

高效液相色谱法测定食品功能性低聚异麦芽糖

李黎, 邹雨佳, 唐华澄, 李东

(北京市营养源研究所分析室 北京 100069)

摘要:建立了高效液相色谱法测定食品中功能性低聚异麦芽糖含量的方法,获得了良好的分离效果。该法能快速、准确地定性、定量低聚异麦芽糖中各组分糖。采用示差折光检测器,氨基色谱柱,乙腈/水为流动相,方法重现性好,有理想的回收率,适用于商品的检测。

关键词:低聚异麦芽糖, 高效液相色谱法

Abstract:High performance liquid chromatography was used to determine the amount of isomaltoligosaccharide in functional foods with nice separation. The method we proposed is fast, accurate enough to determine several kinds of sugars contained in sample. The detector was Refractive Index Detector (RID -10A) NH₂-chromatographic column was used. The mobile phase was acetonitrile-water. The test of repeatability and recovery of this method was very nice. And the method is available for assay of different products.

Key words:isomaltoligosaccharide; HPLC

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)04-0179-03

低聚异麦芽糖(Isomaltoligosaccharide)又称分枝低聚糖(Branching oligosaccharide),是以淀粉为原料经酶解制得的一类低聚糖^[1,2]。由于它价廉易得和作为功能性食品所表现出的优良品质,已引起了世界各国的关注。它具有低甜度、低热值、抗龋齿、促进双歧杆菌增殖、改善肠道功能、增强机体免疫力等功效^[3]。其功能性成分包括异麦芽糖(isomaltose)、潘糖(panose)、异麦芽三糖(isomaltotriose)^[4]。

吴红京、唐根源等人采用C₁₈色谱柱、100%水为流动相测定低聚异麦芽糖结果良好;陈桂茹、秦振顺等人,蒋世琼、甘宾宾等人及王清、郭家荣等人均采用氨基色谱柱测定低聚异麦芽糖,流动相也都是乙

腈/水,只是分别采用不同的配比,这些试验也都取得了较好的效果。吴波采用碳水化合物分析柱,乙醇/水 80:20 为流动相分离测定低聚异麦芽糖结果也能令人满意^[5~10]。据报道,Karen Barsuhn 等人利用离子色谱法(HPIC)分离测定淀粉水解物中的麦芽糖和异麦芽糖。Sung-Joon Lee 等人也曾用 HPIC 法来进行异麦芽低聚糖的分析,但是几种分支四糖只出一个峰,然后再利用 uBondap-NH₂ 柱进一步分离分支四糖、五糖。Hotchkiss 等人用 Dynamax-60ANH₂ 柱分离 dp2~8 的麦芽低聚糖^[11~14]。本文在总结国内外方法的基础上,分别尝试采用氨基色谱柱,乙腈-水为流动相以及阳离子交换色谱柱(专用糖柱),100%水为流动相两种方法对低聚异麦芽糖进行测定。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

低聚异麦芽糖标准 麦芽糖、麦芽五糖(ACROS ORGANICS),异麦芽糖、异麦芽三糖、麦芽四糖(TCI),麦芽三糖、潘糖、异麦芽四糖(Sigma);乙腈,甲醇 色谱纯;乙醇 优级纯;三氯乙酸,乙酸锌,亚铁氰化钾 分析纯。

Shimadzu LC-10Avp 型高压液相色谱仪,LC-10Atvp 高压输液泵,RID-10Avp 示差折光检测器,SIL-10Advp 自动进样器,CTO-10Acvp 柱温箱,SCL-10Avp 中央控制器,Class vp 色谱工作站。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil NH₂ 氨基色谱柱(4.6×250mm);柱温 40℃;流动相: 乙腈:水 67:33 (v/v);流速: 1.0mL/min;进样量 20μL。

1.2.2 标准溶液的配制

1.2.2.1 标准储备液 准确称取 0.02g(精确至 0.001g)异麦芽糖、麦芽三糖、异麦芽三糖、麦芽四糖,

收稿日期: 2005-11-22

表 1 标准混合液浓度表

单位(mg/mL)	麦芽糖	异麦芽糖	麦芽三糖	异麦芽三糖	麦芽四糖	异麦芽四糖	潘糖	麦芽五糖
标准浓度 1	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.8	2.0
标准浓度 2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.4	1.0
标准浓度 3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.6
标准浓度 4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.4
标准浓度 5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2

表 2 样品中各糖的含量(%)

样品	麦芽糖	异麦芽糖	麦芽三糖	潘糖	异麦芽三糖	麦芽四糖	异麦芽四糖	麦芽五糖
1	8.58	16.91	2.69	8.46	10.85	1.42	1.54	1.91
2	3.15	6.22	2.55	0.41	6.58	2.29	2.88	3.23
3	2.59	18.69	2.90	3.14	3.05	2.63	-	3.56

潘糖、异麦芽四糖和麦芽五糖标准 ,分别用纯净水定容于 10mL 容量瓶中 ;另准确称取 0.05g(精确至 0.001g) 麦芽糖标准 ,用纯净水定容于 25mL 容量瓶中。

1.2.2.2 标准使用液 分别吸取以上标准贮备液 ,用甲醇配制成标准工作液 ,见表 1。

1.2.3 样品前处理 样品经溶解、除蛋白、定容、过滤进样。

1.2.4 定量方法 外标法。

1.2.5 结果计算

$$\text{糖含量(\%)} = \frac{F \times A_{\text{样品}}}{C}$$

式中 :

A_{样品}—样品中各组分的峰面积 ;

c—上机浓度=称样量 W / 定容体积 V ;

F—校正因子=标准浓度 C / 标准峰面积 A_{标准}。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法的选择

2.1.1 除蛋白试剂的选择 样品中含有大量蛋白 ,对糖测定时色谱出峰产生影响 ,本方法共采用了两种除蛋白试剂 ,结果显示 21.9% 乙酸锌和 10.6% 亚铁氰化钾各加 5mL 去除蛋白样品测定时在固定时间出现同样的峰 ,而用 50% 三氯乙酸去除蛋白不会出现这一问题。故本方法采用 50% 三氯乙酸去除蛋白。

2.1.2 样品超声时间的选择 超声时间对样品中糖的溶出程度影响不大。故本方法对样品进行 20min 超声振荡处理。

2.2 色谱柱的选择

本方法先后采用了两类不同原理的色谱柱 ,分别为氨基(键合相)色谱柱和阳离子交换色谱柱(专用糖柱)。这两类是当今用来测定糖类最常见的色谱柱 ,它们的测定原理不同 ,使用的流动相也有区别 ,同一种糖在两类色谱柱上的出峰情况也不相同。我们将后面结合流动相的不同选择对实验产生的影响来共同讨论。

2.3 流动相的选择

本方法从选择不同的流动相及相同流动相选择

不同配比两方面对实验结果进行了讨论。采用专用糖柱分析糖类样品时 ,一般都采用 100% 水作为流动相 ,本文最初采用这一条件对低聚异麦芽糖进行测定。结果显示 :混合标准和实际样品测定效果都不好 ,分析这一结果 ,低聚异麦芽糖组成成分很复杂 ,这一条件不足以使其达到完全分离。根据这一问题 ,我们改用乙腈 / 水 (10/90) 为流动相的色谱条件 ,以加大洗脱能力 ,但是效果仍然不理想。针对上述情况 ,我们改用氨基色谱柱 ,首先采用乙腈 / 水 (75/25) 流动相 ,分离效果不好。后调整为乙腈 / 水 (67/33) 流动相 ,取得良好的分离结果。

2.4 标准回归方程

根据实验数据求得麦芽糖、异麦芽糖、麦芽三糖、潘糖、异麦芽三糖、麦芽四糖、异麦芽四糖、麦芽五糖的线性回归方程依次为 :

$$y=0.00000550x + 0.09949685 (R^2=0.9912);$$

$$y=0.00000769x - 0.02658243 (R^2=0.9751);$$

$$y=0.00000552x + 0.00145331 (R^2=0.9877);$$

$$y=0.00000643x - 0.00042279 (R^2=0.9989);$$

$$y=0.00001441x - 0.00411445 (R^2=0.9998);$$

$$y=0.00000630x - 0.00224903 (R^2=0.9997);$$

$$y=0.00001437x - 0.00582476 (R^2=0.9996);$$

$$y=0.00001451x - 0.03036338 (R^2=0.9979).$$

2.5 样品的测定结果

样品经溶解、除蛋白、定容、过滤进样 ,利用标准回归方程求得样品中各组分的含量 ,表 2 列出所测样品中各糖含量(%)。

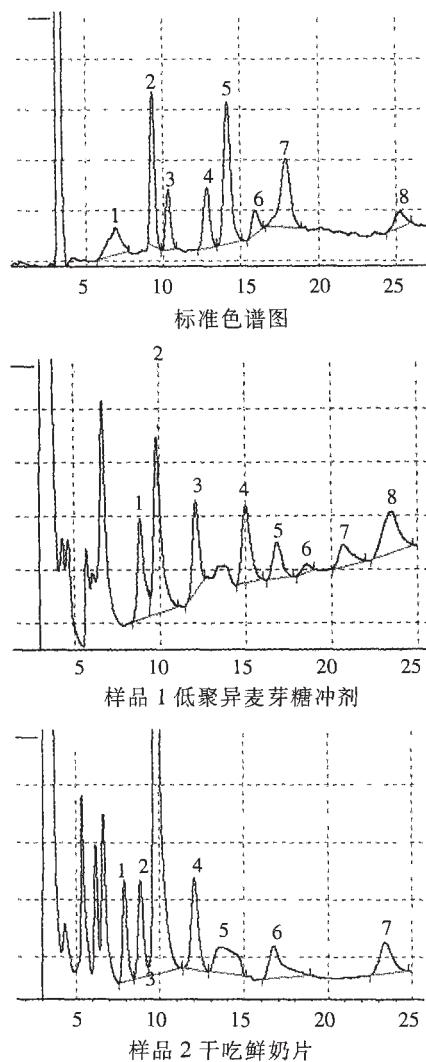
2.6 重复性实验

通过对样品 3 重复测定 ,结果显示 :样品测定值相对标准偏差(RSD%)在 1.53%~7.89% 之间 ,重复性较好。

2.7 回收率实验

我们对低聚异麦芽糖中主要的功能性组分异麦芽糖、潘糖和异麦芽三糖进行了回收率实验 ,结果显示 :平均回收率为 97.27% ,回收率较高 ,如图 1。

3 结论



1. 麦芽糖 2. 异麦芽糖 3. 麦芽三糖 4. 潘糖 5. 异麦芽三糖 6. 麦芽四糖 7. 异麦芽四糖 8. 麦芽五糖

图 1 标准及样品色谱图

本法是一种快速、准确的测定食品中低聚异麦芽糖的方法,即采用氨基色谱柱、乙腈/水 67:33 作为流动相、流速 1.0mL/min、柱温 40℃ 条件分离测定低聚异麦芽糖,平均回收率为 97.27%,样品测定值相对标准偏差为 1.53%~7.89% (n=5),结果显示本方法基本适用于市售商品的检测。

参考文献:

- [1] 郑建仙.低能量食品[M].北京:中国轻工业出版社,393~400.
- [2] 尤新.功能性低聚糖[J].食品工业科技,2001,22(6):1~4.
- [3] 郑建仙.低能量食品[M].北京:中国轻工业出版社,149~152.
- [4] 李茂龄.低聚异麦芽糖的应用及发展趋势.山东禹城环宇集团保龄宝生物公司.
- [5] 吴红京,唐根源,黄志通,李志达.测定异麦芽低聚糖组分的高效液相色谱法[J].分析测试学报,2002,21(1): 63~65.
- [6] 陈桂茹,秦振顺,常凤启,李存满,韩会新.饮料中异麦芽低聚糖的测定[J].中国食品卫生杂志,2002,14(5):14~16.
- [7] 马丽,蒋世琼,甘宾宾,杨海,梁智群.功能性异麦芽低聚糖的高效液相色谱分析[J].食品科学分析检验,1999(9):60~62.
- [8] 王清,郭家荣,张露.高效液相色谱法测定异麦芽低聚糖的组分[J].食品与发酵工业,Vol24(4):28~30.
- [9] 吴波.异麦芽低聚糖的高效液相色谱分析.中国油脂,2002,27(1):57~58.
- [10] 吴红京,唐根源,李志达,陈剑锋,张蓉真.高效液相色谱测定麦芽低聚糖的组分[J].色谱,1994,12(4):289~290.
- [11] [美]S.Suzanne Nielsen 著,杨严俊等译.食品分析(第二版)[M].北京:中国轻工业出版社,184~187.
- [12] Karen Barsuhn,et al. J Chromatogr[J],1991, 546(1~2): 273~287.
- [13] Sung-Joon Lee,et al. Starch[J],1995(4):127~134.
- [14] Arland T Hotchkiss,et al. Carbohydrate Research[J],1993,242:1~9.

(上接第 178 页)

表 2 葡萄糖对照实验收率及精密度

编号	加入量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	吸光度(A)	检出量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	收率(%)	平均收率(%)	RSD(%)
1	30.29	0.195	30.55	100.85		
2	50.48	0.329	51.52	102.06	100.94	1.02
3	70.67	0.457	71.55	101.25		
4	90.86	0.578	90.49	99.59		

- [2] Katsuraya Kaname, Okuyama Kobsaku, Hatanaka Keniehi. Constitution of Konjac glucomanna :chemical analysis and ^{13}C NMR spectroscopy[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 53:183~189.
- [3] T L Hendrixson, R P Millane. Crystal Structures of Mannan II and Konjac Mannan [J]. Polym Prepr (Am Chem Soc ,Div Polym Chem)[J].1992,33(1):329~330.
- [4] 吴万兴,李科友,李涵.魔芋精粉中甘露聚糖的测定方法

- [J].食品工业科技,1994,15(5):74~75.
- [5] 李斌,廖勇城,谢笔钧.高效液相色谱法测定魔芋精粉中魔芋甘聚糖含量[J].食品工业科技,2002,23(8):82~84.
- [6] 欧阳华学,韩梅,刘佩英,张盛林. 分光光度法测定魔芋葡甘露聚糖含量[J].西南农业学报,2002,15(1):109~111.
- [7] 张憔杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M].浙江:浙江大学出版社,1999.8~10.