

酶水解-离子色谱法测定乳粉中多聚果糖含量

白靖¹, 姜金斗^{2,*}, 陶大利²

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 农业部乳制品质量监督检验测试中心, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要: 建立果糖酶水解、离子色谱法测定乳粉中多聚果糖的方法。在醋酸缓冲溶液条件下加入果聚酶与葡聚酶, 60 ℃水浴1 h, 使多聚果糖与麦芽糊精全部分解为葡萄糖与果糖, 然后用离子色谱-电化学检测器分别测定酶解前后样品中果糖及蔗糖的含量, 从而计算多聚果糖的含量。色谱条件为: 色谱柱PA-1 (250 mm×4 mm, 4.6 μm), 梯度洗脱, 流速0.8 mL/min; 标准曲线回归方程为 $y=0.3488+3.6940x$, $r=0.9999$ (果糖); $y=0.1748+4.3504x$, $r=0.9997$ (蔗糖)。样品平均回收率为97.4%, 相对标准偏差为3.56%。果糖和蔗糖的定量限分别为1.3、1.2 ng/mL。该方法具有样品处理简便、灵敏度高、重复性好等优点, 可以用于调制乳粉及婴幼儿配方乳粉中多聚果糖含量的测定。

关键词: 乳粉; 果聚酶; 多聚果糖; 离子色谱

Determination of Polyfructose Content in Milk Powder by Enzymatic Hydrolysis Coupled with Ion Chromatography

BAI Jing¹, JIANG Jin-dou^{2,*}, TAO Da-li²

(1. School of Food, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Dairy Quality Supervision and Testing Center, Ministry of Agriculture, Harbin 150090, China)

Abstract: This study is intended to develop an analytical method to determine polyfructose in milk powder using enzymatic hydrolysis combined with ion chromatography. Fructanohydrolase and glucose polymerase were added to acetate buffer and incubate in 60 ℃ water bath for 1 h to completely decompose polyfructose and maltodextrin into glucose and fructose. The contents of fructose and sucrose before and after the enzymatic hydrolysis were analyzed by ion chromatography with electrochemical detection so that the content of the polyfructose could be calculated from the measured results. Chromatographic separation was carried out on a PA-1 column (250 mm×4 mm, 4.6 μm) by gradient elution at a flow rate of 0.8 mL/min. The calibration curve was $y = 0.3488 + 3.6940x$, $r = 0.9999$ for fructose, and $y = 0.1748 + 4.3504x$, $r = 0.9997$ for sucrose. The average recovery was 97.4% with a relative standard deviation of 3.56%. Limit of quantification was 1.3 ng/mL for fructose and 1.2 ng/mL for sucrose. This method was simple, sensitive, reproducible and applicable to determine polyfructose in modified milk powder and infant formula.

Key words: milk powder; fructanohydrolase; polyfructose; ion chromatography

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 02-0257-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201402050

多聚果糖是从菊苣根中提取的、具有保健功能的低聚糖, 由 α -果糖以 β -1,2糖甙键连接, 在其末端接一个葡萄糖残基而形成的, 分子式为 $(C_6H_{12}O_6) - (C_6H_{10}O_5)_n$ ($n=2\sim60$), 平均聚合度 (average degree of polymerization) ≥ 23 , 相对分子质量344~11 400。多聚果糖是一种优良的水溶性膳食纤维, 可以预防便秘与结肠癌、降低血液胆固醇、稳定血糖水平; 同时还是一种很好的“益生元”, 具有调节肠道菌群、增殖双歧杆菌、促进钙的吸收、促进免疫调节、抗龋齿等保健功能, 可减少肝脏毒素, 能在肠中生成抗癌的有机酸, 有显著的防癌功能^[1]。多聚果糖被誉为抗生素时代后最具

潜力的新一代添加剂——促生物质, 在法国被称为原生素 (hormone maternelle)。我国GB 14880—2012《食品营养强化剂使用标准》^[2]中规定婴幼儿配方食品、婴幼儿谷类辅助食品、儿童及孕产妇乳粉中多聚果糖的用量不超过64.5 g/kg。

多聚果糖的测定方法文献报道较少, 主要测定方法有液相色谱法、离子色谱法、分光光度法、酶联免疫试剂盒法等^[3-27]。由于婴幼儿乳粉及调制乳粉中碳水化合物主要含有葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖及麦芽糊精等, 成分复杂, 碳水化合物总含量大都在50%以上, 而强化的多聚果糖含量一般仅为0.5%~2.0%, 甚至不足0.1%, 采

收稿日期: 2012-10-09

作者简介: 白靖 (1982—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail: kqzjjzk@163.com

*通信作者: 姜金斗 (1960—), 男, 研究员, 硕士, 研究方向为食品仪器分析与安全。E-mail: jjindou@163.com

用色谱法测定多聚果糖其干扰物质较多,且能测定聚合度为2~4的低聚果糖部分^[4,6,11-18];酶联免疫法通过测定样品酶解前后果糖与蔗糖含量,进而计算得出多聚果糖含量,因试剂盒的稳定性、准确性等原因,其结果的准确性与重复性不甚理想;美国AOAC标准^[6-7]中制定的总果聚糖离子色谱法与分光光度法使用 β -淀粉酶、普鲁兰酶、麦芽糖酶、外切菊粉酶、内切菊粉酶等多种酶酶解后测定,操作步骤复杂、结果重复性差;多聚果糖本身成分复杂,主要是由聚合度为2~60的果聚糖组成,其中低聚果糖(聚合度为2~8)可溶于乙醇,而更高聚合度的果聚糖则属于不溶于乙醇,因此乙醇提取并沉淀蛋白方式也不适用于乳粉类样品中多聚果糖的测定,多聚果糖只能采用果聚酶水解的间接方法测定。

本实验建立的方法经果聚酶水解、离子色谱-电化学检测器测定酶解前后果糖与蔗糖的含量,计算样品中多聚果糖(含低聚果糖)的含量,操作简单、重复性和准确性好、成本低,可以满足乳品企业出厂检验与品控及质监部门监督的需要。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

醋酸钠、醋酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸天津科密欧公司;葡聚酶 美国Sigma公司;果糖酶瑞士Fluka公司;蔗果四糖 日本Wako公司;果糖、蔗糖 国家标准物质研究中心。

1.2 仪器与设备

HPLC-PAE离子色谱仪 美国Dionex公司;Sevenmulti酸度计 瑞士Mettler Toledo公司;DK-8AX水浴锅 上海一恒公司。

1.3 方法

1.3.1 试剂配制

醋酸缓冲液(pH 4.5): 0.2 mol/L醋酸钠溶液220 mL和0.2 mol/L醋酸溶液280 mL混合后稀释到1 L;磷酸盐缓冲液(pH 4.5): 分别称取1.24 g KH_2PO_4 、7.27 g K_2HPO_4 溶解于1 L去离子水中,用磷酸调pH值至4.5;葡聚酶(30~60 U/mg)、果糖酶(26.6 U/mg): 用磷酸盐缓冲液溶解配制成酶含量分别为1 mg/mL; 0.5 mg/mL蔗果四糖标准溶液: 称取50 mg标准品用水溶解并定容至100 mL;标准储备液: 分别准确称取果糖和蔗糖(真空干燥箱55 °C, 4 h)标准品各100 mg(精确至0.1 mg),用水溶解并定容至100 mL, 4 °C冰箱可保存1个月;果糖与蔗糖混合系列标准溶液的配制: 稀释标准储备液至果糖质量浓度分别2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$,蔗糖质量浓度分别为0.5、2.0、4.0、6.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.3.2 样品处理

称取约5 g样品(精确至0.1 mg)于锥形瓶中,加入40 mL 45~55 °C蒸馏水溶解样品,冷却至室温后转入

100 mL容量瓶中定容至刻度并混匀。A液: 吸取10 mL样液于50 mL试管中,加入10 mL醋酸缓冲液、1 mL果糖酶溶液混匀(若样品中含有麦芽糊精再加入1.5 mL的葡聚酶溶液), 60 °C水浴1 h。B液: 吸取10 mL样液于50 mL试管中,加入10 mL醋酸缓冲液。待A液取出并冷却后,将A、B液分别过滤后放于4 °C冰箱过夜充分酶解。从冰箱中取出滤液缓至室温后分别吸取1 mL至100 mL容量瓶中用去离子水定容至刻度, 0.2 μm 滤膜过滤。

吸取10 mL蔗果四糖标准溶液及10 mL醋酸缓冲液混匀后加入1 mL果糖酶溶液,设置不同水解时间(30、45、50、55、60、75、90 min)进行水解后,分别测定蔗果四糖含量,以确定最佳水解时间。

吸取10 mL蔗果四糖标准溶液及10 mL醋酸缓冲液混匀后加入不同体积的果糖酶溶液(0.5、1.0、1.5、2.0 mL), 60 °C水浴1 h后,分别测定蔗果四糖含量,以确定最佳酶用量。

1.3.3 色谱条件

色谱柱: Dionex PA-1 (250 mm $\times$ 4 mm, 4.6 μm); 保护柱: Dionex PA-1 (50 mm $\times$ 4 mm, 4.6 μm); 流速0.8 mL/min; 进样量20 μL ; 流动相: A为12.5 mmol/L NaOH溶液, B为125 mmol/L NaOH溶液, C为125 mmol/L NaOH-0.5 mol/L NaAc溶液; 梯度洗脱条件: 0~30 min, A:B:C=85:15:0 (V/V, 下同); 30~36 min, A:B:C=0:0:100; 36~51 min, A:B:C=85:15:0; 电化学检测器条件: 0.00~0.40 min, 电压0.05 V, 0.20 min开始积分, 0.40 min积分结束; 0.41~0.60 min, 电压0.75 V; 0.61~1.00 min, 电压-0.15 V。

分别将样液与果糖和蔗糖混合标准溶液注入离子色谱测定相应的峰高,外标法定量。

1.3.4 多聚果糖含量计算方法

平均聚合度按28、果糖折算成多聚果糖系数为0.90计算。

$$X = \frac{A_1 - A_2 - A_3}{1.9} \times 0.90$$

式中: X 为多聚果糖含量/(g/kg); A_1 为水解后果糖测定含量/(g/kg); A_2 为水解前果糖测定含量/(g/kg); A_3 为水解前蔗糖测定含量/(g/kg)。

2 结果与分析

2.1 样品处理的优化

2.1.1 缓冲盐体系

选用pH 4.5的酸度条件处理样品,可使蛋白质变性以去除蛋白质,同时也为酶水解提供了适宜的酸度条件。醋酸盐缓冲液与磷酸盐缓冲液条件下,酶水解效果有一定差异,其多聚果糖测定结果分别为7.58 g/kg与7.21 g/kg,因此醋酸盐缓冲液优于磷酸盐缓冲液。

2.1.2 酶解温度与时间

根据文献[7-8]及果聚酶的特点,适宜的酶解温度应为60℃左右。实验表明,不同的酶水解时间对水解效果影响明显(表1),酶解时间在1h及以上时可以达到全部水解的效果,本实验选用60℃、1h作为酶解温度与时间。

表1 酶水解时间对多聚果糖测定结果的影响
Table 1 Effect of enzymatic hydrolysis time on results of determination of polyfructose

酶解时间/min	30	45	50	55	60	75	90
蔗糖四糖测定结果/mg	2.61	3.52	4.15	4.51	4.99	4.98	4.99

2.1.3 果聚酶使用量及葡聚酶的使用

果聚酶的活性及用量是影响酶解效率的重要因素。结果表明,在60℃保持1h的条件下,酶用量低于1mg时,低聚果糖测定结果偏低;用量大于1mg时基本无变化,最终选用加入1mg果聚酶(表2)。

表2 果聚酶用量对样品多聚果糖含量测定结果的影响
Table 2 Effect of polymerase dosage on results of determination of polyfructose in samples

果聚酶用量/mg	0.5	1.0	1.5	2.0
多聚果糖测定结果/(g/kg)	5.85	7.62	7.58	7.60

由于婴幼儿配方乳粉及调制乳粉中常含有大量的麦芽糊精,会给样品处理带来困难,同时也可能会增加测定干扰,降低测定灵敏度,因此需要葡聚酶降解。由于葡聚酶的水解条件与果聚酶基本相同,在使用果聚酶处理样品的同时加入葡聚酶即可使麦芽糊精降解为葡萄糖。结果表明,用此处理方法后即可得到澄清的样液,其降解产物葡萄糖也不影响果糖等的定量测定。

2.2 样品测定

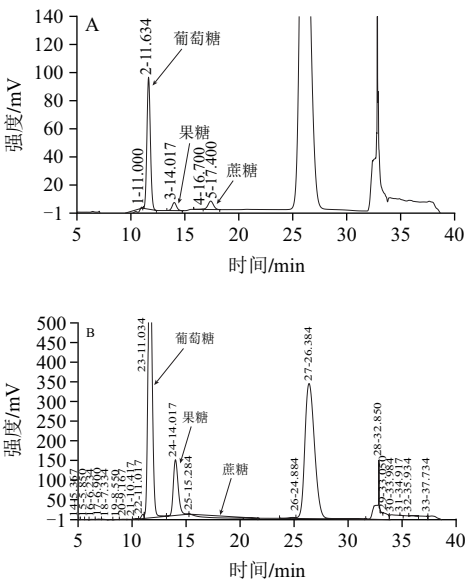


图1 婴幼儿配方乳粉酶水解前(A)、后(B)的色谱图
Fig.1 Chromatograms of infant formula before and after the enzymatic hydrolysis

采用1.3.3节中给出的流动相与检测器条件样品进行测定,其结果证明蔗糖、果糖与其他组分实现了有效分离,且基线噪声低、测定灵敏度高,可满足多聚果糖的测定(图1)。

2.3 线性范围与定量限

在1.3.3节色谱条件下,分别测定果糖与蔗糖的混合标准系列溶液。结果表明,在该范围内,质量浓度x与峰面积y呈良好的线性关系,果糖的线性回归方程为 $y=0.3488+3.6940x$, $r=0.9999$;蔗糖的线性回归方程为 $y=0.1748+4.3504x$, $r=0.9997$ 。果糖与蔗糖的定量限($R_{SN}=5$)分别为1.3、1.2 ng/mL。

2.4 方法的回收率和精密度

选取不含多聚果糖的中老年奶粉添加不同量的多聚果糖后测定其含量(添加前测定的多聚果糖的含量为6.96 g/kg),每个添加水平测定3次,计算回收率;含有多聚果糖的婴儿配方奶粉与儿童奶粉处理液分别进样6次,测定精密度。样品平均回收率为97.4%,相对标准偏差为3.56%(表3、4)。

表3 样品中多聚果糖回收率测定结果
Table 3 Recovery of polyfructose in spiked samples

样品	添加量/(g/kg)	实测结果/(μg/kg)	加标回收率/%
中老年奶粉	5.0	5.09	101.8
		4.89	97.8
		4.92	98.4
	10.0	9.85	98.5
		9.71	97.1
		9.87	98.7
	15.0	14.23	94.9
		14.35	95.7
		14.13	94.2

表4 精密度测定结果
Table 4 Precision of the analytical method

样品	6次测定结果/(g/kg)	平均值/(g/kg)	相对标准偏差/%
婴儿配方奶粉	10.81, 11.03, 10.29, 10.57, 11.52, 10.68	10.82	3.91
儿童奶粉	7.88, 8.02, 8.59, 8.12, 7.93, 8.25	8.13	3.21

3 结论

本实验建立采用酶水解-离子色谱法测定乳粉中多聚果糖的方法。通过对样品前处理方法的优化,确定了采用醋酸缓冲液处理、加入1 mg果糖酶、60℃水浴1h使多聚果糖完全水解。通过测定水解前后果糖与蔗糖的含量即可计算出样品中多聚果糖的含量。果糖与蔗糖测定的定量限分别为1.3、1.2 ng/mL。对于含有麦芽糊精的样品,需加入葡聚酶水解成葡萄糖,以去除因麦芽糊精造成样液过滤困难及滤液浑浊的问题,经实验验证加入葡聚酶水解后对多聚果糖的测定无影响。该方法具有样品处理简单、重复性好、灵敏度高优点。

参考文献:

- [1] 周景欣, 袁杰利, 迟俐, 等. 双歧杆菌低聚果糖制剂对便秘人群肠道菌群的调整作用[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(5): 399-400.
- [2] 中华人民共和国卫生部. GB 14880—2012 食品营养强化剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [3] 张媛媛, 聂少平, 万成, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定单糖、双糖及低聚果糖[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 237-239.
- [4] 孙彦璞, 杨文远, 姜玲. 高效液相色谱法测定菊粉酶解产物[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2003, 30(1): 109-110.
- [5] 许秀敏, 龙朝阳, 鲁琳, 等. HPLC-ELSD法测定食品中低聚果糖的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 2002-2003.
- [6] Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 997.08. Fructans in food products-ion exchange chromatographic method[S]. Gaithersburg: AOAC International, 1999.
- [7] Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 997.03. Determination of total fructans in food-enzymatic/spectrophotometric method[S]. Gaithersburg: AOAC International, 1999.
- [8] LOBO A R, FILHO J M, ALVARES E P, et al. Effects of dietary lipid composition and inulin-type fructans on mineral bioavailability in growing rats[J]. Nutrition, 2009, 25(2): 16-25.
- [9] MATUSEK A, MERERESZ P, LE T K D, et al. Effect of temperature and pH on the degradation of fructo-oligosaccharides[J]. European Food Research Technology, 2009, 228(3): 355-365.
- [10] 甘宾宾. 高效液相色谱法测定低聚果糖的组分[J]. 色谱, 1999, 17(1): 87-88.
- [11] 张志国, 生庆海, 卢彦君, 等. HPLC法检测低聚果糖的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 221-223.
- [12] 张绩冕, 刘玉峰, 唐华澄, 等. 高效离子色谱法测定食品中低聚果糖的含量[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(1): 135-137.
- [13] 王美茜, 李敏, 郭健, 等. 离子交换色谱法测定保健食品中低聚果糖的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(6): 961-963.
- [14] 傅博强, 王晶, 王远兴, 等. 食品中低聚果糖高效液相色谱检测方法研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 370-374.
- [15] 朱炜, 那斯琴高娃, 徐向峰, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器分析配方乳粉中的低聚果糖[J]. 中国食品工业, 2010, 31(5): 62-63.
- [16] 刘玉峰, 李东, 唐华澄, 等. 高效离子色谱法测定乳及乳制品中低聚果糖含量[J]. 乳业科学与技术, 2012(1): 40-42.
- [17] 杨成金, 黄桦, 黄永坤, 等. HPLC及LC-MS技术在低聚糖检测中的应用[J]. 现代科学仪器, 2011, 21(6): 147-150.
- [18] 陈芳, 龙军标, 周金森. 离子色谱在食品检测中的应用最新进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 933-935.
- [19] 陈青川, 牟世芬. 离子色谱法在食品分析中的最新应用[J]. 色谱, 2000, 18(2): 121-123.
- [20] 关翠林. 离子色谱法在食品分析中的应用[J]. 雁北师范学院学报, 2001, 17(3): 50-51.
- [21] 周梅素, 郭东龙. 离子色谱法在食品工业分析中的应用[J]. 山西食品工业, 1997(2): 31-33.
- [22] 朱岩, 徐素君. 低聚糖的脉冲安培检测阴离子色谱测定法[J]. 色谱, 1990, 8(5): 315-316.
- [23] 李建文, 王竹, 杨月欣. 高效离子色谱法测定糖浆中低聚半乳糖含量[J]. 卫生研究, 2006, 35(5): 584-586.
- [24] 张磊, 周光明, 熊建飞. 离子色谱法检测水果、饮品中的蔗糖、葡萄糖和果糖[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 159-162.
- [25] 刘晓玲, 李东刚, 史娟, 等. 离子色谱-脉冲安培检测器分析饮料中单糖和二糖[J]. 光谱实验室, 2010, 27(2): 441-445.
- [26] 王文辉, 彭永芳. 低聚果糖HPLC的快速测定[J]. 食品科学, 1999, 20(3): 53-54.
- [27] 那红萍, 苑向杰. 高压液相色谱法测定婴儿配方奶粉中低聚果糖[J]. 生命科学仪器, 2011(6): 41-42.