

# 高效液相色谱-蒸发光散射检测法快速测定益生菌粉中低聚果糖含量

王德伟\*, 游景水, 叶礼红, 叶少文  
(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法, 快速洗脱分离出蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖, 测定益生菌粉中低聚果糖的含量。 **方法** 样品经过前处理, 以乙腈和水为流动相, 等度洗脱, 经 XAmide (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 中性酰胺色谱柱分离, 采用蒸发激光检测器检测。 **结果** 蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖线性范围分别在 0.2671 ~ 3.168 mg/mL、0.2429 ~ 2.8215 mg/mL、0.1617 ~ 3.544 mg/mL, 线性相关系数  $r > 0.99$ 。3种主要组成的回收率在 97.0% ~ 105.0% 之间。 **结论** 该方法可有效分离出蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖, 推广性高、快速、简便、准确, 可用于益生菌粉中低聚果糖含量的测定。

**关键词:** 低聚果糖; 高效液相色谱-蒸发激光散射检测法; 益生菌粉

## Rapid determination of fructo-oligosaccharides content in probiotic powder by high performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detector

WANG De-Wei\*, YOU Jing-Shui, YE Li-Hong, YE Shao-Wen  
(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a rapid determination for the rapid separate kestose, nystose and 1F-fructofuranosyl nystose by high performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detector (HPLC-ELSD) method, and the concentration of fructo-oligosaccharides can be determined in probiotics powder.

**Methods** After pretreatment of samples, acetonitrile and water as the mobile phase, while the elution method was gradient elution, the samples were separated by XAmide (4.6 mm×250 mm, 5 μm) neutral amide chromatographic column, and detected by evaporative laser detector. **Results** The linear ranges of kestose, nystose and 1F-fructofuranosyl nystose were from 0.2671 to 3.168 mg/mL, 0.2429 to 2.8215 mg/mL and 0.1617 to 3.544 mg/mL, respectively, and the linear correlation coefficient  $r > 0.99$ . The recovery rate of the 3 compositions was between 97.0% ~ 105.0%. **Conclusion** This method can effectively separate the kestose, nystose and 1F-fructofuranosyl nystose. It is a high generalization, rapid, simple and accurate method, and can be applied for the determination of fructo-oligosaccharides in probiotics powder.

**KEY WORDS:** fructo-oligosaccharides; high performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detector; probiotic powder

\*通讯作者: 王德伟, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 790007532@qq.com

\*Corresponding author: WANG De-Wei, Licensed Pharmacist, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 790007532@qq.com

## 1 引言

低聚果糖又称蔗果低聚糖,是由1~3个果糖基通过 $\beta(2-1)$ 糖苷键与蔗糖中的果糖基结合生成的蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖等的混合物<sup>[1]</sup>。低聚果糖是一种天然活性物质。甜度为蔗糖的0.3~0.6倍。既保持了蔗糖的纯正甜味性质,又比蔗糖甜味清爽。是具有调节肠道菌群<sup>[2-3]</sup>、增殖双歧杆菌、促进钙的吸收<sup>[4-5]</sup>、调节血脂<sup>[6]</sup>、通便<sup>[7]</sup>、免疫调节和抗龋齿等保健功能的新型甜味剂,被誉为继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(PPE),已在乳制品、乳酸菌饮料、固体饮料、糖果、饼干、面包、果冻、冷饮等多种食品中应用<sup>[8-11]</sup>。目前对低聚果糖检测方法主要为高效液相色谱-蒸发光散射检测法<sup>[12-14]</sup>、示差检测法等<sup>[15]</sup>,现有检测方法不能有效分离蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖,分离度不高,重复性差,不能有效分离低聚果糖进行定量,本方法根据低聚果糖特性,优化后建立本方法,本方法操作简单,重复性高,推广性强。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

美国 Waters Acquity UPLCH-CLASS 型高效液相色谱仪(带蒸发光检测器);KQ-500E 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);XW-80A 型旋转混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);XP-205 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo)。

乙腈(色谱纯,安谱科技有限公司);蔗果三糖对照品(日本 wako;批号:TLH5913);蔗果四糖对照品(日本 wako;批号:TLH5913);蔗果五糖对照品(日本 wako;批号:TLH5913)。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: XA<sub>mid</sub>e, 5  $\mu$ m 4.6 mm $\times$ 250 mm 中性酰胺色谱柱;流动相: 乙腈:水=70:30(V:V);流速: 1.0 mL/min;漂移管温度: 75  $^{\circ}$ C;载气压力: 35 psi;增益: 100;柱温: 35  $^{\circ}$ C;进样量: 10  $\mu$ L。

### 2.3 溶液的制备

#### 2.3.1 对照品贮备液的配制:

精确称取蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖对照品,分别用水配成 3 mg/mL 的水溶液。

#### 2.3.2 对照溶液的校准:

取标准储备液 3 mL,加纯化水稀释至 10 mL,

摇匀,过滤,待用。

#### 2.3.3 试样制备:

精密称取样品约 0.5 g~1.0 g,至离心管中,精密加入 5.0 mL 50  $^{\circ}$ C 纯化水,超声 10 min,再缓慢精密加入 5.0 mL 乙腈,混匀,8000 r/min 离心 10 min,取上清液过滤,取续滤液过滤,进样。

## 2.4 线性实验

将蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖标准溶液,经 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤,进行液相色谱分析,记录色谱图,取浓度  $C$ (mg/mL)与峰面积( $A$ )的常用对数,绘制标准工作曲线。

## 2.5 精密度实验

精密称取样品 6 份,按 2.3.3 试样制备方法处理样品,检测样品含量,计算其相对标准偏差 RSD(%)。

## 2.6 加标回收实验

加标样品的处理:称取约 0.5 g 混合均匀的样品 6 份,置于离心管中,分成 3 组,每组 3 份,于每 3 组中分别精密加入浓度为 9.86 mg/mL 的蔗果三糖标准液 0.8、1.0、1.2 mL,浓度为 8.49 mg/mL 的蔗果四糖标准液 0.5、0.8、1.0 mL,浓度为 3.546 mg/mL 的蔗果五糖标准液 0.5、0.8、1.0 mL,按照 2.3.3 样品处理后,经 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤,作为供试品溶液,进样量为 10  $\mu$ L。

## 3 结果与讨论

### 3.1 标准曲线验证结果

蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖的标准曲线方程见表 1。3 个成分的相关系数都在 0.99 以上,蔗果三糖浓度在 0.2671 mg/mL 至 3.168 mg/mL、蔗果四糖浓度在 0.2429 mg/mL 至 2.8215 mg/mL、蔗果五糖浓度在 0.1617 mg/mL 至 3.544 mg/mL 的范围内均具有良好的线性。

表 1 标准曲线方程的结果  
Table 1 The results of standard curve equation

名称	标准曲线方程	相关系数( $r$ )
蔗果三糖	$\log Y=1.38\log X+6.31$	0.9979
蔗果四糖	$\log Y=1.35\log X+6.22$	0.9979
蔗果五糖	$\log Y=1.35\log X+6.31$	0.9953

### 3.2 精密度实验

蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖的精密度结果见表 2~4,6 个样品的相对标准偏差(RSD)均小于 10.0%,表明该方法有良好的精密度。

表 2 蔗果三糖精密度的实验( $n=6$ )Table 2 The precision of the kestose experiment ( $n=6$ )

名称	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
蔗果三糖	1.997	1.910	2.5
	1.890		
	1.879		
	1.897		
	1.871		
	1.929		

表 3 蔗果四糖精密度的实验( $n=6$ )Table 3 The precision of the nystose experiment ( $n=6$ )

名称	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
蔗果四糖	2.357	2.410	3.1
	2.332		
	2.510		
	2.487		
	2.408		
	2.363		

表 4 蔗果五糖精密度的实验( $n=6$ )Table 4 The precision of the 1F-fructofuranosyl nystose experiment ( $n=6$ )

名称	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
蔗果五糖	1.553	1.549	2.6
	1.572		
	1.519		
	1.560		
	1.489		
	1.601		

### 3.3 回收率实验

蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖在 3 个不同添加水平下浓度的回收率结果见表 5, 3 个浓度下样品中的蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖平均回收率分别为: 97.0%、104.2%、97.3%, 相对标准偏差(RSD)均小于 5.0%

### 3.4 样品测定

在 2.3.3 条件下, 与蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖标准品色谱峰相对应的位置上, 可以分离益生菌粉中的蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖, 保留时间分别是 10.991、14.370、18.602。如图 1 所示, 分离效果良好, 同时不会受杂质峰的影响。

表 5 加标回收率实验( $n=9$ )Table 5 The standard addition recovery of experiment ( $n=9$ )

名称	理论加标量(mg)	实测含量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
蔗果三糖	7.89	7.76	98.3	97.3	1.4
	9.86	9.43	95.7		
	11.83	11.58	97.9		
蔗果四糖	4.25	4.60	108.4	104.4	4.8
	6.79	7.19	105.9		
	8.49	8.39	98.8		
蔗果五糖	1.77	1.69	95.1	96.3	1.4
	2.84	2.72	96.0		
	3.55	3.46	97.7		

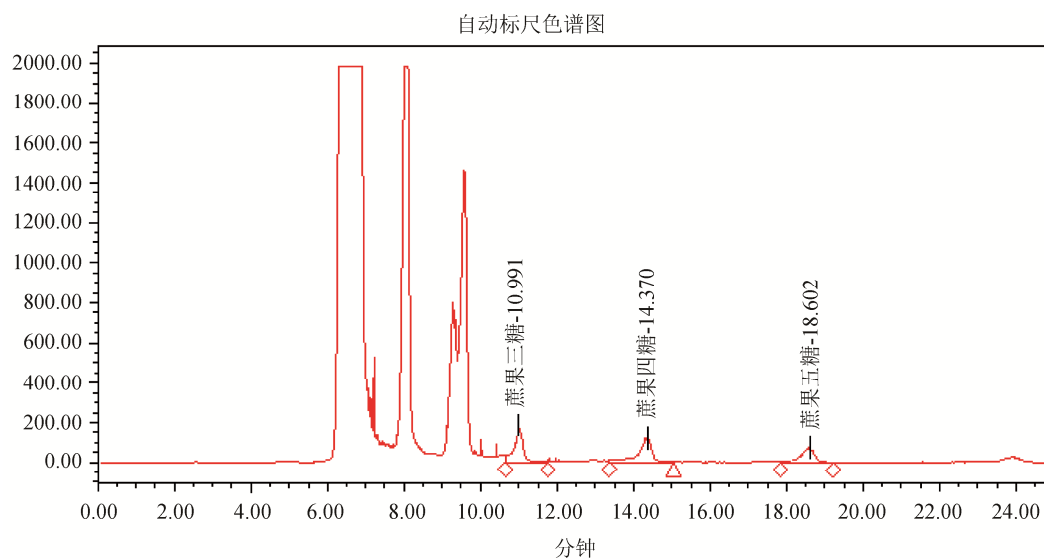


图1 样品的色谱峰图

Fig. 1 Chromatogram of sample

## 4 结论

本文通过前处理, 经 XAmide, 5  $\mu\text{m}$  4.6 mm $\times$ 250 mm 中性酰胺色谱柱可以分离益生菌粉中的低聚果糖(蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖)标准品, 并进行定量检测。通过测定其线性范围、精密度和回收率实验, 结果均符合要求。表明该方法适合测定益生菌粉中低聚果糖(蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖)的含量。

### 参考文献

- [1] 吴文剑, 范家恒. 低聚果糖的研究进展(二)[J]. 甘蔗糖业, 2004, (6): 31-39.  
Wu WJ, Fan JH. Progress of studies on the study of oligosaccharide (2) [J]. Sugarcane Canesugar, 2004, (6): 31-39.
- [2] 杭锋, 伍剑锋, 王荫榆, 等. 低聚果糖调节人体肠道菌群功能的研究[J]. 乳业科学与技术, 2010, (3): 31-39.  
Hang F, Wu JF, Wang YY, *et al.* Research on human intestinal flora FOS adjustment function [J]. Dairy Sci Technol, 2010, (3): 31-39.
- [3] 张帆, 汪会玲, 孟晶. 低聚果糖对人体肠道菌群的影响[J]. 现代预防医学, 2006, (2): 36-37.  
Zhang F, Wang HL, Meng J. Effect of FOS on human gut flora [J]. Mod Prevent Med, 2006, (2): 36-37.
- [4] 王乃强, 李国庆, 刘辉, 等. 低聚果糖促进钙离子吸收的研究[J]. 精细与专用化学品, 2013, (5): 25-28.  
Wang NQ, Li GQ, Liu H, *et al.* Research FOS promote calcium absorption [J]. Fine Specialty Chem, 2013, (5): 25-28.
- [5] 朱志怀, 李永民, 王志园. 低聚果糖对钙元素吸收的作用研究[J]. 中国乳品工业, 2008, (8): 64-65.  
Zhu ZH, Li YM, Wang ZY. In the study of calcium absorption Fos [J]. Chin Dairy Ind, 2008, (8): 64-65.
- [6] 徐进, 严卫星, 耿桂英, 等. 低聚果糖降血脂作用的动物研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2001, (4): 7-8.  
Xu J, Yan WX, Geng GY, *et al.* Animal studies FOS effect on blood [J]. Chin J Food Hyg, 2001, (4): 7-8.
- [7] 张俊黎, 王宇, 于红霞, 等. 低聚果糖对动物通便功能研究[J]. 预防医学情报杂志, 2007, (5): 30-32.  
Zhang JL, Wang Y, Yu HX, *et al.* Studies on the function of fructose in animal communication [J]. Prevent Med Inform, 2007, (5): 30-32.
- [8] 张远平. 提高低聚果糖纯度发挥其保健功能[J]. 甘蔗糖业, 2003, (4): 43-46.  
Zhang YP. FOS improves the purity to play its health care function [J]. Sugarcane Canesugar, 2003, (4): 43-46.
- [9] 杨远志, 李发财, 杨海军, 等. 低聚果糖益生元酸奶的研制[J]. 中国乳业, 2010, (1): 45-48.  
Yang YZ, Li FC, Yang HJ, *et al.* The research of FOS prebiotic yogurt [J]. China Dairy, 2010, (1): 45-48.
- [10] 汪世华, 彭利民, 张会, 等. 低聚果糖的开发与应用[J]. 中国乳品工业, 2002, (2): 31-34.  
Wang SH, Peng LM, Zhang H, *et al.* Development and application of fructose [J]. China Dairy Ind, 2002 (2): 31-34.
- [11] 李红, 张连富. 低聚果糖的特性及其在冰淇淋生产中的应用[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2001, (2): 20-21.

- LI H, Zhang LF. The characteristics of low fructose and its application in ice cream production [J]. Beverage Fast Frozen Food Ind, 2001, (2): 20-21.
- [12] 王银珍, 姚评佳, 魏远安. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定乳制品中低聚果糖的含量[J]. 食品工业, 2009, (2): 74-76. Wang YZ, Yao PJ, Wei YA. HPLC-ELSD method for the determination of FOS in dairy products [J]. Food Ind, 2009, (2): 74-76.
- [13] 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, (18): 223-225. Zhang YY, Nie SP, Wan C, *et al.* HPLC-ELSD determination monosaccharide, disaccharide and oligofructose [J]. Food Sci, 2009, (18): 223-225.
- [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, (10): 327-331. Fu BQ, Wang J, Wang YX, *et al.* Study on the method of high performance liquid chromatography for the detection of oligosaccharides in food [J]. Sci Technol Food Ind, 2010, (10): 327-331.
- [15] 龚芳红, 贺松, 张德纯, 等. 双歧杆菌发酵果蔬汁中低聚果糖的高效液相色谱法分析[J]. 中国微生物学杂志, 2010, (6): 15-17. Gong FH, He S, Zhang DC, *et al.* HPLC analysis of *Bifidobacteria* in fermented juice FOS [J]. Chin J Microecol, 2010, (6): 15-17.

(责任编辑: 白洪健)

### 作者简介



王德伟, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量控制。

E-mail: 790007532@qq.com