

饮料中异麦芽低聚糖的测定^{*}

陈桂茹 秦振顺 常凤启 李存满 韩会新
(河北省疾病预防控制中心,河北 保定 071000)

摘 要:为测定饮料中异麦芽低聚糖的含量,建立了使用 300 mm ×4.6 mm,5 μm Hypersil-NH₂ 柱,乙腈+水=78+22 为流动相,内部温度为 40 的示差检测器的高效液相色谱法。异麦芽糖和异麦芽三糖的回收率范围分别为 88.5 %~101.0 %、90.1 %~102.0 %,相对标准偏差 <5 %。异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖的最小检出量为 2、10、5 μg。该方法的试样前处理简单,检测灵敏度高,分析速度快、准确,适用于饮料中异麦芽低聚糖的测定。

关键词:饮料;异麦芽糖;色谱法,液相

中图分类号:R15;TS218;O657.7⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2002)05-0014-03

异麦芽低聚糖属于功能性低聚糖,促进人体肠道内固有的有益细菌—双歧杆菌的增殖,有益身体健康。随着食品卫生的发展和人们生活水平的提高,保健食品和强化食品越来越多,添加异麦芽低聚糖的食品就是其中一大类。^[1~5] 目前测定糖主要采用液相色谱示差检测器和氨基柱,^[1,2] 而且主要是测定低聚糖含量高的原料,^[3~5] 测定食品中糖的方法很少。为了保健食品市场的监督管理,建立测定添加在食品基质中的异麦芽低聚糖的方法非常必要,受卫生部保健食品专项研究课题资助,本实验室研究并建立了此方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters 液相色谱仪,600 E 泵,示差检测器,大连 HYPERSIL NH₂ 色谱柱 300 mm ×4.6 mm ×5 μm;数据处理工作站。

1.2 试剂

乙腈(色谱纯),高纯水,无水乙醇(分析纯),麦芽糖、葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖均为分析纯。异麦芽糖、麦芽三糖、潘糖、异麦芽三糖纯度均大于 99 %,购于美国 Sigma 公司。

1.3 标准溶液的配制

准确称取葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖、乳糖、异麦芽糖、麦芽三糖、潘糖、异麦芽三糖标准品适量,用水溶解并定容到一定体积,混匀。其中异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖的浓度分别为 15.8、12.0、9.00 mg/mL。

1.4 试样预处理

1.4.1 含乳饮料 精确量取 50.0 mL 试样,加入无水乙醇 50.0 mL,混匀,静止 10 min,过滤,滤液用于 HPLC 分析。

1.4.2 不含乳饮料 试样直接过 0.45 μm 滤膜,滤液用于 HPLC 分析。

1.5 色谱条件

大连 HYPERSIL NH₂ 色谱柱,30 mm ×4.6 mm ×5 μm;柱温 45 ;流动相 乙腈+水=78+22;流速 1.5 mL/min;检测器 示差检测器,内部温度 40 。

1.6 计算公式

$$x = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times C_{\text{标}} \div V \times f$$

式中: x ——试样中某种异麦芽糖含量,mg/mL;

$A_{\text{样}}$ ——试样溶液中某种异麦芽糖的峰面积;

$A_{\text{标}}$ ——标准溶液中某种异麦芽糖的峰面积;

$C_{\text{标}}$ ——标准溶液中某种异麦芽糖的浓度,mg/mL;

V ——试样的取样量,mL;

f ——试样稀释因子。

2 结果

2.1 校正曲线

将含 15.8 mg/mL 异麦芽糖、12.0 mg/mL 异麦芽三糖、9.00 mg/mL 潘糖的混合标准溶液用水稀释 5、10、20 倍,然后分别用液相色谱测定,结果见表 1。

2.2 准确度及精密度

准确量取某口服液 10 mL,添加 2 个不同浓度的异麦芽糖标准液做回收实验,每一浓度做 6 个平行测定,结果见表 2。

准确量取某口服液 10 mL,添加 2 个不同浓度的异麦芽三糖标准液做回收实验,每一浓度做 6 个

^{*} 卫生部基金资助课题(课题号:BJ-01-20)

平行测定,结果见表3。

表 1 异麦芽低聚糖校正曲线及线性相关系数

异麦芽糖			异麦芽三糖			潘 糖		
浓度	峰面积 A	回归方程及相关系数	浓度	峰面积 A	回归方程及相关系数	浓度	峰面积 A	回归方程及相关系数
0.79	9.47e + 5	$y = 1.04e + 6x + 4.20e + 5$ $r = 0.9995$	0.60	5.19e + 5	$y = 7.84e + 5x + 7.28e + 4$ $r = 0.9998$	0.45	6.27e + 5	$y = 1.16e + 6x + 3.43e + 5$ $r = 0.9993$
1.58	2.16e + 6		1.20	9.34e + 5		0.90	1.49e + 6	
3.16	3.88e + 6		2.40	1.97e + 6		1.80	2.58e + 6	
15.80	1.67e + 7		12.00	9.46e + 6		9.00	1.07e + 7	

表 2 加异麦芽糖标准品试样的测定结果

试样	本底值	低加 标量	测定值	回收率 %	高加 标量	测定值	回收率 %
口服液	3.60	4.80	7.94	90.5	14.6	18.09	99.3
		4.80	8.00	91.7	14.6	17.08	92.3
口服液	3.60	4.80	8.19	95.8	14.6	18.35	101.0
		4.80	7.85	88.5	14.6	16.81	90.5
口服液	3.60	4.80	8.14	94.6	14.6	17.00	91.8
		4.80	8.54	103.0	14.6	17.89	97.9
$\bar{x}$			8.11	95.4		17.54	95.5
RSD %			3.0	4.4		3.7	4.7

表 3 加异麦芽三糖标准品试样的测定结果

试样	本底值	低加 标量	测定值	回收率 %	高加 标量	测定值	回收率 %
口服液	0	4.30	4.20	97.7	10.30	10.20	99.0
		4.30	3.89	90.5	10.30	9.40	91.3
口服液	0	4.30	4.01	93.2	10.30	10.00	97.1
		4.30	4.39	102.0	10.30	9.59	93.2
口服液	0	4.30	4.09	95.1	10.30	9.28	90.1
		4.30	4.14	96.2	10.30	9.79	95.1
$\bar{x}$			4.14	95.7		9.71	94.3
RSD %			3.9	4.1		3.6	3.6

2.4 最小检测量 异麦芽糖 2 μg;异麦芽三糖 10 μg;潘糖 5 μg。

2.5 本方法的线性范围 见表 1。

2.6 干扰试验 在混合标准溶液里加入适量葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、麦芽三糖进行干扰试验测定,结果均不干扰异麦芽糖的测定,干扰物与被测成分的分离情况见图 1 和图 2。

3 讨论

3.1 流动相的选择 流动相选用以 70 + 30、72 + 28、74 + 26、75 + 25、76 + 24、77 + 23、78 + 22 的乙腈 + 水做流动相进行分离实验,结果表明,78 + 22 的乙腈水分离效果最好,但此时灵敏度低,保留时间长。76 + 24 的乙腈水从分离效果上看已满足分离的要求,分析时间为 20 min。故选用 76 + 24 的乙腈水做流动相。

3.2 沉淀蛋白时乙醇量的选择 试样中的蛋白质不仅影响试样组分的分离效果,而且易损坏色谱柱,所以必须除去。试样溶液与无水乙醇的配比为 1 4

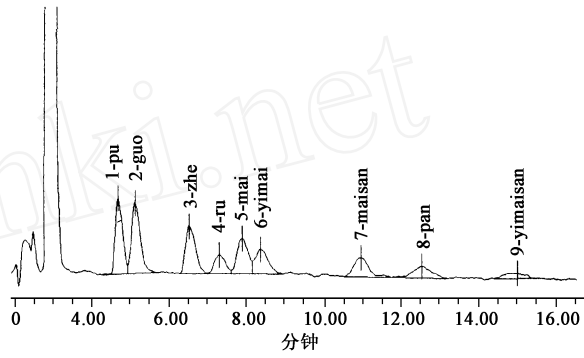


图 1 标准溶液色谱图

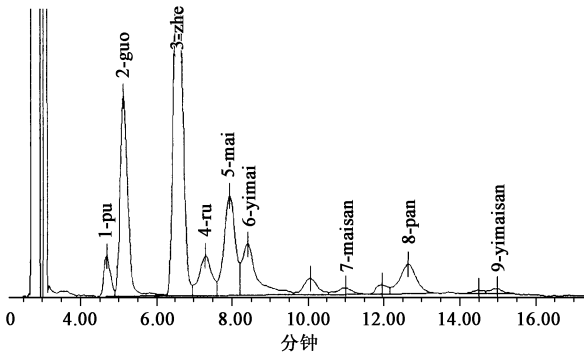


图 2 样品色谱

时蛋白沉淀效果最好,但试样稀释倍数太大,影响测量结果。试样溶液与无水乙醇的配比为 1 1 时蛋白沉淀效果也能满足实验需要,因试样稀释倍数小,含量低的试样也不影响测定结果。因此实验中选择试样溶液与无水乙醇的配比为 1 1。

3.3 计算方法的选择 我们选择外标法定量。因为外标法计算,不需要准确提取出试样中可溶性总糖的含量,只需除掉试样中杂质后,滤液即可直接进行色谱分析,结果准确可靠。面积归一法,需要准确提取出试样中的可溶性总糖的含量后才能计算异麦芽糖含量,因为试样中异麦芽糖含量 = 异麦芽糖 % × 总糖 ÷ 试样的质量,而准确提取出试样中总糖含量非常不容易,因为有蛋白质去除方法的问题(使用醋酸锌与无机盐沉淀蛋白质,增加固形物)、淀粉去除问题、总糖恒定问题(不易恒重)。

3.4 色谱柱的保护 用 NH₂ 色谱柱分析糖类,色谱柱易被污染,污染后柱效降低,所以分析完试样后,一定要用乙腈水较长地时间冲洗柱子,冲洗时可

以将乙腈水调至 70 + 30 ,经过一段时间的冲洗后 ,柱效即可恢复。

用过的乙腈水流动相 ,可经减压浓缩回收 ,实验证明回收的乙腈比新购买的色谱纯乙腈还好。如果有减压浓缩仪 ,乙腈可以反复使用 ,降低实验成本。

3.5 新安柱的使用 新购买的 NH_2 色谱柱是正相柱 ,用正己烷和异丙醇 (96 + 4) 保存。测定低聚糖时要将其转换成反相柱。

2 种转换方法如下 :

大连依利特的转换方法 ,顺序以正乙烷 ,异丙醇 ,二氯甲烷 ,甲醇作流动相 ,每步注意平衡 ,溶剂的顺序不要颠倒。每种流动相流经色谱柱的量为 20 ~ 30 倍柱体积。

美国 Varian NH_2 色谱柱的转换法为 :

- (1) 1 mL/min 异丙醇 ,20 min ;
- (2) 1 mL/min 水 ,20 min ;
- (3) 2 mL/min 0.1 mol/L H_3PO_4 (pH 1.5) ,30 min ;
- (4) 2 mL/min 水 ,100 min ;

(5) 2 mL/min 流动相 (大约 80 %乙腈 + 20 %水) ,30 min。

参考文献 :

- [1] 王清,郭家荣,张露. 高效液相色谱法测定异麦芽低聚糖的组成[J]. 食品与发酵工业,1998,24(4):28—30.
- [2] 李铃,许多,赵国良,等. 大豆中生物物质的分离与分析的研究(1):用 ODS 柱高效液相色谱法测定大豆中低聚糖[J]. 食品与发酵工业,1995,(3):44—47.
- [3] 袁建平,郭祀远,李林,等. 高效液相色谱法同时测定食品和药物中的糖及其降解产物 5-羟甲基糖醛[J]. 分析化学,1996,4(1):57—60.
- [4] Hussein HS, Campbell JM, Bauer LL, et al. Selected fructooligosaccharide composition of pet-food ingredients[J]. J Nutr, 1998,128(12 Suppl):2803S—2805S.
- [5] Casterline JL, Jr, Oles CJ, Ku J, et al. Measurement of sugars and starches in foods by a modification of the AOAC total dietary fiber method[J]. J AOAC Int, 1999,82(3):759—765.

Determination the isomaltoligosaccharide in beverage by high performance liquid chromatography/Chen Guiru, Qin Zhenshun, Chang Fengqi, et al. //Chinese Journal of Food Hygiene. - 2002,14(5):14 ~ 16.

Abstract: For determination the content of isomaltoligosaccharide in beverage, a high-performance liquid chromatography method was established by using 300 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm Hypersil- NH_2 column, acetonitrile + water = 78 + 22 as mobile phase, detector was differential refractometer with 40 internal temperature. The range of recoveries of isomaltose and isomaltotriose were 88.5 % ~ 101.1 % and 90.1 % ~ 102.0 % respectively, the $RSD < 5\%$. The limits of determination were as follow, isomaltose 2 μg , isomaltotriose 10 μg , panose 5 μg . The method had such characters, simple sample treatment, high sensitive, rapid and accurate, it could be used in determination of isomaltoligosaccharide in beverage.

Author's address: Chen Guiru, Hebei Center for Disease Control and Prevention, Baoding Hebei province 071000, PRC.

Key Words: Beverages; Isomaltose; Chromatography, Liquid

[收稿日期:2002 - 01 - 14]

《卫生部请示批复文件标准汇编》(1998 ~ 2002) 预征订启事

近年来,食品工业发展很快,国际国内重大食品卫生事件也时有发生,食品卫生工作的发展必须顺应形势、随之变化,特别是入世以来,食品卫生工作的发展更要跟上整个形势的变化;应广大读者和食品卫生工作者的要求,本刊准备对 1998 年至 2002 年的卫生部请示批复文件及标准进行汇编。现进行预征订,有意者请于 2002 年 12 月底前来函告知,以便我们根据征订情况进行汇编。

《中国食品卫生杂志》