^[14]。对于结晶结构,淀粉颗粒具有结晶和无定形 2 种结构,结

作者简介:高也,女,硕士研究生 研究方向:重力场流分离技术的开发与应用
和新方法的开发与应用研究,毛细管电色谱对手性药物的拆分研究及中药分析

* 通讯作者:韩南银,男,教授 研究方向:药物分析新仪器
Tel:13911353094 E-mail:nanyin.han@pku.edu.cn

晶状态的分析是研究淀粉的结构变化一个重要的理论依据^[15]。粉末 X-射线衍射分析是最常见的分析淀粉结晶结构和程度的方法。

邱百灵等^[16]利用自组装加工的重力场流分离仪器分离 3 种不同粒径的聚苯乙烯颗粒,并通过均匀设计优化分离条件,以分离度和保留比为评价指标,实现了 3 种颗粒的完全分离,结果表明,该系统具有良好的分离性能。本实验利用自组装的重力场流系统分离表征 5 种不同的药用淀粉,并根据 GrFFF 的结果计算 A、B 颗粒的比例。除此之外,为了更好的比较不同淀粉的性质差异,还从淀粉的颗粒形态学结构、尺寸分布、结晶结构、基团信息和支链淀粉和直链淀粉含量比例 5 个方面详细阐述了淀粉的性质和结构,系统探讨了不同来源淀粉的结构与特性之间的差异。结果表明,GrFFF 具有分离表征淀粉 A、B 颗粒的能力,并且可以根据峰面积粗略计算其比例。GrFFF 和其他手段表征淀粉的结果对其在药用工业上的应用有一定参考意义。

1 仪器与试剂

L600 - DP 单塞泵、L600 - UV6 可变波长紫外检测器、LC Win2.0 工作站(北京普析通用仪器有限公司);100 μL 微量进样器(美国 Hamilton 公司);FA2104 天平(上海恒平电子公司);涡旋混合器(XH - C,江苏金怡仪器科技有限公司);TU - 1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用有限公司);Mastersizer 2000 型激光粒度仪(英国 Malvern 公司);Ultima IV 型 X-射线衍射仪(美国 Rigaku Raman 公司);Nicolet i5 型傅立叶变换红外光谱(美国 Thermo Fisher 科技公司);JSM - 6701F 型场发射扫描电镜(日本 JEOL 公司);实验用水为超纯水(18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$);小麦淀粉,蜡质玉米淀粉、马铃薯淀粉、豌豆淀粉、药用玉米淀粉(分析纯,98.5%,上海 Aladdin 试剂有限公司);支链淀粉标准品和直链淀粉标准品(Sigma-Aldrich 公司,99.9%)。

2 实验方法

2.1 溶液配制

样品混悬液的配制:准确称取约 30 mg 小麦、玉米、蜡质玉米、豌豆、马铃薯淀粉,超纯水配制成 3 mL,即得 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的淀粉混悬液。超声分散 20 min,浸泡 24 h,每次进样前涡旋 1 min。

淀粉标准储备液的配制:分别称取直链淀粉和支链淀粉标准品 0.100 g 于 10 mL 烧杯中,加入几

滴无水乙醇润湿,再加入 0.5 $\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaOH 溶液 10 mL,在沸水充分搅拌至完全溶解,转移至量瓶中定容得 1.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的淀粉标准储备液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

淀粉扫描液的配制:分别精密量取直链淀粉和支链淀粉标准储备液 3 mL,置 50 mL 量瓶中,精密加入 30 mL 超纯水,用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ HCl 调 pH 到 3 ~ 3.5,加入碘试剂 1.0 mL,超纯水定容得淀粉扫描液。静置 10 min 后,以加入碘试剂的酸水为空白,进行紫外可见光全波段扫描绘出淀粉吸收曲线。

淀粉标准溶液的配制:分别精密量取 1.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的直链淀粉标准储备液 0.6、1.0、1.4、2.0、2.5 和 3.0 mL 于 50 mL 量瓶中,精密加入 30 mL 超纯水,用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调 pH 到 3 ~ 3.5,加入碘试剂 1.0 mL,定容得质量浓度分别为 0.012、0.02、0.028、0.04、0.05 和 0.06 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的直链淀粉标准溶液,静置 10 min 待用;同法制得质量浓度分别为 0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18 和 0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的支链淀粉标准溶液。

2.2 重力场流分离系统

GrFFF 仪器是由本课题组自行设计及加工组装,具体方法参见文献[17]。GrFFF 仪器由高压输液泵 A 和 B、进样阀、分离通道和紫外检测器组成。其中 B 泵负责将样品载入通道,A 泵将载液泵入通道。分离通道厚度为 0.3 mm,其尺寸为(282.9 mm \times 21.5 mm,0.3 mm)。本实验分离淀粉的条件为:载液为超纯水(使用前超声 10 min 脱气),检测波长 254 nm,进样流速 0.05 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样时间 1.6 min,进样量 20 μL ,B 泵进样后关闭泵,停流 1.0 min 后开启 A 泵进行洗脱,载液流速为 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,洗脱程序参见表 1。

2.3 光学显微镜表征

准确称取 3.0 g 的不同种类淀粉样品分散于 2.5 mL 的去离子水中,剧烈振摇,涡旋 5 min,在室温下静置 5 min,制成一定比例的淀粉乳,将淀粉

表 1 力场流分离系统洗脱程序表

Tab.1 Elution procedure of GrFFF for starch samples

t/min	A pump/%	B pump/%	Flow/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$
0	0	100	0.05
1.6	0	100	0.05
1.7	0	0	0
2.7	0	0	0
2.8	100	0	1.0
12	100	0	1.0

乳滴 1 滴于显微镜载玻片上, 盖上盖玻片, 排除气泡, 置光学显微镜载物台上, 选择合适的光亮度和放大系数, 在自然光下观察和拍摄样品的颗粒形貌照片, 并进行比较, 即可考察不同品种淀粉颗粒的形貌情况。

2.4 扫描电镜表征

将干燥的不同种类的淀粉样品均匀地撒在粘有导电胶的扫描电镜载物台上, 用洗耳球吹去多余的淀粉颗粒。采用金溅射涂布方法在加速电压 3 kV、放大系数 1 000 ~ 5 000 倍下观察记录, 并拍摄具有代表性的颗粒形貌照片。

2.5 颗粒尺寸分布

淀粉样品的颗粒尺寸分布使用动态光散射湿法测定。准确称取 50 mg 的样品悬浮于 5 mL 去离子水中, 超声 10 min 后, 置动态光散射粒度仪样品池中自动分析, 所使用的水和淀粉的标准折射指数分别为 1.31 和 1.52。得到淀粉的尺寸分布图, 所有的实验测定 3 次, 取平均值作为颗粒平均尺寸。

2.6 X-射线衍射分析

淀粉样品在饱和的相对湿度环境下平衡 24 h 后, 将适量的含有一定水分的不同种类的淀粉样品置于样品槽内压平, 之后放入 X-射线衍射仪样品台中进行测试。采用波长为 0.154 2 nm 的单色 Cu-K α 射线。测试条件为: 管压 40 kV, 管流 40 mA, 扫描范围为 4° ~ 60°, 扫描速度为 2° · min⁻¹, 步长为 0.02° 连续扫描, 结晶度计算采用 MDI Jade 6 计算, 即结晶度为结晶区域占衍射区域的百分比, 根据射线衍射图谱按下式计算结晶度: $X_c(\%) = A_c / (A_c + A_a) \times 100\%$, 其中: X_c 为结晶度, A_c 为结晶区部分面积, A_a 为非晶区的面积^[18]。

2.7 傅立叶红外光谱分析

红外光谱分辨率为 4 cm⁻¹, 信号扫描累加 16 次, 扫描波数范围为 4 000 ~ 400 cm⁻¹。取干燥的淀粉样品适量, 按与 KBr 比例约为 1:100, 充分混匀, 压片, 置红外光谱仪样品室, 以 KBr 为空白背景, 采集不同淀粉的红外吸收光谱图。以 1 022 和 1 047 cm⁻¹ 处吸光度的比值研究淀粉晶体区域的变化。

2.8 支链淀粉/直链淀粉含量测定

根据双波长比色原理, 溶液中某溶质在两个波长处均有吸收, 则 2 个波长的吸光度差值与溶质浓度成正比。直链淀粉与碘反应产生纯蓝色复合物, 支链淀粉与碘反应生成紫红色复合物, 用 2

类淀粉的标准溶液分别与碘起显色反应, 制作直链淀粉和支链淀粉的标准曲线, 之后在同一个坐标系里进行扫描或作吸收曲线, 按照吸收曲线确定参比波长 $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4$ 。含有直链和支链淀粉的样品与碘显色, 在选定的波长处作 4 次吸光度测定, 然后根据上述标准曲线即可分别求出样品中两类淀粉的含量。

3 结果与讨论

3.1 重力场流分离系统表征

淀粉中 A、B 颗粒的数量不同会影响淀粉的理化特性乃至其加工和食用、药用品质。GrFFF 是表征淀粉粒度分布的一种简单又经济的方法。本实验以 5 种常见淀粉作为样品, 利用重力场洗脱程序进行分离表征。5 种淀粉的重力场流出图见图 1 (流出图, 场流分离技术), 根据图中峰的面积比值作为 A、B 淀粉颗粒数量比的粗测值, 计算出 5 种不同淀粉的大小淀粉颗粒数量比, 结果见表 2。峰面积比可作为 A、B 颗粒数量比的粗测值, 能显示某一样品与其他样品相比是否含有相对多或少的某种淀粉颗粒。但是, 这个比值并不相当于真实的 A、B 颗粒比。由表 2 可直观看出, 所有淀粉的分离度 R_s 大于 1.5, 表明重力场系统可以将淀粉的 A、B 颗粒基线分离。同时, 5 种淀粉中的 B、A 颗粒数目比之间存在明显差异, 蜡质玉米 B、A 颗粒数目比最大, 而马铃薯的 B、A 颗粒数目比最小, 而且两者的差距明显 (分别为 14.5 和 4.2)。

本实验利用自行组装的重力场流分离技术表征了不同种类的药用淀粉, 实现了淀粉大小颗粒的基线分离并根据峰面积粗略估算了 A、B 颗粒的比值。根据文献[3], 含 B 颗粒数目多的淀粉适合用于面包、面条等的制作和工业化用途。在药用方面, B、A 颗粒最显著的区别是 B 颗粒具有更低的焓^[19]。凝胶中较高 B 颗粒含量能增加凝胶的硬度, 利于制作淀粉胶囊。

表 2 不同种类淀粉中的 A、B 颗粒数目比

Tab. 2 The number ration between A and B particles of different kinds of starch

Varieties of starch	Resolution (R_s)	Ratio (B/A)
Wheat	5.54	11.0
Corn	4.16	8.9
Potato	4.10	4.2
Pea	6.86	5.2
Waxy corn	4.96	14.5

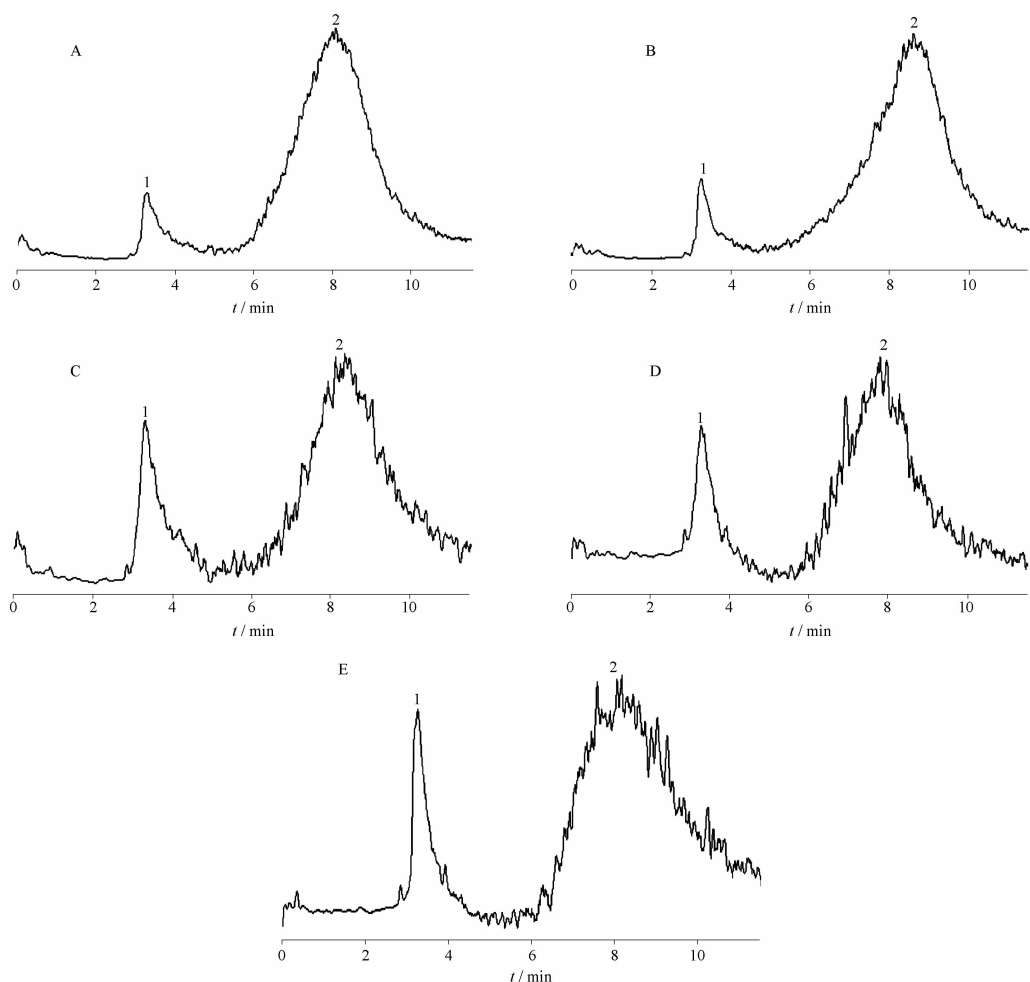


图1 不同种类淀粉的重力场技术分离图

A - 小麦淀粉; B - 蜡质玉米淀粉; C - 马铃薯淀粉; D - 豌豆淀粉; E - 玉米淀粉; 1 - A 颗粒; 2 - B 颗粒

Fig. 1 GrFFF fractograms of five kinds of starch

A - wheat starch; B - waxy maize starch; C - potato starch; D - pea starch; E - corn starch; 1 - A granule; 2 - B granule

3.2 淀粉形态学表征

淀粉颗粒的形状大小常常受到品种、直链淀粉含量及胚乳结构等影响。这会导致淀粉粒性质的不同,从而影响它的应用。不同种类的淀粉颗粒在自然光下显微镜中所观察到的颗粒形态见图2。

从图2中可以看出,所有种类淀粉中都含有A、B 2种颗粒,马铃薯和豌豆淀粉中颗粒相对较大,A颗粒相对较多,而小麦、蜡质玉米和玉米淀粉的颗粒相对偏小,B颗粒相对较多,这与GrFFF所估算出的颗粒数目比是相吻合的。粒径大的多为卵形或者椭圆形,表面光滑,无棱角,粒径小的为球形或者多边形,表面平整。在光学显微镜下,所有淀粉的样品可看到淀粉颗粒上有明显黑色亮斑和螺旋形纹路。

不同种类的淀粉颗粒在扫描电镜下所观察到的颗粒形态见图3。

由图3所示,不同种类淀粉颗粒大小差异明显,形态不同,可以明显的区分为A、B 2类颗粒,A型颗粒具有典型的不规则或球形的形态,而B型颗粒表现出不同于光学显微镜观察到的如圆盘状和透镜状,而是多数呈不规则状态,其中B颗粒被大量A颗粒所包围,这可能是由于显微镜技术的放大作用小造成的。从图3可见,马铃薯和豌豆淀粉颗粒表面光滑无孔隙、裂缝或缺口,呈透镜形或球形;小麦淀粉颗粒呈圆盘状,表面少有裂纹;蜡质玉米淀粉和玉米淀粉颗粒多为不规则球状,表面粗糙,有的颗粒表面有裂纹。颗粒形态的不同与淀粉来源有明显的关系。

3.3 淀粉结晶结构表征

淀粉的短程有序结构与其结晶度有关。红外光谱对于淀粉链的构象和螺旋的有序敏感,尤其是对

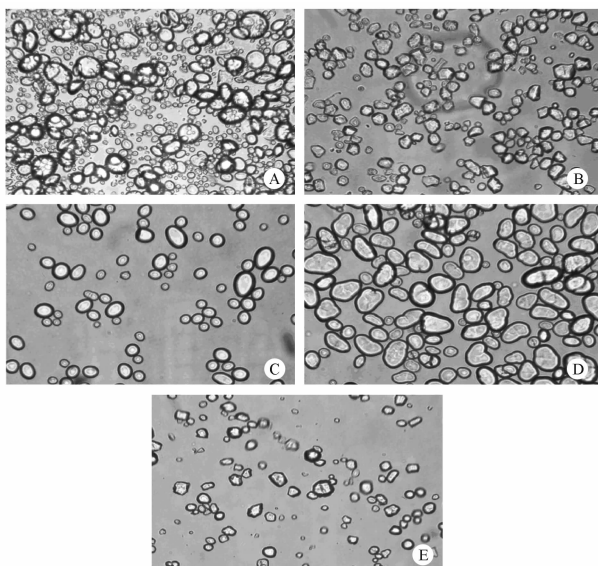


图2 不同种类淀粉的光学显微镜照片

A - 小麦淀粉; B - 蜡质玉米淀粉; C - 马铃薯淀粉; D - 豌豆淀粉; E - 玉米淀粉

Fig. 2 The light microscope pictures of different kinds of starch

A - wheat starch; B - waxy maize starch; C - potato starch; D - pea starch; E - corn starch

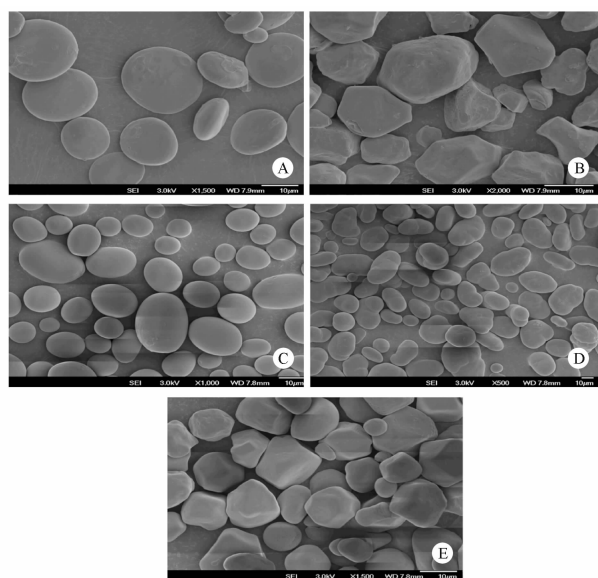


图3 不同种类淀粉的扫描电镜图片

A - 小麦淀粉; B - 蜡质玉米淀粉; C - 马铃薯淀粉; D - 豌豆淀粉; E - 玉米淀粉

Fig. 3 The SEM pictures of different kinds of starch

A - wheat starch; B - waxy maize starch; C - potato starch; D - pea starch; E - corn starch

晶体结构的短链结构区域的 C—C 和 C—O 伸缩振动非常敏感,因此,可以根据红外光谱的特征峰强来定量研究淀粉中有序部分与无定形部分的比例^[20]。1 022 cm⁻¹吸收峰变化代表的是淀粉无定形结构的变化,而 1 047 cm⁻¹处的吸收是由 1 040 和 1 053

cm⁻¹ 2 个峰重叠组成的,此处峰的变化反映了淀粉结晶结构的变化。因此,波数为 1 047 和 1 022 cm⁻¹ 处的吸收峰分别与淀粉的有序和无序结构有关,通过计算得到的 1 047/1 022 cm⁻¹ 处吸收峰面积或强度的比值,可以定量地反映淀粉颗粒中结晶结构和无定形结构的变化情况^[21]。不同种类淀粉在 400 ~ 4 000 cm⁻¹ 内的红外图谱见图 4。

由图 4 可看出,所有不同种类淀粉的红外图谱基本相似,在 1 047 和 1 022 cm⁻¹ 处都有着特征的强吸收,这符合淀粉的典型特征。根据计算可知,5 种淀粉的 1 047/1 022 cm⁻¹ 峰值比在 0.874 6 ~ 0.951 2 之间,其中,蜡质玉米淀粉的比值最大,玉米淀粉最小,其余介于两者之间。红外吸收峰强度与相对结晶度存在正相关关系,即相对结晶度越高,红外吸收峰比值越大,淀粉结构中有序部分越多(表 3)。

X-射线衍射技术也可以表征淀粉的结晶形态及结晶程度,它是利用 X-射线通过晶体时产生的衍射现象对晶体的结构进行分析^[21]。在衍射曲线中,尖峰衍射特征对应着结晶结构,弥散衍射特征代表着非晶体特征,通过比较和计算尖峰衍射特征和弥散衍射特征的比例,可以确定淀粉颗粒的结晶性质和结晶度。不同淀粉的 X-衍射图谱见图 5。

一般而言,淀粉作为半晶体物质在 X-射线图上分为 3 类(淀粉颗粒的结晶结构随不同来源的植物品种而异,根据淀粉的 X 射线衍射图形的不同,可以分为 A、B、C 3 种),分别是 A 型、B 型和 C 型淀粉,另外还有非天然的一种淀粉存在形式 V 型淀粉^[22]。由 X-射线衍射可知,A 型淀粉在约为 $2\theta = 15^\circ$ 和 $2\theta = 23^\circ$ 位置处有较强的衍射单峰,在 $2\theta = 17^\circ$ 和 18° 处有双峰衍射;B 型淀粉的 X-射线衍射图显示在 $2\theta = 15^\circ$ 、 17° 、 20° 、 22° 、 24° 处有较强的衍射峰和 $2\theta = 5.6^\circ$ 处的特征峰值;C 型淀粉具有 A 型和 B 型淀粉两者衍射特征。由图 5 可见,小麦、蜡质玉米和玉米淀粉在 15° 和 23° 都有较强的衍射峰且在 17° 和 18° 有双峰衍射,是典型的 A 型结构。马铃薯淀粉在 5.6° 有强的衍射峰,这是 B 型结构的特征峰。豌豆淀粉与典型 B 型淀粉相比,在 5.6° 处没有典型的单峰,与 A 型淀粉相比,在 $2\theta = 17^\circ$ 和 18° 处没有双峰。因此,初步判断豌豆淀粉为 Ca 型晶体结构。

结晶度是衡量晶体特征的另一个重要指标,淀粉结晶度是指淀粉中晶体所占的相对比例,可根据“1.6”中结晶度公式计算得到(表 3)。由表 3 中

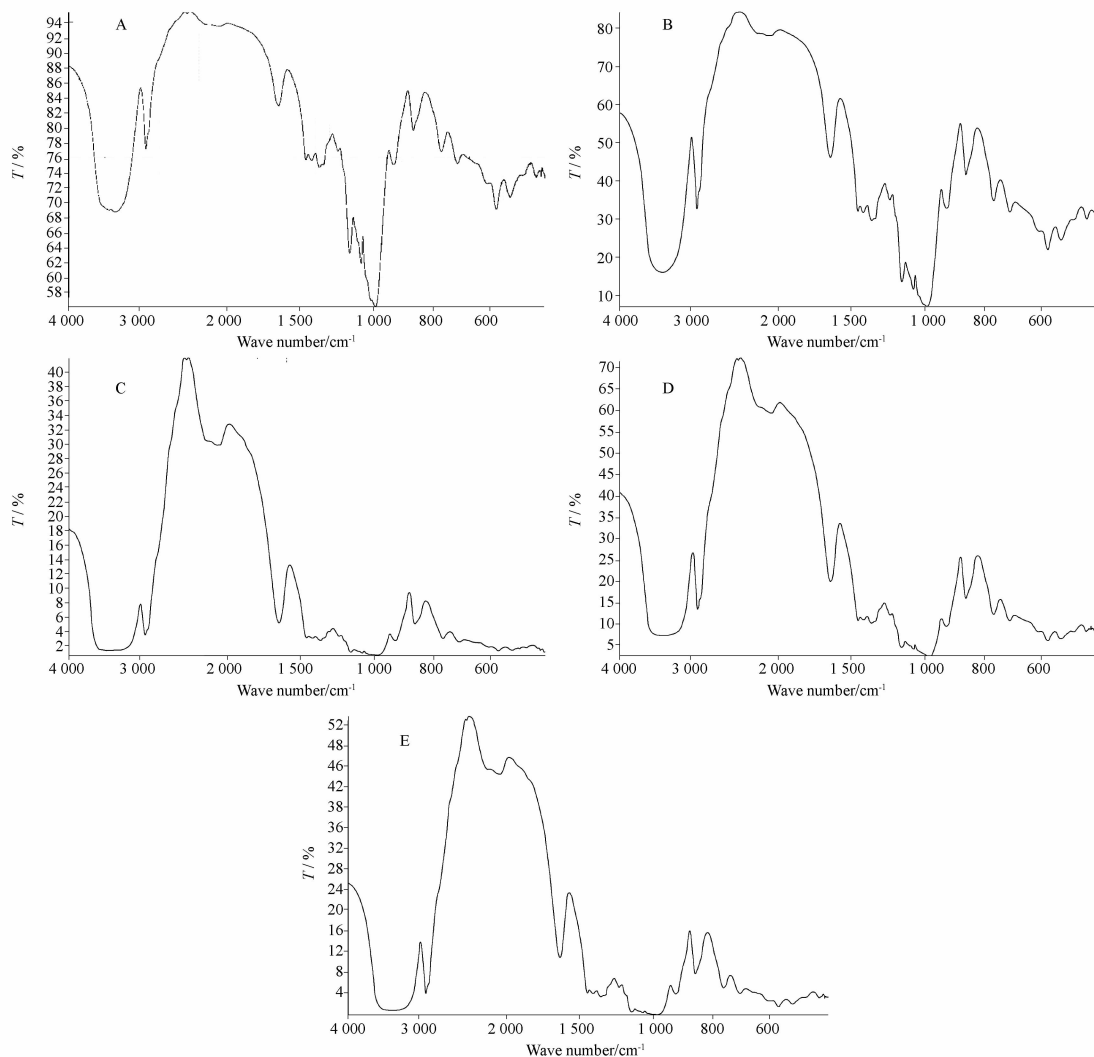


图4 不同种类淀粉的红外吸收光谱图
A - 小麦淀粉; B - 蜡质玉米淀粉; C - 马铃薯淀粉; D - 豌豆淀粉; E - 玉米淀粉

Fig. 4 The FT-IR spectra of different kinds of starch

A - wheat starch; B - waxy maize starch; C - potato starch; D - pea starch; E - corn starch

数据表明,蜡质玉米、豌豆和马铃薯淀粉的结晶度相对较高,小麦和玉米淀粉的结晶度相对较低,这和淀粉内的双螺旋结构排列一致性有关,一致性越好,结晶度越高,同时也和淀粉的半晶层厚度有关,厚度越小,有序程度越低,结晶度越低。总之,从表3中可以看出,不同种类淀粉的有序结构和无定形结构的比例变化趋势和其相对结晶度的变化趋势一致。

3.4 淀粉颗粒尺寸分布

动态光散射法测得的不同种类淀粉的粒度分布曲线见图6,所有测量使用去离子水作为分散剂,不添加任何表面活性剂和混合剂,并且在测量之前超声分散以达到均匀的测量。

由图6可见,除了小麦淀粉呈双峰粒度分布

外,其余淀粉颗粒都显示了单峰分布,这和GrFFF、光学显微镜和扫描电镜的表征结果不同,这主要是由于动态光散射所测量的是体系的平均尺寸,如果体系中大小颗粒的比例没有达到明显的区别时,动态光散射得到的粒度分布曲线就呈近似正态分布。这也是粒度仪在测定淀粉颗粒尺寸时不能得到大小颗粒分离的不足之处,相比之下,GrFFF可以根据颗粒尺寸的不同得到不同大小颗粒的分离。从尺寸分布数据可知,马铃薯和豌豆淀粉尺寸较大,玉米和蜡质玉米淀粉尺寸较小,小麦淀粉介于之间,这也符合光学显微镜和扫描电镜的结果。尺寸分布结果见表4,其中,d(0.1)表示累积体积小于10%的尺寸,d(0.5)和d(0.9)同理。

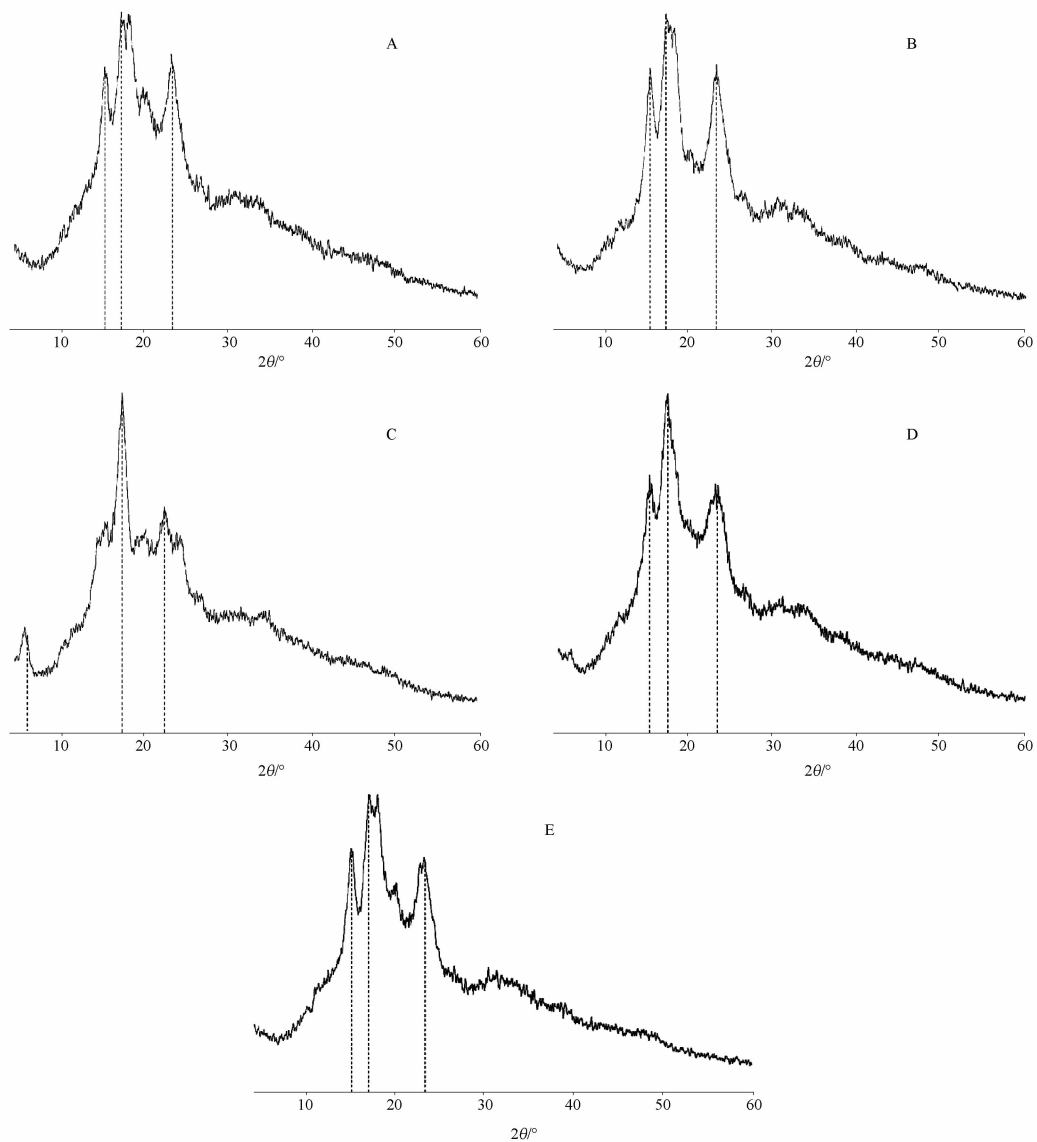


图5 不同种类淀粉的 X-射线衍射谱图

A - 小麦淀粉; B - 蜡质玉米淀粉; C - 马铃薯淀粉; D - 豌豆淀粉; E - 玉米淀粉

Fig. 5 The X-ray diffraction of different kinds of starch

A - wheat starch; B - waxy maize starch; C - potato starch; D - pea starch; E - corn starch

表3 不同种类淀粉的结晶度和红外吸收特征峰值比

Tab.3 Crystalline degrees and IR ratio of absorbances of different kinds of starch

Varieties of starch	Crystalline degrees/%	Crystalline types	1 047/1 022 /cm ⁻¹
Wheat	25.36	A	0.906 3
Corn	21.86	A	0.874 6
Potato	54.97	B	0.930 5
Pea	49.06	Ca	0.921 1
Waxy corn	55.76	A	0.951 2

3.5 淀粉中直链/支链淀粉含量测定

测定直、支链淀粉含量最常用的方法是碘比色

法,但该方法易受原料中脂肪和糖分等因素的干扰,影响测定结果的准确性。本实验所采用的双波长分光光度法其原理是溶液中某溶质在2个波长下均有吸收,则2个波长的吸收差值与溶质浓度成正比。由于直链淀粉和支链淀粉都可以与碘作用显色。采用2种淀粉的标准溶液分别与碘反应,之后在同一个坐标系下进行扫描,可以得到2条吸收曲线,然后根据作图法可以确定直链淀粉和支链淀粉含量测定所用的双波长。因为双波长法仅用一个吸收池,且用试液本身作参比液,完全能消除吸收池和参比液等因素引起的误差,提高了测定的准确度。同时,因为测定的是试液在2个波长处的吸光度差值,所以

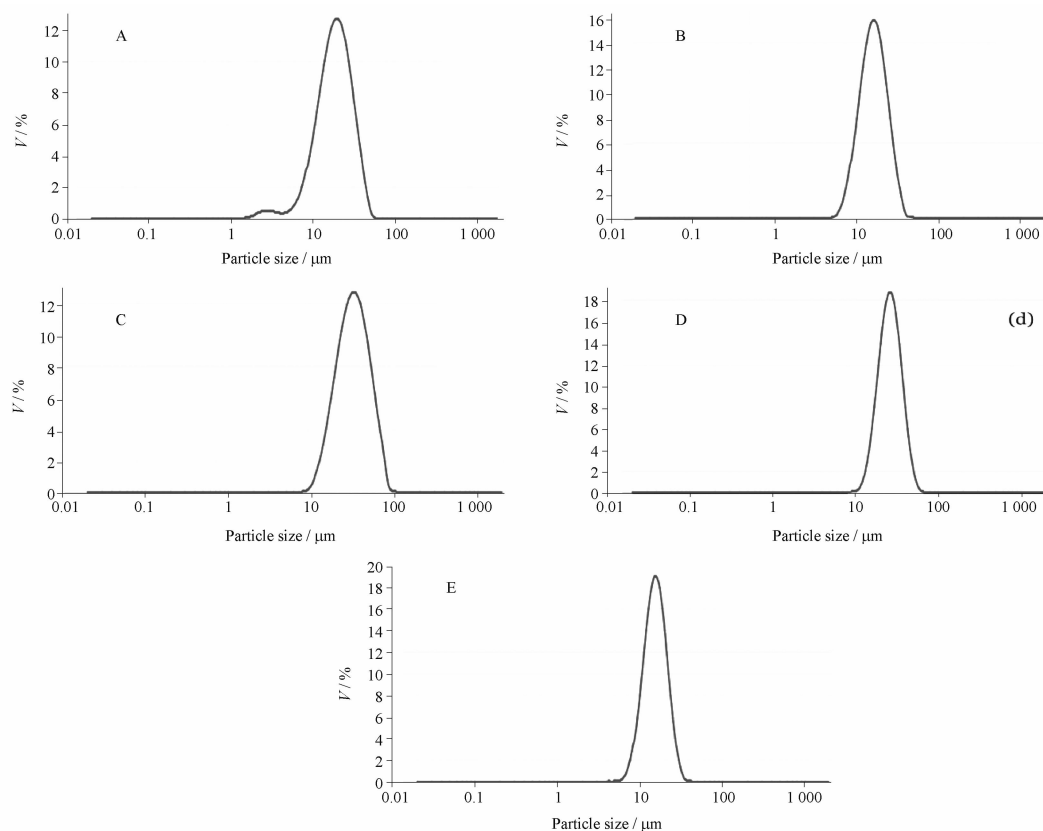


图6 不同种类淀粉的粒度分布曲线图

A - 小麦淀粉; B - 蜡质玉米淀粉; C - 马铃薯淀粉; D - 豌豆淀粉; E - 玉米淀粉

Fig. 6 The size distribution of different kinds of starch

A - wheat starch; B - waxy maize starch; C - potato starch; D - pea starch; E - corn starch

表4 不同种类淀粉的尺寸分布结果. %, n = 3

Tab. 4 Size distribution of different kinds of starch. %, n = 3

Varieties of starch	d(0.1) μm	d(0.5) μm	d(0.9) μm
Wheat	9.94	18.67	32.52
Corn	10.21	15.35	22.72
Potato	17.29	31.67	55.94
Pea	17.46	26.22	39.00
Waxy corn	9.85	16.01	25.65

提高了测定的灵敏度和选择性。

本实验采用紫外可见分光光度计对淀粉扫描液进行扫描得到直链淀粉和支链淀粉的吸收光谱,根据作图法得到直链淀粉测定波长为 642 nm,参比波长为 435 nm;支链淀粉测定波长为 537 nm,参比波长为 766 nm,即 $\lambda_1 = 642 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 435 \text{ nm}$, $\lambda_3 = 537 \text{ nm}$, $\lambda_4 = 766 \text{ nm}$ 。在 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 、 λ_4 处分别测定吸光度 A_{λ_1} 、 A_{λ_2} 、 A_{λ_3} 、 A_{λ_4} , 则 $\Delta A_{\text{直}} = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2}$ 而 $\Delta A_{\text{支}} = A_{\lambda_3} - A_{\lambda_4}$, 以 $\Delta A_{\text{直}}$ 和 $\Delta A_{\text{支}}$ 为纵坐标,直链淀粉和支链淀粉浓度为横坐标,可得淀粉标准曲线。曲线方程分别为 $y = 15.5x + 0.0177$, $r = 0.9994$ (直链淀粉); $y = 4.3779x + 0.0127$, $r = 0.9993$ (支链淀粉)。

根据支链淀粉和直链淀粉标准曲线,计算不同种类淀粉的直链淀粉/支链淀粉的比例,结果见表5。由表5可知,蜡质玉米中含有最多的支链淀粉,几乎达到 100%,其次为马铃薯和豌豆淀粉,含有超过 50% 的支链淀粉,小麦和玉米淀粉中直链淀粉占主要。其结果和结晶度实验结果一致,支链淀粉含量越高,即直链/支链淀粉比例越低,结晶度越好,反之亦然。

4 结论

GrFFF 法的结果与动态光散射等技术的结果一致,表明了重力场流分离技术可应用于分离表征淀粉颗粒。以光学显微镜和扫描电镜表征淀粉颗粒形态,发现所有淀粉颗粒都包含大小 2 种大小颗粒,且马铃薯和豌豆淀粉颗粒更大,表面更为光滑,形态更趋于球形和椭圆形。以红外光谱和 X-射线衍射技术表征淀粉结晶结构,发现蜡质玉米、豌豆和马铃薯淀粉的结晶度相对较高,小麦和玉米淀粉较低,同时,淀粉的有序结构和无定形结构的比例和其相对

表5 不同种类淀粉的直链/支链结果

Tab.5 Percentages of amylose/amylopectin of different kinds of starch

Varieties of starch	Amylose /%	Amylopectin /%	Amylose /Amylopectin
Wheat	54.8	29.8	1.84
Corn	57.4	21.3	2.70
Potato	26.3	72.9	0.36
Pea	42.4	59.7	0.71
Waxy corn	0	99.2	0

结晶度呈正相关。采用双波长法测定直链和支链淀粉含量与比值,结果表明,蜡质玉米淀粉含有最多的支链淀粉,小麦和玉米淀粉中直链淀粉占主要。本实验为重力场流分离技术在监测淀粉动态过程如溶胀和水解提供了基础和理论依据。

REFERENCES

[1] GIDDINGS J C. New separation concept based on a coupling of concentration and flow non-uniformities [J]. *Sep Sci*, 1966, 1(1):123-125.

[2] CONTADO C, RESCHIGLIAN P, FACCINI S, *et al.* Continuous split-flow thin cell and gravitational field-flow fractionation of wheat starch particles[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 871(1):449-460.

[3] MAZANEC K, DYCKA F, BOBALOVA J. Monitoring of barley starch amylolysis by gravitational fields flow fractionation and MALDI-TOF MS[J]. *J Sci Food Agric*, 2011, 91(15):2756-2761.

[4] JANOUSKOVÁ J, BUDINSKÁ M, PLOCKOVÁ J, *et al.* Optimization of experimental conditions for the separation of small and large starch granules by gravitational field-flow fractionation [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 914(1-2):183-187.

[5] CHMELIK J, KRUMLOVA A, BUDINSKA M, *et al.* Comparison of size characterization of barley starch granules determined by electron and optical microscopy, low angle laser light scattering and gravitational field-flow fractionation [J]. *J Inst Brew*, 2001, 107(1):11-17.

[6] PSOTA V, CHMELÍK J, BOHAČENKO I, *et al.* Relationship between starch granule size distribution and selected malting parameters[J]. *J Am Soc Brew Chem*, 2008, 66(3):162-168.

[7] PSOTA V, BOHAČENKO I, CHMELÍK J, *et al.* Comparison of GFFF and LALLS methods for determination of large and small starch granules in spring barley grain (*Hordeum vulgare* L.) [J].

Brewing Sci, 2007, 60(3):60-64.

[8] SALMAN H, BLAZEK J, LOPEZ-RUBIO A, *et al.* Structure-function relationships in A and B granules from wheat starches of similar amylose content [J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 75(3):420-427.

[9] CHEN P, YU L, CHEN L, *et al.* Morphology and microstructure of maize starches with different amylose/amylopectin content[J]. *Starch-Stärke*, 2006, 58(12):611-615.

[10] LIU H S, YU L, CHEN L, *et al.* Retrogradation of corn starch after thermal treatment a different temperature [J]. *Carbohydr Polym*, 2007, 69(4):756-762.

[11] LIU H S, YU L, XIE F W, *et al.* Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content [J]. *Carbohydr Polym*, 2006, 65(3):357-363.

[12] MANNERS D J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure[J]. *Carbohydr Polym*, 1989, 11(2):87-112.

[13] EVENS I D, HAISMAN D R. The effect of solutes on the gelatinization temperature range of potato starch [J]. *Starch-Stärke*, 1982, 34(7):224-231.

[14] SHI H X, HAO Y Y, FANG H Y, *et al.* Separation and purification of amylose and amylopectin from cassava starch and content determination by dual-wavelength spectrophotometry [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2011, 32(21):123-127.

[15] JENKINS P J, DONALD A M. The effect of acid hydrolysis on native starch granule structure [J]. *Starch-Stärke*, 1997, 49(7-8):262-267.

[16] QIU B L, WU D, GUO S, *et al.* Optimization of experimental conditions for the separation of polystyrene particles by gravitational field-flow fractionation[J]. *Chin J Chromatogr (色谱)*, 2017, 35(2):216-221.

[17] GUO S, ZHU C Q, GAOYANG Y Y, *et al.* Effects of carrier liquid and flow rate on the separation in gravitational field-flow fractionation[J]. *Chin J Chromatogr (色谱)*, 2016, 34(2):146-151.

[18] NARA S, KOMIYA T. Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch [J]. *Starch-Stärke*, 1983, 35(12):407-410.

[19] MCCORMICK F D. A swelling power test for selecting potential noodle quality wheats[J]. *Aust J Agric Res*, 1991, 42(3):317-323.

[20] BELLO-PEREZ L A, OTTENHOF M A, AGAMA-ACEVEDO E, *et al.* Effect of storage time on the retrogradation of banana starch extrudate[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(4):1081-1086.

[21] ZHANG B, LI X, LIU J, *et al.* Supramolecular structure of A- and B-type granules of wheat starch [J]. *Food Hydrocolloid*, 2013, 31:68-73.

[22] ZOBEL H F. Starch crystal transformations and their industrial importance[J]. *Starch/Stärke*, 1988, 40:1-7.

(收稿日期:2018-05-06)