

Eine amperometrische Methode zur Bestimmung des Amylosegehaltes von Stärke verschiedener Getreidearten und -sorten*

Von

O. Brunner und C. Lentner

Aus dem Institut für Chemie der Hochschule für Bodenkultur in Wien

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 13. Juli 1957)

Es wird eine einfache Methode zur Bestimmung des Amylosegehaltes von Stärke verschiedener Getreidearten beschrieben. Die Stärke wird aus dem Untersuchungsmaterial mit Perchlorsäure herausgelöst und in dieser Lösung der Gehalt an Amylose amperometrisch bestimmt. Auf diese Weise wurden 16 Sorten von Weizen, Roggen, Gerste und Hafer auf den Amylosegehalt der Stärke untersucht.

Der Gehalt an Amylose in den verschiedenen natürlichen Stärkearten variiert stark. Während die Waxy-Typen der Getreidestärken nur wenig oder keine Amylose enthalten¹, wurden in verschiedenen Erbsensorten bis zu 70% Amylose gefunden^{2, 3}. Eine Ausnahme bildet auch der Amylosegehalt von über 70% in Mais vom „sugary“-Typ⁴. Im allgemeinen bestehen die einzelnen Stärkearten zu 20 bis 30% aus Amylose.

Da die chemischen und physikalischen Eigenschaften der beiden Stärkeanteile — Amylose und Amylopektin — verschieden sind, ist die Zusammensetzung der Stärke nicht nur theoretisch, sondern auch

* Herrn Prof. Dr. F. Wessely mit den aufrichtigsten Wünschen zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ R. W. Kerr, Chemistry and Industry of Starch, S. 191. New York: Academic Press. 1950.

² J. P. Nielsen und P. C. Gleason, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **17**, 131 (1945).

³ G. E. Hilbert und M. M. MacMasters, J. Biol. Chem. **162**, 229 (1946).

⁴ G. M. Dunn, H. H. Kramer und R. L. Whistler, Agronomy J. **45**, 101 (1953).

überall da von praktischer Bedeutung, wo Stärke und stärkehaltige Rohstoffe Verwendung finden. Die ausgezeichneten Eigenschaften von Amylosefilmen⁵ haben es wünschenswert erscheinen lassen, Getreidesorten aufzufinden oder zu züchten, deren Stärke von vornherein einen so hohen Amylosegehalt aufweist, daß sich zur industriellen Verwendung eine Trennung der beiden Bestandteile erübrigt. Untersuchungen über den Amylosegehalt europäischer Getreidesorten liegen unseres Wissens nicht vor; auch in den USA wurde fast ausschließlich Weizen auf den Gehalt an Amylose hin geprüft.

Die quantitative Bestimmung des Amylosegehaltes kann kolorimetrisch, potentiometrisch und amperometrisch erfolgen. Zur potentiometrischen Bestimmung ist eine Isolierung der Stärke nötig, eine in vielen Fällen zeitraubende Arbeit, die außerdem nie quantitativ erfolgt, so daß die Zusammensetzung der isolierten Stärke nicht unbedingt mit der Zusammensetzung der Gesamtstärke des Untersuchungsmaterials übereinstimmen muß. Zur kolorimetrischen Bestimmung ist für jede Stärkeart ein Amylosepräparat als Bezugs substanz nötig; außerdem bildet die verhältnismäßig geringe Stabilität der Amylose-Jodsorptionsverbindung eine Fehlerquelle.

Für eine schnelle und routinemäßige Amylosebestimmung in Getreide erschien uns die amperometrische Methode am geeignetsten. Eine amperometrische Methode der Amylosebestimmung — eine Adaptation der „dead stop“-Methode von *Foulk* und *Bawden* — verwendeten erstmals *B. L. Larson*, *K. A. Gilles* und *R. Jenness*⁶. Der Vorteil der amperometrischen Amylosebestimmung liegt darin, daß hier die Möglichkeit besteht, auf eine Stärkeisolierung verzichten zu können, indem man die Stärke aus dem feingemahlten Untersuchungsmaterial mit Perchlorsäure herauslöst und in dieser Lösung direkt die Amylose amperometrisch bestimmt. Perchlorsäure eignet sich recht gut, um Stärke in eine stabile kolloidale Lösung überzuführen².

Über die Selektivität dieser Extraktion finden sich in der Literatur nur wenige Angaben. Proteine werden größtenteils denaturiert und gehen nicht in Lösung, ebenso bleiben Cellulose und Pentosane ungelöst. Mono- und Oligosaccharide werden durch 80%igen heißen Alkohol entfernt². *G. W. Pucher* und Mitarbeiter⁷ reinigen die extrahierte Stärke durch Umfällen mit Jodlösung, finden aber nur geringe Differenzen gegenüber der ursprünglichen Methode, so daß der Vorteil einer etwas größeren Genauigkeit den Nachteil einer wesentlich längeren Arbeitsdauer bei Serienanalysen kaum aufzuwiegen vermag. Perchlorsäurekonzentration, Extraktionstemperatur und -zeit sind so zu wählen, daß keine Hydrolyse der Stärke erfolgt, dennoch die Extraktion quantitativ verläuft. Eine allgemeingültige Vorschrift kann wohl nicht

⁵ *I. A. Wolff*, *H. A. Davis*, *J. E. Cluskey*, *L. J. Gundrum* und *C. E. Rist*, Ind. Eng. Chem. **43**, 915 (1951).

⁶ *B. L. Larson*, *K. A. Gilles* und *R. Jenness*, Analyt. Chemistry **25**, 802 (1953).

⁷ *G. W. Pucher*, *C. S. Leavenworth* und *H. B. Vickery*, Analyt. Chemistry **20**, 850 (1948).

gegeben werden; die Wahl der Bedingungen richtet sich vielmehr nach der Art des zu untersuchenden Materials.

Da sich Jod mit großer Genauigkeit und in einfacher Anordnung mittels einer rotierenden Platinelektrode amperometrisch titrieren läßt⁸, haben wir für die Amylosebestimmung dieser Titrationsanordnung den Vorzug gegeben. Die Titrationsapparatur besteht aus einer rotierenden Platinelektrode (500 Umdrehungen pro Minute) und einer gesättigten Kalomelektrode, die über eine Agarbrücke, gesättigt an KCl, mit der zu titrierenden Lösung in Verbindung steht. Die beiden Elektroden werden ohne Verwendung einer äußeren Spannungsquelle über ein Galvanometer kurzgeschlossen; ein parallel geschalteter Widerstand dient zur Veränderung der Empfindlichkeit

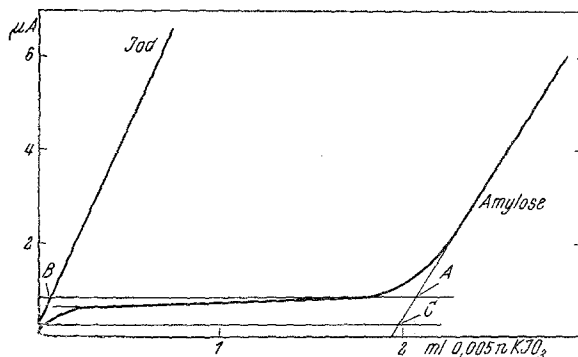


Abb. 1

des von uns verwendeten Lichtmarkengalvanometers (Fa. Siemens-Halske, Empfindlichkeit $1^\circ = 0,006 \mu A$). Als Maßlösung wird eine Kaliumjodat-lösung, als Grundelektrolyt Kaliumjodid verwendet.

Da die „dead stop“-Methode und eine amperometrische Form der Titration mittels Quecksilbertropfelektrode oder rotierender Platinelektrode in den theoretischen Grundlagen weitgehend übereinstimmen, entsprechen sich auch die Titrationskurven (Abb. 1). Im Meßbereich von 0 bis $10 \mu A$ ist die Stromstärke eine lineare Funktion der Jodkonzentration in der Lösung. Die Ermittlung des Titrationsendpunktes erfolgt in der bereits früher⁶ angegebenen Weise. Die Extrapolation der Titrationskurve auf den Endwert A ergibt nach Abzug der dieser Stromstärke entsprechenden Konzentration an freiem Jod B die Jodsorption der Probe. Dieser so erhaltene theoretisch einwandfreie Wert ist nur geringfügig größer als der durch Extrapolation bis zum Reststrom der Blindprobe (zirka $0,25 \mu A$) erhaltene (C). Diese letztere Form der Endpunktbestimmung bedeutet eine Zeitersparnis, da es dazu nur nötig ist, drei Punkte der Titrationskurve im Teil nach dem Titrationsendpunkt zu bestimmen. Es ist aber dazu zu bemerken, daß es uns nicht gelungen ist,

⁸ I. M. Kolthoff und J. J. Lingane, Polarography, Vol. 2, S. 946. New York: Interscience Publisher, 1952.

die Neigung der Titrationskurve immer konstant zu halten, was vorausgesetzt werden müßte, um einen eindeutig reproduzierbaren Endwert *C* zu erhalten. Auf diese Erscheinung wiesen auch kürzlich *J. Hollo* und *J. Szejtli* hin⁹. Unter konstanten Bedingungen ist aber die Reproduzierbarkeit dennoch sehr zufriedenstellend; eine Titration läßt sich auf diese Weise leicht in 10 Min. ausführen. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ist der Endpunkt der Titration weitgehend unabhängig von der Konzentration des Grundelektrolyten, von der Temperatur im Bereich von 18 bis 22° C, vom Volumen und von der Rotationsgeschwindigkeit der Platinelektrode. Eine Veränderung dieser Faktoren ändert meist die Neigung der Kurve im Teil nach vollendeter Jodsorption. Der pH-Wert der Lösung ist gegeben durch die Art der Extraktion der Stärke mit Perchlorsäure, die unter konstanten Bedingungen erfolgt. Eine Änderung der KJ-Konzentration um Zehnerpotenzen beeinflusst den Titrationswert, wie dies *F. L. Bates* und Mitarbeiter¹⁰ bereits bei der potentiometrischen Titration von Amylose beschrieben haben. Die Reproduzierbarkeit der Methode ist gut. Der mittlere Fehler des Mittelwertes 4,70% Jodsorption, erhalten aus 10 verschiedenen Einwaagen von Weizenstärken, betrug $\pm 0,02$. Eine Genauigkeit von $\pm 1\%$ ist leicht zu erzielen. Die erhaltenen Werte der Jodsorption von Stärke sind auf den Gehalt an Amylose umzurechnen.

Die maximale Jodsorption der Amylose der meisten Stärkearten beträgt ungefähr 20%. Wenn es auch im allgemeinen genügt, die Umrechnung mit diesem Wert durchzuführen, haben wir dennoch Amylose aus den von uns untersuchten Getreidearten dargestellt. Die einzelnen Amylosepräparate wurden so lange aus Butanol- bzw. Pentasol-Wasser umgelöst, bis der Wert der Jodsorption konstant blieb. Über den Betrag der Jodsorption gibt Tabelle 1 Auskunft.

Tabelle 1. Maximale Jodsorption von Amylose verschiedener Getreidestärken

Stärkeart	Fällungsmittel	% Jodsorption
Weizen	Butanol	20,0
Gerste	Pentasol	20,3
Roggen	Butanol	20,4
Hafer	Butanol	18,1

Während über den Betrag der Jodsorption von Roggen- und Haferamylose bisher nicht berichtet wurde, finden *I. C. MacWilliam* und Mitarbeiter¹¹

⁹ *J. Hollo* und *J. Szejtli*, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **59**, 94 (1957).

¹⁰ *F. L. Bates*, *D. French* und *R. E. Rundle*, *J. Amer. Chem. Soc.* **65**, 142 (1943).

¹¹ *I. C. MacWilliam* und *E. G. V. Percival*, *J. Chem. Soc. London* **1951**, 2259.

für Gerstenamylose einen Wert von 21,0% und *S. Lansky* und Mitarbeiter¹² für Weizenamylose einen Wert von 19,9%. Die von uns erhaltenen Werte stehen somit in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen.

Zur Berechnung des Amylosegehaltes der Stärke des Untersuchungsmaterials ist es noch nötig, den *Stärkegehalt* des Perchlorsäureextrakts zu kennen. Wir wählten die *Anthronmethode* zur Stärkebestimmung in Anlehnung an die Ausführungen von *R. M. McCready* und Mitarbeiter¹³.

Die Stärkebestimmung mit dem Anthronreagens zeichnet sich durch große Einfachheit, leichte Durchführbarkeit und geringen Zeitaufwand aus. Nachteilig ist die geringe Spezifität des Reagens und der Umstand, daß zur Erhaltung reproduzierbarer Werte alle Reaktionsbedingungen sehr scharf einzuhalten sind. Die Reproduzierbarkeit beträgt nach unseren Erfahrungen $\pm 1,5\%$, was für Serienanalysen im allgemeinen ausreichend ist.

Umgekehrt ist es andererseits unter Voraussetzung eines konstanten und bekannten Amylose-Amylopektin-Verhältnisses einer bestimmten Stärkeart auch möglich, durch eine amperometrische Titration der Amylose den *Stärkegehalt* einer Probe zu bestimmen. Er läßt sich auf diese Weise ohne großen Arbeitsaufwand — ein Nachteil der meisten Stärkebestimmungsmethoden — und dennoch mit befriedigender Genauigkeit bestimmen.

Die mittels der oben beschriebenen Methode untersuchten Getreidesorten stammen durchwegs aus dem niederösterreichischen Anbaugebiet

Tabelle 2. Amylosegehalt von Stärke verschiedener Getreidesorten

Stärkeart	% Amylose
Weizen (<i>Triticum vulgare</i>), Tschermaks weißer begrannter Marchfelder	24
„ „ „ Ritzlhofer	23
„ „ „ Kadolzer	24
„ „ „ Hohenstauer	24
Roggen (<i>Secale cereale</i>), Tschermaks veredelter Marchfelder ...	23
„ „ „ Tyrnauer	24
„ „ „ Melker	24
„ „ „ Mühlviertler	24
Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>), mehlttauresistente Bayerngerste	23
„ „ „ Tschermaks Hanna \times Kargyn	24
„ „ „ Wieselburger	24
„ „ „ Vollkorngerste Probstdorf I	24
„ „ „ „ „ II	25
„ „ „ Haisa	24
Hafer (<i>Avena sativa</i>), Otterbacher	23
„ „ „ Flämingstreue	22

¹² *S. Lansky*, *M. Kooi* und *T. J. Schoch*, *J. Amer. Chem. Soc.* **71**, 4066 (1949).

¹³ *R. M. McCready*, *J. Guggolz*, *V. Silviera* und *H. S. Owens*, *Analyt. Chemistry* **22**, 1156 (1950).

und haben sich auf Grund ihrer Ertragsleistung und Qualität gut bewährt. Die Proben stammen aus der Ernte 1954 und wurden uns dankenswerterweise vom Institut für Pflanzenbau der Hochschule für Bodenkultur in Wien zur Verfügung gestellt.

Die Unterschiede im Amylosegehalt der einzelnen Sorten (Tabelle 2) liegen nur unwesentlich außerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode. Ähnliche Ergebnisse — Amylosegehalte von 22 bis 25% für Getreidestärken — wurden auch bei der Untersuchung amerikanischer Getreidesorten erzielt^{14, 15, 16}. Größere Unterschiede im Amylosegehalt von Weizen (17 bis 29%) wurden an Sorten aus China und Afghanistan gefunden¹⁵.

Experimenteller Teil

Extraktion der Stärke

Die feingemahlene Probe, ungefähr 100 bis 150 mg Stärke entsprechend, wird 2mal mit je 50 ml Aceton in der Kälte unter Rühren entfettet. Nach Abzentrifugieren des Acetons wird der Rückstand mit etwas Wasser befeuchtet und mit 30 ml heißem 80%igem Äthanol zur Abtrennung der Zucker 10 Min. gerührt. Der Alkohol wird durch Zentrifugieren entfernt und die Extraktion mit Alkohol so lange fortgesetzt, bis eine Prüfung auf Zucker mit Anthron negativ ausfällt. Im allgemeinen findet man mit 3maligem Extrahieren das Auslangen.

Der Rückstand wird in 5 ml Wasser suspendiert, auf 0° gekühlt und unter Umschütteln mit 10 ml 7,0 n Perchlorsäure versetzt. Nach 24stünd. Stehen im Eisschrank unter gelegentlichem Umschütteln ist die Stärke vollkommen in Lösung gegangen. Die Lösung wird mit Eiswasser quantitativ in einen 100-ml-Meßkolben übergespült, nach dem Aufwärmen auf Eichtemp. mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und durch eine 11-G-2-Glassinternutsche filtriert, wobei die ersten 20 ml zu verwerfen sind. Die Amylosebestimmung erfolgt in 20 ml des Filtrats. Zur Stärkebestimmung wird die Lösung so weit verdünnt, daß in 5 ml 50 bis 100 µg Stärke enthalten sind.

Stärke-, Amylose- und Amylopektinpräparate (Einwaagen ungefähr 100 mg, 40 mg bzw. 200 mg) werden in gleicher Weise in Lösung gebracht, das Filtrieren nach erfolgter Dispersion unterbleibt. Alle Proben wurden zuerst 24 Stdn. im Vakuumtrockenschrank bei 40° und dann im Exsikkator über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Stärkebestimmung

Die Bestimmung des Stärkegehaltes erfolgt nach der von *R. M. McCready* und Mitarbeitern¹³ beschriebenen Methode. Die Proben werden nach Versetzen mit dem Anthronreagens 9 Min. in lebhaft siedendem Wasser erhitzt. Die kolorimetrischen Messungen wurden mit einem *Lange*-Kolorimeter, Modell VI, unter Verwendung des Rotfilters durchgeführt.

¹⁴ *C. W. Bice, M. M. MacMasters* und *G. E. Hilbert*, *Cereal Chem.* **22**, 463 (1945).

¹⁵ *W. L. Deatherage, M. M. MacMasters* und *C. E. Rist*, *Trans. Amer. Assoc. Cereal Chemists* **13**, 31 (1955).

¹⁶ *R. L. Whistler* und *P. Weatherwax*, *Cereal Chem.* **25**, 71 (1948).

Amylosebestimmung

30 ml Perchlorsäureextrakt werden in einem 200-ml-Becherglas hoher Form mit 5 ml KJ-Lösung versetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 ml gebracht. Titriert wird mit 0,005 n KJO_3 -Lösung. Der Zusatz der Maßlösung erfolgt in 0,2-ml-Anteilen; nach jeder Zugabe ist vor Ablesen am Galvanometer 1 Min. zu warten. Die Größe des Reststromes wird in einer Probe, die in 100 ml 2 ml 7,0 n Perchlorsäure und 5 ml KJ-Lösung enthält, bestimmt. Nach jeder Bestimmung ist die Platinelektrode durch Eintauchen in 2 n KOH zu reinigen.

Die Darstellung der Amylosepräparate erfolgte nach den Angaben von *T. J. Schoch*¹⁷, *I. C. MacWilliam* und Mitarbeitern¹¹ sowie *S. Lansky* und Mitarbeitern¹².

¹⁷ *T. J. Schoch*, J. Amer. Chem. Soc. 64, 2957 (1942).