



中华人民共和国国家标准

GB/T 20373—2006/ISO 11213:1995

变性淀粉中乙酰基含量的测定 酶法

Modified starch—Determination of acetyl content—Enzymatic method

(ISO 11213:1995, IDT)



2006-03-14 发布

2006-10-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
变性淀粉中乙酰基含量的测定 酶法
GB/T 20373—2006/ISO 11213:1995

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2006年11月第一版 2006年11月第一次印刷

*

书号: 155066 • 1-28228 定价 10.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

前 言

本标准等同采用 ISO 11213:1995《变性淀粉中乙酰基含量的测定——酶法》(英文版),其内容和结构与 ISO 11213:1995 一致。

本标准的附录 A 和附录 B 均为资料性附录。

本标准由中国商业联合会提出。

本标准由中国商业联合会商业标准中心归口。

本标准起草单位:江南大学食品学院、吉林淀粉批发市场、中国淀粉工业协会变性淀粉专业委员会。

本标准主要起草人:顾正彪、洪雁、张燕萍、陈洪兴、钟立满、周心怡。

变性淀粉中乙酰基含量的测定 酶法

1 范围

本标准规定了用酶法测定颗粒和冷水可溶性变性淀粉中乙酰基含量的方法。可测定总的和游离的乙酰基含量,通过计算得结合的乙酰基含量。

本方法适用于测定乙酰基含量不超过质量分数为 2% 的样品。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法

ISO 1666:1973,淀粉——水分含量测定——烘箱法

3 原理

总的乙酰基含量测定是加热含有稀盐酸的样品,水解乙酰基成醋酸和溶解淀粉。在乙酰辅酶 A 合成酶(ACS)的存在下,三磷酸腺苷(ATP)和辅酶 A(CoA)将醋酸转换成乙酰辅酶 A,在柠檬酸合成酶(CS)的作用下,后者再与草酰乙酸反应生成柠檬酸盐。

草酰乙酸是由苹果酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(辅酶 I, NAD)在苹果酸脱氢酶(MDH)作用下反应生成的。在这个反应中,辅酶 I 被还原成 NADH,生成 NADH 的量可以通过其在某一特定波长下的吸光值增加而测定。

游离的乙酰基含量测定是将变性淀粉分散在水中形成悬浮液、过滤,按照上述方法测定过滤液中的乙酰基含量。结合的乙酰基含量则为总的乙酰基含量减去游离的乙酰基含量。

4 试剂与材料

除注明的以外,所用试剂应为分析纯。所用的水应完全符合 GB/T 6682 规定的二级。所用的酶应与 Boehringer Mannheim 酶质量相当。

注 1: 可用适当的商用酶试剂盒。

4.1 盐酸(HCl)溶液

$c=1\text{ mol/L}$ 。

4.2 氢氧化钠(NaOH)溶液

$c=5\text{ mol/L}$ 。

4.3 缓冲溶液

在大约 70 mL 蒸馏水中,溶解下列试剂:

7.5 g 三乙醇胺(三羟乙基胺);

420 mg L-苹果酸;

210 mg 氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。

需加入大约 8 mL 5 mol/L 的氢氧化钾溶液,使缓冲液的 pH 维持在 8.4。此溶液在 4℃ 下,可稳定贮存一年。

4.4 ATP-CoA-NAD 溶液

在 20 mL 水中,溶解下列试剂:

500 mg ATP- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ ·3 H_2O (质量分数为 98%);

500 mg 无水碳酸氢钠(NaHCO_3);

50 mg 冷冻干燥的 CoA 三锂盐(CoA 的质量分数约为 85%);

250 mg 冷冻干燥的游离 β -NAD 一水化物(β -NAD· H_2O 的质量分数>98%)。

该溶液在 4℃ 下,可稳定贮存一周。

4.5 MDH-CS 分散悬浮液

分散约 1 100 U(国际单位)的苹果酸脱氢酶(MDH 来自于猪心,酶学编号为 EC 1.1.1.37)和约 270 U 的柠檬酸合成酶(CS 来自于猪心,酶学编号为 EC 4.1.37)于 0.4 mL 浓度为 3.2 mol/L 的硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 溶液中。

该溶液在 4℃ 下,可稳定贮存一年。

注 2: 在 25℃ 下,一个国际单位(1 U)1 min 可催化 1 μmol 的底物。

4.6 ACS 溶液

溶解 20 mg 冻干的并含有 5 mg 乙酰辅酶 A 合成酶(ACS 来自酵母,EC 6.2.1.1,约 16 U)于 0.4 mL 水中。

该溶液在 4℃ 下,可稳定贮存 5 天。

5 仪器

5.1 锥形瓶:250 mL,带螺旋帽。

5.2 沸水浴:带振荡器。

5.3 容量瓶:200 mL。

5.4 微量移液器或注射器。

5.5 分光光度计:能在 340 nm 波长处操作。

5.6 比色杯:石英玻璃或其他在 340 nm 处可透光的材料,厚度为 $10\text{ mm}\pm 0.1\text{ mm}$ 。

5.7 试验筛:孔径为 800 μm 。

5.8 螺旋式磨粉机。

5.9 水浴:20℃~25℃。

6 样品的制备

将样品过孔径为 800 μm 筛(5.7)。样品不能通过筛子部分,再用螺旋式磨粉机(5.8)研磨,至其全部通过 800 μm 筛。充分混匀样品。

7 操作方法

7.1 乙酰基的水解

7.1.1 颗粒状淀粉的分散

称取约 1 g(精确至 0.001 g)待测实验样品,置于 250 mL 锥形瓶(5.1)中,加入 50 mL 盐酸(4.1),搅拌至较好的分散状态。后续步骤见 7.1.3。

7.1.2 预糊化淀粉的分散

加 50 mL 盐酸(4.1)至 250 mL 锥形瓶(5.1)中,在锥形瓶中加入搅拌子后,置于磁力搅拌器上开始搅拌,缓慢并小心地加入约 1 g(精确至 0.001 g)待测实验样品,确保样品的分散均匀。

7.1.3 水解和过滤

将锥形瓶盖上塞并放入沸水浴中(5.2),振荡 30 min。

取出锥形瓶,放入冰水浴中快速冷却至 $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。完全冷却后,打开塞子,加入 10 mL NaOH 溶液(4.2),混匀。将样品转移至 200 mL 的容量瓶(5.3)中,用蒸馏水定容。将容量瓶放置于 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 的水浴(5.9)里(淹没刻度线),使温度平衡。用合适的滤纸过滤,弃去最初的 20 mL~30 mL 滤液,其余作为 7.4 所示的酶法测定溶液。

7.2 游离乙酰基测定

7.2.1 颗粒状淀粉的分散

称取 10 g 待测实验样品,边搅拌边加入装有 100 mL 蒸馏水的锥形瓶(5.1)中,后续步骤见 7.2.3。

7.2.2 预糊化淀粉的分散

在锥形瓶(5.1)中加入 100 mL 蒸馏水,放入磁力搅拌器的搅拌子并开始搅拌,缓慢并小心地加入约 2 g(精确至 0.001 g)待测实验样品,确保分散均匀。

7.2.3 溶解和过滤

盖上锥形瓶塞子并振荡 30 min。将样品转移至 200 mL 的容量瓶(5.3)中,用蒸馏水定容。将容量瓶放置于 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 的水浴(5.9)里(淹没刻度线),使温度平衡。用合适的滤纸过滤,弃去最初的 20 mL~30 mL 滤液,其余作为 7.4 所示的酶法测定溶液。

7.3 验证实验

为验证本方法,可以用纯的无水醋酸钠等试样作参考。称取约 100 mg(精确至 0.1 mg)无水醋酸钠(乙酰基的质量分数为 52.4%),放入 1 000 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,将容量瓶放置于 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 的水浴(5.9)里(淹没刻度线),使温度平衡,后续步骤见 7.4。

7.4 乙酸的酶法测定

根据以下的分析测试条件进行乙酸的酶法测定:

- 波长:340 nm;
- 温度: $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 。

比色杯(5.6)中装有蒸馏水为参照,读取吸光值。

注 3: 也可以在下列波长下进行测定,但计算中要考虑摩尔吸光系数 χ

- Hg 灯,365 nm: $\chi = 3.4 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
- Hg 灯,334 nm: $\chi = 6.18 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

将一定体积(见表 1)的样品放于比色杯(5.6)中进行测定。

表 1 乙酸酶法测定的分析方案

试剂和作用量	空白	样品溶液
缓冲溶液(4.3)	1.00 mL	1.00 mL
ATP-CoA-NAD 溶液(4.4)	0.20 mL	0.20 mL
双重蒸馏水	2.00 mL	1.50 mL
待测溶液	—	0.50 mL
混合每个比色杯中的样品,读出吸光值 A_0 。在每个比色杯中加入		
MDH-CS 悬浮液(4.5)	0.01 mL	0.01 mL
混合每个比色杯中的样品,3 min 后读出吸光值 A_1 。在每个比色杯中加入下列试剂,让其反应		
ACS 溶液(4.6)	0.02 mL	0.02 mL
混合每个比色杯中样品,等反应停止(大约需用 10 min~15 min),读出吸光值 A_2 。如果 15 min 后反应不能停止,每隔 2 min 读吸光值一次,直至每 2 min 吸光值增加幅度不变。		
注: 样品溶液的体积可以根据乙酰基的含量的高低适当调节,但最终总的体积应维持在 3.23 mL。		

8 结果计算

8.1 吸光值之差

通过式(1)计算出吸光值之差:

$$\Delta A = \left[(A_2 - A_0)_s - \frac{(A_1 - A_0)_s^2}{(A_2 - A_0)_s} \right] - \left[(A_2 - A_0)_b - \frac{(A_1 - A_0)_b^2}{(A_2 - A_0)_b} \right] \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ΔA ——吸光值之差;

A_0 、 A_1 、 A_2 ——通过表 1 中的各分析条件下测出的吸光值;

s ——含有样品的溶液;

b ——空白溶液。

8.2 总的乙酰基含量

通过式(2)计算出总的乙酰基含量:

$$w_a = \frac{5.56 \times \Delta A}{\chi \times m_1} \times \frac{100}{100 - w_m} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

w_a ——待测样品中总的乙酰基质量分数, %;

ΔA ——根据 8.1 所计算出的吸光值之差;

χ ——NADH 在 340 nm 处的摩尔吸光系数, $\chi = 6.30 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

m_1 ——待测样品的质量, 单位为克, (g) (见 7.1.1 或 7.1.2);

w_m ——样品中水分质量分数, %。

当样品溶液的份额不等于在表 1 中所示的 0.50 mL 含量时, 公式需要作相应的调整。因待测溶液被定容至 1 000 mL 而不是 200 mL (见 7.1 及 7.2), 因而, 要考虑验证实验(7.3)的稀释 5 倍。

注 4: 公式的推导列于附录 A。

8.3 游离乙酰基含量

通过式(3)计算出游离乙酰基含量:

$$w_f = \frac{5.56 \times \Delta A}{\chi \times m_2} \times \frac{100}{100 - w_m} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

w_f ——待测样品中游离乙酰基质量分数, %;

ΔA 、 χ 和 w_m 的含义与 8.2 相同;

m_2 ——待测样品的质量 (见 7.2.1 或 7.2.2), 单位为克, (g)。

8.4 结合乙酰基含量的测定

通过式(4)计算出结合乙酰基的含量:

$$w_{ba} = w_a - w_f \quad \dots\dots\dots (4)$$

w_{ba} ——待测样品中的结合乙酰基质量分数, %;

w_a ——待测样品中总的乙酰基质量分数, %;

w_f ——待测样品中游离的乙酰基质量分数, %。

9 精密度

方法的精密度由 ISO/TC 93/WG 3 在 1990 年组织的化学基础实验室合作实验中确定, 并贯彻执行符合 GB/T 6379 (参见参考文献[2])。这次实验有 11 个实验室参与进行: 样品为玉米变性淀粉, 马铃薯变性淀粉, 小麦变性淀粉。这次实验统计结果的摘要参见附录 B。当重复限和再现限确定时, 其置信度为 95%。

9.1 重复性

在很短的时间间隔内,在同一实验室中由同一实验者采用同样的仪器、同样的材料、同样的方法进行的两个独立的实验结果的绝对差值不应超过两个结果中较高值的 5%。

9.2 再现性

在不同实验室由不同实验者采用不同仪器、相同材料、相同方法进行的两个独立实验得到的绝对差值不应超过两个结果中较高值的 8%。

10 实验报告

实验报告要列出:

- 参考的标准;
- 取样方法;
- 实验方法;
- 得到的实验结果;
- 若重复性已被核对,最后获得的结果。

还应提及在本标准中所有的未列出的或非必要的操作细节,还要写出任何偶然的可能影响实验结果的细节。

实验报告需包括彻底确认样品的所有必要的资料。

附录 A

(资料性附录)

乙酰基含量计算公式

通过式(A.1)可以计算得到待测溶液中总的乙酰基质量浓度(g/L):

$$\rho_{\text{at}} = \frac{M_r \times V_2 \times \Delta A}{1\,000 \times V_1 \times d \times \chi} \quad \dots\dots\dots (\text{A.1})$$

式中:

ρ_{at} ——待测溶液中总的乙酰基的质量浓度,单位为克每升(g/L);

M_r ——乙酰基的摩尔质量, $M_r=43$ g/mL;

V_1 ——待测溶液的体积, $V_1=0.50$ mL;

V_2 ——样品溶液的最终体积, $V_2=3.23$ mL;

ΔA ——根据 8.1 所计算得到的吸光值之差;

d ——比色杯的厚度, $d=1$ cm;

χ ——NADH 在 340 nm 处的摩尔吸光系数, $\chi=6.30$ L · mmol⁻¹ · cm⁻¹。

通过式(A.2)可以计算得到湿基样品中总的乙酰基含量:

$$w_{\text{ah}} = \frac{\rho_{\text{at}} \times V_3}{10 \times m_1} \quad \dots\dots\dots (\text{A.2})$$

式中:

w_{ah} ——湿基样品中总的乙酰基的质量分数,%;

ρ_{at} ——待测溶液中总的乙酰基的质量浓度,单位为克每升(g/L);

V_3 ——过滤前待测溶液的体积, $V_3=200$ mL;

m_1 ——待测样品的质量(见 7.1.1 或 7.1.2),单位为克(g)。

由此可以得到:

$$\begin{aligned} w_{\text{ah}} &= \frac{M_r \times V_2 \times \Delta A}{1\,000 \times V_1 \times d \times \chi} \times \frac{V_3}{10 \times m_1} \\ &= \frac{43 \times 3.23 \times 200 \times \Delta A}{1\,000 \times 0.50 \times 1 \times 10 \times \chi \times m_1} \\ &= \frac{5.56 \times \Delta A}{\chi \times m_1} \quad \dots\dots\dots (\text{A.3}) \end{aligned}$$

通过式(A.4)可以计算得到干基样品的总的乙酰基含量:

$$w_{\text{a}} = w_{\text{ah}} \times \frac{100}{100 - w_{\text{m}}} = \frac{5.56 \times \Delta A}{\chi \times m_1} \times \frac{100}{100 - w_{\text{m}}} \quad \dots\dots\dots (\text{A.4})$$

式中:

w_{m} ——样品水分的质量分数,%。

附 录 B
(资料性附录)
实验室间实验结果统计

表 B.1 实验室间实验结果统计

参 数	样 品 ^a				
	WL	ML	MH	PL	PH
消去异常数据后的实验室数目	10	10	10	11	11
有异常数据的实验室数目	1	1	1	0	0
可接受的实验结果	20	20	20	22	22
乙酰基平均含量/(%)(质量分数)	1.00	0.70	1.19	0.61	1.92
重复性标准偏差 s_r /(%)(质量分数)	0.006	0.013	0.013	0.007	0.050
重复性变异系数/(%)	0.6	1.9	1.08	1.20	2.61
重复性限 $r[r=2.8\times s_r]$ /(%)(质量分数)	0.017	0.037	0.036	0.021	0.142
再现性标准偏差 s_R /(%)(质量分数)	0.009	0.015	0.020	0.024	0.088
再现性变异系数/(%)	0.95	2.16	1.69	3.97	4.60
再现性限 $R(R=2.8\times s_R)$ /(%)(质量分数)	0.027	0.042	0.057	0.069	0.250
^a H:高含量; L:低含量; M:变性玉米淀粉; P:变性马铃薯淀粉; W:变性小麦淀粉。					

参 考 文 献

- [1] Bergmeyer, H. U. 酶法分析方法(第二版), 1974, 1: 112-117.
 - [2] GB/T 6379—1986 测试方法的精密度 通过实验室间试验确定标准方法的重复性和再现性.
-



GB/T 20373-2006

版权专有 侵权必究

*

书号: 155066 · 1-28228

定价: 10.00 元