

乳粉中低聚木糖含量检测方法的研究

王艳华¹, 胡伟^{2*}, 贺满平¹, 夏敦岭¹, 马利军²

1、内蒙古欧世蒙牛乳制品有限公司, 内蒙古呼和浩特 011500

2、内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 内蒙古呼和浩特 011500

【摘要】目的: 建立高效液相色谱法检测乳粉中低聚木糖的快速检测方法。**方法:** 试样中的低聚木糖经酸水解成木糖, 使用碱中和, 经 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (5-Methyl-2-phenyl-1,2-dihydropyrazol-3-one, PMP) 衍生后用三氯甲烷净化提取, 高效液相色谱-紫外检测器检测, 使用外标法定量。**结果:** 该方法检测低聚木糖回收率范围在 85.6% ~ 97.4% 之间, 相对标准偏差在 1.02% ~ 4.23% 之间, 最低检出限为 0.05g/100g。**结论:** 该方法准确、快速、分离度好, 适用于乳粉中低聚木糖含量的测定。

【关键词】 低聚木糖; 乳粉; PMP-衍生; 液相色谱-紫外检测器

【中图分类号】 TS252.7; TS278 **【文献标识码】** A **【DOI】** 10.12325/j.issn.1672-5336.2022.14.014

Study on the detection method of xylo-oligosaccharide in milk powder

【Abstract】 Objective: To establish a rapid detection method for xylo-oligosaccharides in milk powder by high performance liquid chromatography. Method: The xylo-oligosaccharide in the sample is hydrolyzed into xylose by acid, neutralized by alkali, and then processed by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (5-Methyl-2-phenyl-1, 2-dihydropyrazol-3-one, PMP) was derivatized, purified and extracted with chloroform, detected by high performance liquid chromatography-ultraviolet detector, and quantified by external standard method. Results: The recovery rate of xylo-oligosaccharides detected by this method ranged from 85.6% to 97.4%, the relative standard deviation was between 1.02% and 4.23%, and the minimum detection limit was 0.05g/100g. CONCLUSION: The method is accurate, rapid and has good separation, and is suitable for the determination of xylo-oligosaccharides in milk powder.

【Key words】 xylo-oligosaccharides; milk powder; PMP-derivatization; liquid chromatography-ultraviolet detector

引言

低聚木糖 (xylooligosaccharide) 同时也被称为木寡糖, 具有 2 ~ 7 个木糖残基以 β -1,4 糖苷键结合而形成的低聚糖化合物, 木二糖、木七糖是其主要组成成分^[1-2]。因其具有很好的加工特性, 现被广泛地应用于各种功能性食品中, 作为功能性食品配料原料^[3]。低聚木糖也具有选择性能促进肠道中益生菌的生长功能^[4-6], 并使其成为肠道中的优势菌群, 从而起到调节肠道中微生态的平衡功能, 因此, 低聚木糖同时亦被称为超强的双歧因子^[7]。低聚木糖不但可以选择性地促进肠道中双歧杆菌和嗜酸乳杆菌的增殖, 同时可以吸附大肠杆菌等病原菌, 便可携带大量附着的病原菌经肠道排出体外, 因此可以改善人体肠道健康。此外, 低聚木糖还可以作为一类益钙因子, 促进钙在肠道中的吸收^[8]。同时也可以加速脂肪的代谢, 还可以预防龋齿^[9], 并作为抗氧化剂^[10]。因其具被较好

的化学稳定性^[11], 已被广泛地应用于食品加工中。另外, 低聚木糖还可以促进人体钙、镁、磷等微量元素吸收, 降低人体胆固醇, 降低患糖尿病风险, 抗氧化、抗过敏、抗感染、控制血糖平衡、免疫调节、同时还具有清除人体自由基的能力^[12-15]。由于, 低聚木糖本身特性的原因导致其在紫外区无吸收, 使用紫外法无法直接测定。目前对木糖等单糖类物质进行检测多采用液相色谱-示差折光检测器, 但其检测器灵敏度较低而且不能进行梯度洗脱^[16]。许国辉等^[17]利用柱前衍生的方法检测了润肠通便类保健食品中低聚木糖的浓度, 本方法首先将其水解为单糖, 并与 PMP 进行衍生化后再利用 HPLC-UV 法检测乳粉中低聚木糖含量。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品来源于内蒙古欧世蒙牛乳制品有限公司。

作者简介: 王艳华 (1970—), 女, 汉族, 内蒙古呼和浩特市, 硕士, 中级工程师, 实验室高级经理, 研究方向: 食品安全检测。

贺满平 (1982—), 男, 汉族, 内蒙古呼和浩特市, 本科, 集团供应链负责人, 研究方向: 食品安全生产。

夏敦岭 (1981—), 男, 汉族, 陕西省西安市, 硕士, 工厂质量负责人, 研究方向: 食品安全风险。

马利军 (1973—), 男, 汉族, 内蒙古呼和浩特市, 本科, 中级工程师, 检验管理部高级总监, 研究方向: 食品安全检测。

* **通讯作者:** 胡伟 (1982—), 男, 汉族, 江西省南昌市, 硕士, 中级工程师, 质量管理评审部高级总监, 研究方向: 食品安全风险。

以下试剂,除特殊标明以外均为分析纯试剂,水应为符合国标 GB/T 6682-2008 中规定的一级水要求; D-木糖标准品: CAS: 58-86-6, 纯度 $\geq 99.0\%$ (10mg, 美国, Sigma 公司); 乙腈(色谱纯, 德国, 默克股份有限公司); 甲醇(色谱纯, 德国, 默克股份有限公司); 浓硫酸(优级纯, 西陇科学股份有限公司); 氢氧化钠(优级纯, 西陇科学股份有限公司); 衍生剂: 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)(分析纯, 天津市, 光复精细化工研究所); 三氯甲烷(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 浓盐酸(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 无水乙醇(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 乙酸铵(分析纯, SIGMA-ALORICH)

5% 氢氧化钠溶液: 准确称取 5g 氢氧化钠, 用水溶解后转移并定容至 100mL 容量瓶中。0.3mol/L 氢氧化钠溶液: 准确称取 1.2g 氢氧化钠, 用水溶解后转移并定容至 100mL 容量瓶中。4mol/L 硫酸溶液: 准确量取 7mL 水于烧杯中, 加入 2.00mL 浓硫酸。0.5mol/L PMP 甲醇溶液: 称取 PMP 0.44g, 加入 5mL 甲醇溶液。0.3mol/L 盐酸溶液: 准确量取 1.25mL 浓盐酸于 50mL 容量瓶中, 加水定容至刻度。5.0mg/mL 标准储备溶液: 准确称取 D-木糖 50mg 于称量舟内, 用水溶解后定容至 10mL 容量瓶中。1.0mg/mL 标准中间溶液: 准确吸取 5.0mg/mL 标准储备溶液 5mL 于 25mL 容量瓶中, 用水稀释并定容至刻度线。标准工作溶液: 准确吸取适量标准中间溶液稀释成 0.00mg/mL、0.002mg/mL、0.005mg/mL、0.01mg/mL、0.02mg/mL、0.03mg/mL 的标准工作溶液。

1.2 仪器与设备

1260 II 高效液相色谱仪配紫外检测器(美国安捷伦); ME204E102 万分之一天平(美国梅特勒); ME204 十万分之一天平(美国梅特勒); LG16-WS 离心机(湘仪); RV10DS96 旋转蒸发器(德国 IKA); 漩涡混合器(德国 IKA); KQ-700DE 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9145A 鼓风干燥箱(苏州江东精密仪器有限公司);

1.3 实验方法

1.3.1 样品提取和水解

准确称取混合均匀后的样品约 1g(精确到 0.1mg), 于 50mL 容量瓶中, 加入 10mL 40℃ 温水溶解样品, 超声溶解 10min 后, 加 95% 乙醇至 3/4 处混合, 最后定容至刻度线, 混合。取 30mL 样品于 50mL 离心管中, 5000r/min 常温离心 5min。准确吸取 25.00mL 上述样品于 100mL 旋转蒸发瓶中, 加入 10mL 无水乙醇, 在 85℃ \pm 5℃ 下旋转蒸发至近干, 再加入 10mL 无水乙醇继续旋转蒸发, 直至无任何液体。向旋转蒸发瓶中准确加入 25.00mL 水, 充分溶解。

该溶液为水解前样品溶液 M₁, 备用。

准确吸取水解前样品 M₁ 10.00mL 于 50mL 高温水解管中, 加入 1.8mL 4mol/L 硫酸溶液, 旋紧盖子, 于 105℃ 干燥箱中水解 2h 后, 取出冷却至室温, 用 5% 氢氧化钠溶液中和, 将 pH 调到 6~7 后转移至 100mL 容量瓶中, 加水定容至刻度线, 该溶液为水解后样品溶液 M₂, 备用。

1.3.2 衍生和净化

分别准确吸取标准工作溶液(0.00mg/mL、0.002mg/mL、0.005mg/mL、0.01mg/mL、0.02mg/mL、0.03mg/mL)、水解前后样品溶液 M₁ 和 M₂ 各 400 μ L 于高温水解管中, 分别加入 0.5mol/L PMP 甲醇溶液和 0.3mol/L 氢氧化钠溶液各 400 μ L, 充分混合均匀, 70℃ 水浴衍生化反应 100min, 冷却至室温, 加入 0.3mol/L 盐酸溶液 500 μ L 中和样品。加入 3mL 三氯甲烷溶液后, 混合 30s, 静置 5min 分层, 弃去下层的三氯甲烷溶液, 重复上述步骤 2 次, 取上层溶液 5000r/min 离心 5min 后过 0.45 μ m 有机滤膜, 供液相色谱测定。

1.3.3 结果计算

1.3.3.1 水解前样品中木糖的含量 X₁(g/100g):

$$X_1 = \frac{C_1 \times V}{m \times 10}$$

式中:

X₁: 水解前试样中的木糖的含量, g/100g;

C₁: 水解前试样中的木糖浓度, mg/mL;

V: 定容体积, (50mL);

m: 试样质量, g。

1.3.3.2 水解后样品中木糖的含量 X₂(g/100g):

$$X_2 = \frac{C_2 \times V \times f}{m \times 10}$$

式中:

X₂: 水解后试样中的木糖的含量, g/100g;

C₂: 水解后试样中的木糖浓度, mg/mL;

V: 定容体积, (50mL);

m: 试样质量, g;

f: 水解过程中的稀释倍数, 10。

1.3.3.3 样品中低聚木糖的含量 X(g/100g):

$$X = (X_2 - X_1) \times F$$

式中:

X: 样品中低聚木糖的含量, g/100g;

X₁: 水解前样品中木糖的含量, g/100g;

X₂: 水解后样品中木糖的含量, g/100g;

F: 木糖转换为低聚木糖的系数, 0.940。

计算结果在重复性条件下, 以获得的两次测定结果算术平均值表示, 结果需保留 3 位有效数字。

表 1 样品的准确度和标准偏差分析 (n=6)

样品基质	加标量 (g/100g)	平均结果 (g/100g)	回收率 (%)	RSD(%)
奶粉	0.05	0.045	85.6 ~ 96.4	4.23
	0.1	0.096	95.6 ~ 96.6	1.23
	0.5	0.48	94.8 ~ 97.4	1.02

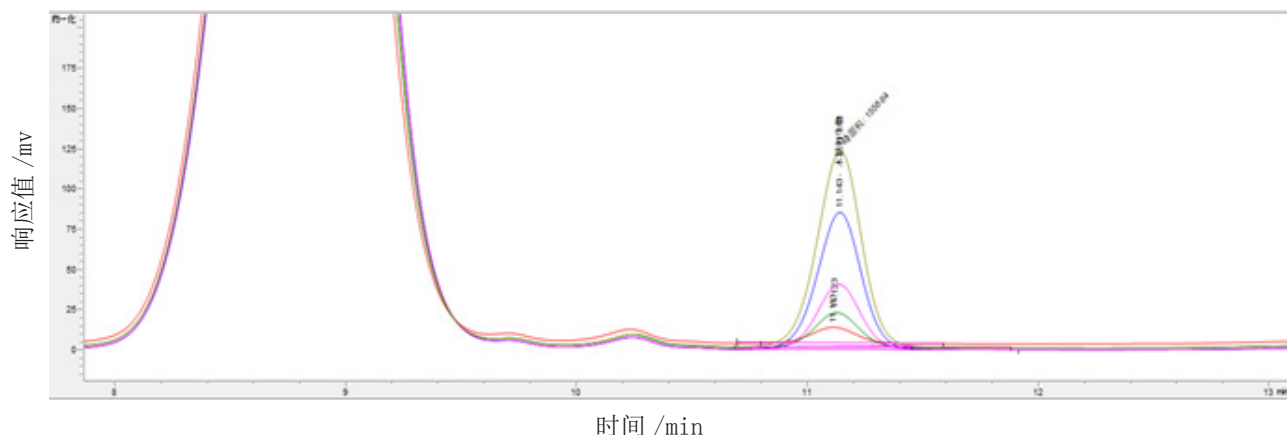


图 1 标准溶液色谱图

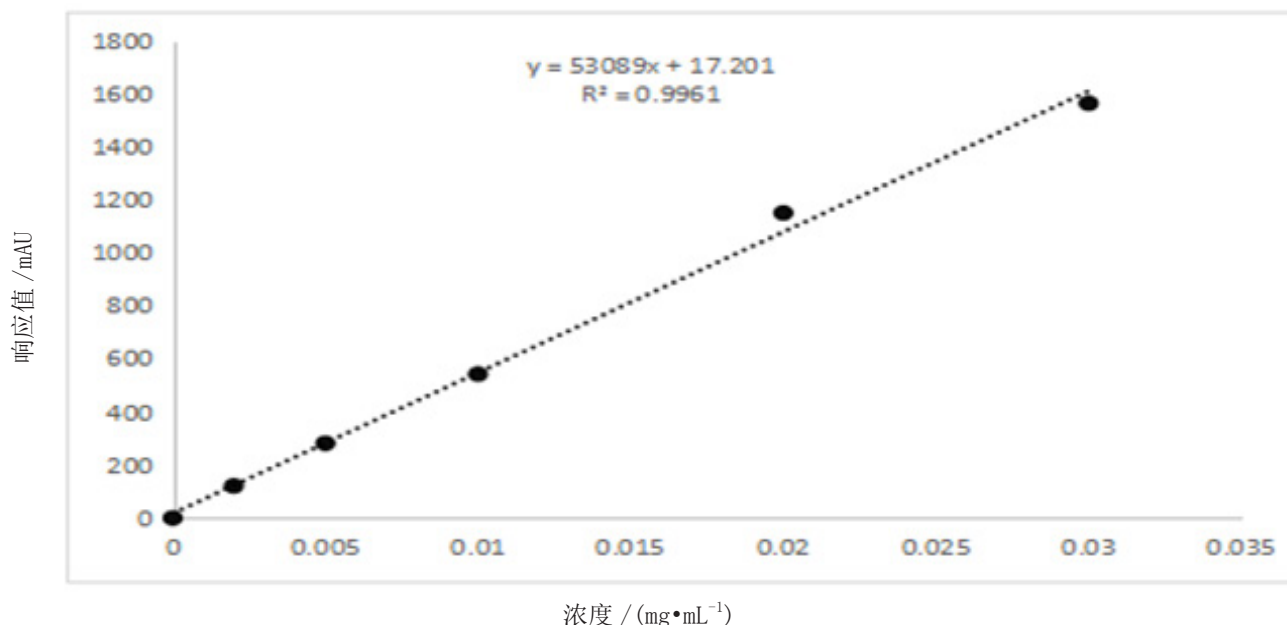


图 2 标准曲线图

1.4 色谱条件

C_{18} 色谱柱: 4.6mm \times 250mm, 粒径 5 μ m 或等效色谱柱; 流动相: 0.02mol/L 乙酸铵-乙腈 (76:24); 柱温箱为: 30 $^{\circ}$ C; 流速为: 1.0mL; 波长为: 250nm; 进样量为: 10 μ L;

备注: 以上为仪器的参考条件, 在实际操作过程中可以根据实际情况进行适当调整。

2 结果与分析

2.1 准确度和标准偏差

在奶粉样品中加入 3 个浓度的低聚木糖进行加标回收率实验, 回收率范围在 85.6% ~ 97.4% 之间, RSD 范围

在 1.02% ~ 4.23% 之间, 结果见表 1。

2.2 相关图谱及相关线性

如图 1、图 2、图 3 结果表明, 目标物分离度较好, 浓度为 0.002 ~ 0.03mg/mL 范围内, 线性回归方程为: $Y=5388X+17.201$, 线性相关系数 (R^2) 为 0.9961。

3 结论与讨论

目前检测低聚木糖的含量多数采用高效液相色谱法-示差折光检测器^[18], 该方法的优点是样品前处理高效, 但是仪器检测器分离度较差、灵敏度较低, 而且需要在视差检测器和氨基柱上才可完成, 对设备的要求相对较高。本文将低聚木糖先水解生成木糖, 再与 PMP 反应生

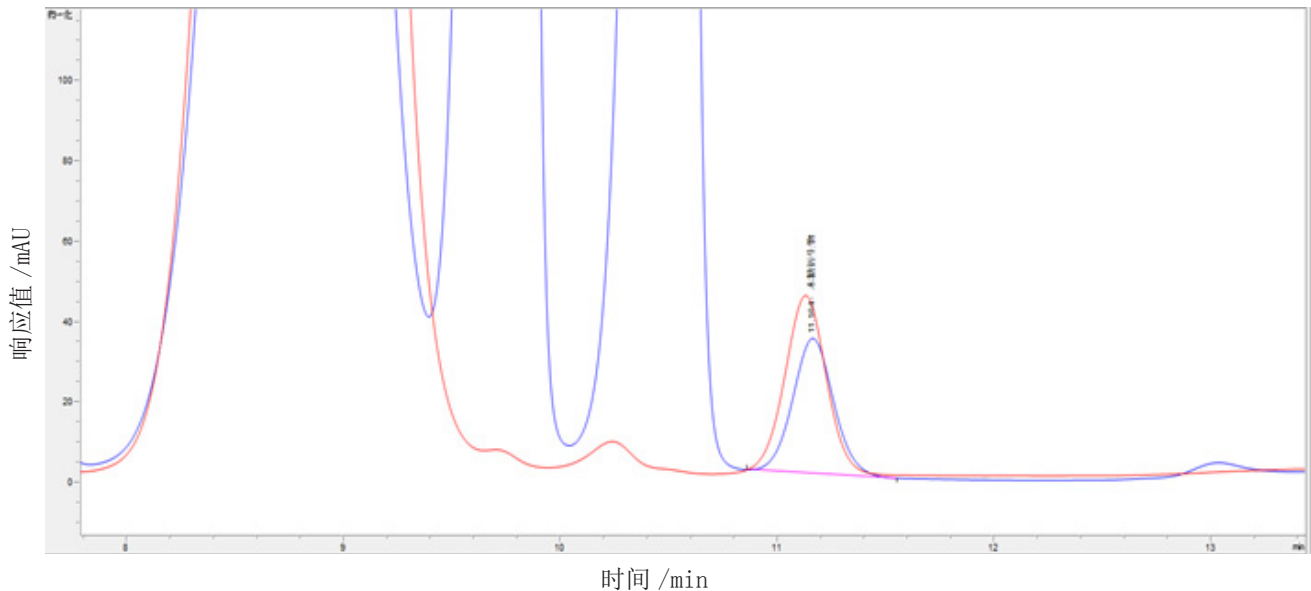


图3 加标样品色谱图

成木糖-PMP 衍生物^[19],再用高效液相色谱-紫外检测器检测。

本研究建立了一种乳粉中低聚木糖检测的液相色谱方法。该方法简单高效、分离度较好、准确性较好、灵敏度较高、重复性较好,检出限为0.05g/100g,平均回收率范围为85.6%~97.4%,RSD范围为1.02%~4.23%,能较好地满足奶粉中低聚木糖的检测需求。

参考文献:

- [1] 魏长庆,童军茂,单春会.功能性低聚木糖的研究开发及应用[J].农产品加工·学刊,2007(1):40-42.
- [2] 高畅,姜文月,廉淑梅,等.PMP衍生测定低聚木糖含量[J].亚太传统医药,2019,15(3):47-49.
- [3] 尹利端,王立志,董丛超.低聚木糖在保健食品中的应用[J].农业工程技术(农产品加工),2008(6):29-31.
- [4] 张晓萍,段钢.功能性低聚糖酶法制备研究进展[J].食品与发酵工业,2011,37(4):159-165.
- [5] 刘泰然,李洁,刘平,陈忠辉,罗仁才.高效液相色谱-示差折光法测定保健食品中的低聚木糖[J].中国食品卫生杂志,2012,24(2):132-135.
- [6] 张超然,王墨阳,林林.利用HPLC内标法测定益生菌类保健食品中低聚木糖的含量[J].食品安全导刊,2001(10):86-88.
- [7] 张小爱.低聚木糖的生产及应用研究进展[J].中国食品添加剂,2009(Z1):261-266.
- [8] 王立,薛腊梅,李言,钱海峰,张晖,齐希光,吴港城.低聚木糖的生理活性研究进展[J].食品与生物技术学报,2018,37(6):561-571.
- [9] 罗君,刘毅,李庆国,李国强,黄健,张建玲.离子色谱-积分脉冲安培检测法测定低聚木糖颗粒中低聚木糖的含量[J].微量元素与健康研究,2014(6):53-54.
- [10] 胡彪,刘芳,全亮.低聚木糖性质与应用研究进展[J].湖北农业科学,2010,49(2):479-482.
- [11] 王冲,林伟斌.高效液相色谱法测定口服液中低聚木糖的含量[J].现代测量与实验室管理,2015(2):6-8.
- [12] Gullón P, González-Muñoz MJ, Parajó JC. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes[J]. Bioresource technology, 2011, 102(10):6112-6119.
- [13] 邓元元,胡超,兰时乐.HPLC-ELSD法测定啤酒糟酶解物中低聚木糖[J].中国农学通报,2019,35(1):134-143.
- [14] Vázquez MJ, Garrote G, Alonso JL, Domínguez H, Parajó JC. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies[J]. Bioresource technology, 2005, 96(8):889-896.
- [15] 范丽,徐勇,连之娜,勇强,余世袁.高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法定量测定低聚木糖样品中的低聚木糖[J].色谱,2011,29(1):75-78.
- [16] 张玲,丁长河,阮文彬.低聚木糖的应用研究和产品开发进展[J].粮食与油脂,2015,28(2):9-12.
- [17] 许国辉,肖萍,尹吉增,洪新宇,谭延斌,宁俊.低聚木糖对大鼠粪钙、尿钙的影响[J].中国食品添加剂,2011(1):164-166,204.
- [18] 叶少文.保健食品中低聚木糖含量测定[J].食品安全质量检测学报,2016,7(11):4683-4686.
- [19] 解宇晨,马媛,杨小敏,张亚飞,胡鹏.低聚木糖在面包中的应用[J].粮食与食品工业,2015,22(2):57-60.