

# 高效液相色谱法测定保健食品中 $\beta$ -葡聚糖

游景水\*

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测保健食品中 $\beta$ -葡聚糖含量。**方法** 称取样品适量, 在酸性条件下于 135 °C 用微波消解仪提取 15 min, 取出水解液, 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.5±0.2, 用水定容至 100 mL 容量瓶中, 摇匀后过滤。采用高效液相色谱法检测, 根据葡萄糖标准品的色谱峰面积进行定量。**结果** 葡萄糖浓度在 0.01~0.16 mg/mL 的范围内与峰面积的线性良好, 相关系数为 0.9998。<sup>3</sup> 水平不同浓度葡萄糖标准品添加的回收率为 97.4%~98.6%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.4%~0.9%。**结论** 该方法操作简便、准确、重现性好, 适用于保健食品中 $\beta$ -葡聚糖含量的快速测定。**关键词:** 高效液相色谱法;  $\beta$ -葡聚糖; 微波提取; 离子交换

## Determination of $\beta$ -glucan in health food by high performance liquid chromatography

YOU Jing-Shui\*

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of  $\beta$ -glucan in health food by high performance liquid chromatography (HPLC). **Method** The samples were under acidic conditions at 135 °C for microwave extraction of 15 min, and the digestion solution was removed. Sodium hydroxide solution was used to adjust pH to 6.5±0.2. The volume was determined to 100 mL, shaking well and filtering. HPLC was used for detection, and it was quantitated according to the peak area of the glucose standard. **Results** Glucose concentration was good linear with peak area in the range of 0.01~0.16 mg/mL, with the correlation coefficient of 0.9998. The recoveries were 97.4%~98.6%, with relative standard deviation (RSD) of 0.4%~0.9%. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which is suitable for the rapid determination of  $\beta$ -glucan in health food.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography;  $\beta$ -glucan; microwave extraction; ion exchange

## 1 引言

$\beta$ -葡聚糖(又称右旋糖酐), 其活性结构是由葡萄糖单位组成的多聚糖,  $\beta$ -葡聚糖为优良免疫激活剂, 能够活化巨噬细胞、嗜中性白血球等, 从而提高白细胞素、细胞分裂素和特殊抗体的含量, 全面刺激机体的免疫系统。大量实验表明,  $\beta$ -葡聚糖可促进体内 IgM 抗体的产生, 以提高体液的免疫能力<sup>[1-3]</sup>。此外,  $\beta$ -葡聚糖也是强大的自由基清

除剂, 具有清除游离基、抗辐射、溶解胆固醇, 预防高脂血症及抵抗滤过性病毒、真菌、细菌等引起的感染等作用, 故广泛用于医药、食品、化妆品等行业<sup>[4]</sup>。近年研究发现,  $\beta$ -葡聚糖可以作为生命活动中起核心作用的遗传物质, 能够控制细胞分裂和分化, 调节细胞生长, 在治疗肿瘤、肝炎、心血管、糖尿病和降血脂、抗衰老等方面有独特的生物活性<sup>[5]</sup>。目前世界各国, 尤其是在日本、美国、俄罗斯等国,  $\beta$ -葡聚糖已经被广泛应用于食品保健、美容护肤等

\*通讯作者: 游景水, 执业药师, 质量工程师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: youjingsui@163.com

\*Corresponding author: YOU Jing-Shui, Pharmacist, Engineer, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: youjingsui@163.com

行业<sup>[6-13]</sup>。

目前国内外  $\beta$ -葡聚糖含量的测定方法有酶测定法<sup>[1]</sup>、刚果红分光光度比色法<sup>[14]</sup>和高效液相色谱法<sup>[3]</sup>。酶测定法国外有文献报道<sup>[9]</sup>, 该方法虽然专属性强, 但该方法的酶解时对温度、pH 特别敏感, 方法的耐用性较差, 且国内目前没有该方法的研究报道; 刚果红分光光度比色法虽然操作简便, 但方法专属性差, 不适用于基质复杂的样品(如保健食品)的检测; 国内有文献采用高效液相色谱法, 方法采用的是 121 °C 在高压灭菌锅内水解 3 h, 但本次试验证明该方法检测结果与理论值差异较大, 样品水解不完全; 因此有必要研究一种更高效、更准确、更易于普及的方法检测保健食品中  $\beta$ -葡聚糖含量。

鉴于目前国内外方法的缺陷, 研究一种更高效的样品处理方式, 采用微波消解法提取保健食品中的  $\beta$ -葡聚糖, 并采用高效液相色谱法检测保健食品中  $\beta$ -葡聚糖含量。

## 2 材料与方 法

### 2.1 试剂和仪器

葡萄糖标准品(100%, 中国药品生物制品检定所); 实验用水(一级水); 盐酸、氢氧化钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 保健食品(汤臣倍健股份有限公司)。

Mars 6 微波消解仪(美国 CEM 公司); Waters e2695 高效液相色谱仪(配备示差折光检测器, 美国 Waters 公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱: 菲罗门 Rezex RCM-Monosaccharide  $\text{Ca}^{2+}$  (300 mm $\times$ 7.8 mm)或同等性能的  $\text{Ca}^{2+}$ 型糖柱<sup>[13-15]</sup>, 柱温: 70 °C; 示差折光检测器温度: 70 °C; 流动相:水; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 30  $\mu\text{L}$ , 运行时间: 16 min。

#### 2.2.2 标准溶液的配制

标准贮备液的配制: 精密称取葡萄糖标准品 10.0 mg, 加一级水超声溶解后用一级水定容至 10 mL, 配成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液, 于室温保存。

标准工作液的配制: 精密量取标准储备液 0.1、0.2、0.4、0.8 和 1.6 mL 至 10 mL 容量瓶中, 得到浓度为 0.01、0.02、0.04、0.08 和 0.16 mg/mL 的标准工作液。

将葡萄糖标准工作液, 经 0.45  $\mu\text{m}$  的有机微孔滤膜过滤, 用高效液相色谱分析, 记录色谱图, 以标准品浓度( $X$ )为横坐标, 标准品的峰面积( $Y$ )为纵坐标, 绘制标准曲线, 求得回归方程。

#### 2.2.3 样品前处理

精密称取样品约 0.25 g(约相当于 25 mg 葡萄糖)于水解管中, 加 10 mL 盐酸溶液(0.5 mol/L), 在 135 °C 微波提取 15 min, 取出水解液, 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.5 $\pm$ 0.2, 用一级水定容至 100 mL 容量瓶中, 摇匀, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤

膜过滤, 进样量 30  $\mu\text{L}$ , 上机测定。

## 3 结果与分析

### 3.1 色谱及样品处理条件的选择

#### 3.1.1 色谱柱的选择

因方法的原理是  $\beta$ -葡聚糖水解为葡萄糖(葡萄糖转换为  $\beta$ -葡聚糖的系数为 0.9<sup>[3]</sup>), 因此作者比较了 3 种不同生产商的用于液相检测的糖分析柱, 即菲罗门 Rezex RCM-Monosaccharide  $\text{Ca}^{2+}$ (300 mm $\times$ 7.8 mm), Agilent ZORBAX Carbohydrate(300 mm $\times$ 7.8 mm), Shimadzu Inertsil NH2(300 mm $\times$ 7.8 mm), 3 种色谱柱的分离效果均能达到良好的分离, 但 Shimadzu Inertsil NH2 出峰时间较慢(约 21 min), Rezex RCM-Monosaccharide  $\text{Ca}^{2+}$ , Agilent ZORBAX Carbohydrate 出峰时间接近, 考虑到 Rezex RCM-Monosaccharide  $\text{Ca}^{2+}$  价格更便宜, 故选择菲罗门 Rezex RCM-Monosaccharide  $\text{Ca}^{2+}$  作为分离柱。

#### 3.1.2 柱温的选择

试验比较了 65、70 和 75 °C 的恒温条件下葡萄糖的分离情况, 结果表明, 采用 70 °C 柱温可以将样品中葡萄糖色谱峰与共存组分分离, 且分析周期短, 峰形良好, 故选择柱温温度为 70 °C。

#### 3.1.3 样品处理条件的选择

把已知  $\beta$ -葡聚糖含量(理论含量为: 11.2%)的保健食品用高压灭菌锅水解(121 °C, 水解 3 h)和微波消解仪水解(135 °C, 水解 15 min), 高压灭菌锅水解检测结果为 8.5%, 与理论含量的相对偏差为 13.7%; 微波消解仪水解检测结果为 11.3%, 与理论含量的相对偏差为 0.4%; 微波消解仪水解检测结果与理论值一致, 故选择微波消解仪水解(135 °C, 水解 15 min)作为样品的处理条件。

### 3.2 方法学考察

#### 3.2.1 专属性实验

称取空白样品 0.25 g, 其余与 2.2.3 同样操作, 按 2.2.1 色谱条件测定空白溶液, 以考察空白样品及用于样品处理的相关试剂在同样的条件下对目标峰的干扰情况。与葡萄糖标准品溶液的色谱峰保留时间对比, 试验结果表明: 空白溶液在葡萄糖色谱峰的保留时间处未出现色谱峰, 空白溶液无干扰, 表明该方法有良好的专属性。空白色谱图、葡萄糖标准品色谱图及样品色谱图分别见图 1、图 2 和图 3。

#### 3.2.2 线性方程、检出限和定量限

按 2.2.2 配制的葡萄糖标准溶液绘制曲线, 葡萄糖的标准曲线方程  $Y=1286432.12X-40.79$ , 其相关系数  $r^2=0.9998$ , 表明葡萄糖浓度在 0.01~0.16 mg/mL 的范围内均具有良好的线性关系。

分析方法的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantification, LOQ)由信噪比( $S/N$ )计算。LOD 定义为  $S/N=3$  时对应的待分析浓度, LOQ 定义为

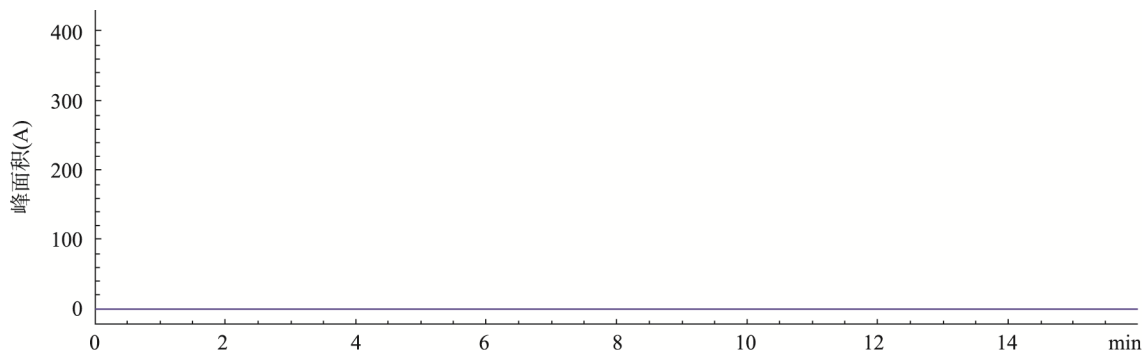


图1 空白色谱图

Fig. 1 Chromatogram of blank

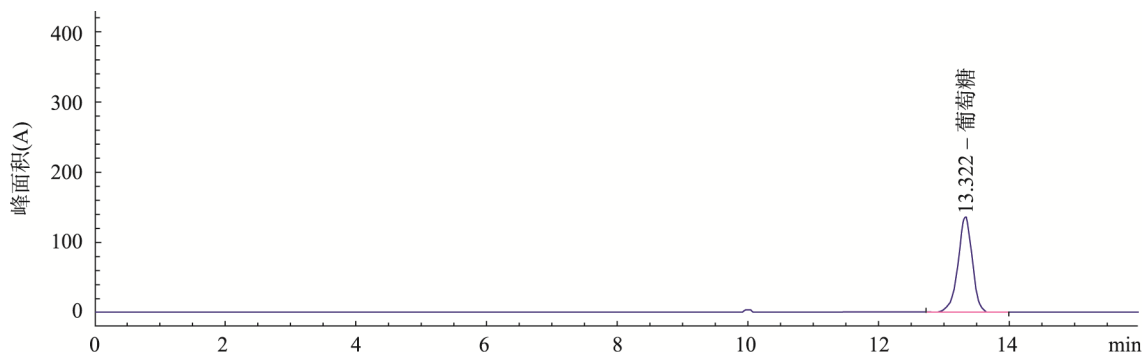


图2 葡萄糖标准品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of glucose standard

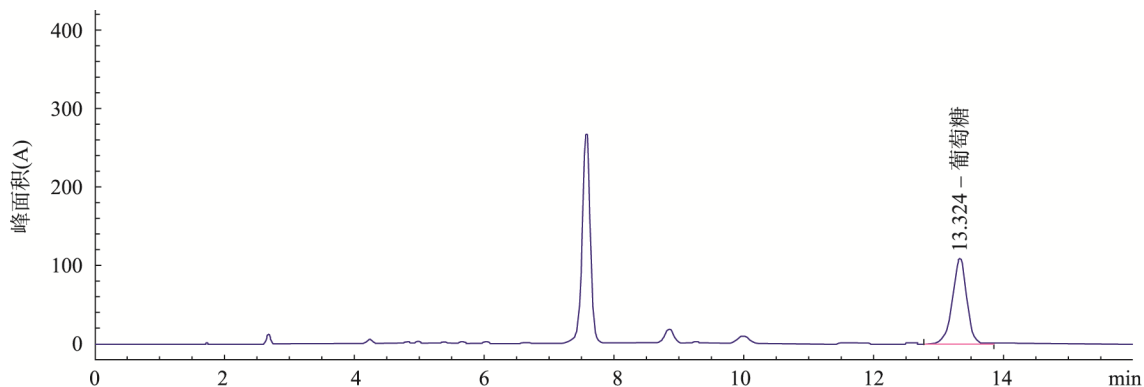


图3 样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of sample

$S/N=10$  时对应的待分析浓度。葡萄糖的方法检出限为 132 mg/kg, 葡萄糖的方法定量限为 440 mg/kg。

### 3.2.3 精密度实验

精密称取 6 份样品, 按 2.2.3 步骤处理样品并测定, 计算葡聚糖含量及其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。计算结果见表 1, 6 份样品的 RSD 为 0.6%, 符合 GB/T 27404-2008 的精密度要求(精密度 $<1.3\%$ <sup>[16]</sup>), 表明该方法有良好的精密度。

### 3.2.4 回收率实验

精密称取样品约 0.25 g(约相当于 25 mg 葡萄糖)于水

解管中, 称取 9 份, 分成 3 组, 每组 3 份样品, 于每组分别加入葡萄糖标准品 20、25、30 mg, 每份样品分别加入 10 mL 盐酸溶液(0.5 mol/L), 在 135 °C 微波提取 15 min, 取出水解液, 用氢氧化钠溶液调节 pH 至  $6.5\pm 0.2$ , 用一级水定容至 100 mL 容量瓶中, 摇匀, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 得样品加标液, 进样量 30  $\mu\text{L}$ , 上机测定。葡萄糖标准品在 3 个不同添加水平下浓度的回收率结果见表 2。

根据表 2 试验结果, 3 个不同添加水平下浓度的平均回收率为 97.4%~98.6%, 符合 GB/T 27404-2008 回收率的

表 1 精密度结果  
Table 1 Results of precision

序号	称样量(g)	平均含量(%)	RSD(%)
1	0.2513	11.33	0.6
2	0.2487		
3	0.2492		
4	0.2528		
5	0.2474		
6	0.2507		

表 2 加标回收率实验结果( $n=3$ )  
Table 2 Recoveries at spiked levels ( $n=3$ )

序号	理论加标量(mg)	实际测得标准品量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	20.04	19.68	98.20	97.5	0.9
	20.16	19.45	96.48		
	19.86	19.44	97.89		
2	25.21	24.98	99.09	98.6	0.6
	24.82	24.56	98.95		
	25.09	24.51	97.69		
3	30.24	29.45	97.39	97.4	0.4
	29.68	29.05	97.88		
	30.07	29.12	96.84		

表 3 6 批保健食品中  $\beta$ -葡聚糖检测结果  
Table 3 Contents of 6 batches of  $\beta$ -glucan in health food

样品编号	$\beta$ -葡聚糖检测含量(%)	产品中 $\beta$ -葡聚糖标示含量(%)	检测值与标示值的相对偏差(%)
1	11.15	11.2	0.2
2	11.31		1.0
3	11.24		0.4
4	11.33		1.1
5	11.27		0.6
6	11.23		0.3

要求(规定回收率: 95%~105%), RSD 为 0.4%~0.9%, 符合 GB/T 27404-2008 的精密度要求(精密度<1.3%), 表明该方法具有良好的准确度。

### 3.3 实际样品测定

采用本方法对 6 个批次保健食品中的  $\beta$ -葡聚糖含量进行了测定, 样品的检测结果见表 3。结果表明, 检测值与产品的标示值的相对偏差范围为 0.2%~1.1%, 符合 GB/T

27404-2008 的准确度要求(准确度<5%)。

## 4 结 论

采用微波消法水解提取, 使  $\beta$ -葡聚糖水解成葡萄糖, 采用 HPLC 法测定葡萄糖的含量, 利用葡萄糖转换为  $\beta$ -葡聚糖的系数为 0.9, 从而快速准确检测保健食品中  $\beta$ -葡聚糖含量。

## 参考文献

- [1] Sikora P, Tosh SM, Brummer Y, *et al.* Identification of high  $\beta$ -glucan oat lines and localization and chemical characterization of their seed kernel  $\beta$ -glucans [J]. *Food Chem*, 2013, 137(1-4): 83-91.
- [2] 尚喜雨. 水提法-酶法提取铁皮石斛多糖的比较研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 22(18): 47-49  
Shang XY. Water, enzymatic method a comparative study of tin caulis dendrobii polysaccharide [J]. *Anhui Agric Sci*, 2010, 22(18): 47-49
- [3] 王静, 王晴, 向文胜. 色谱法在糖类化合物分析中的应用 [J]. *分析化学*, 2001, 11(2): 43-45  
Wang J, Wang Q, Xiang WS. Chromatography in the analysis of carbohydrate compounds in application [J]. *J Anal Chem*, 2001, 11(2): 43-45
- [4] 林伟静, 吴广枫, 王强, 等. 燕麦及其制品  $\beta$ -葡聚糖含量测定方法比较 [J]. *食品工业科技*. 2011, (6): 23-27  
Lin WJ, Wu GF, Wang Q, *et al.* Comparison of methods for determination of beta glucan content in oat and its products [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2011, (6): 23-27
- [5] 黄民权, 黄步汉, 蔡体育, 等. 铁皮石斛多糖的提取、分离和分析 [J]. *中草药*, 1994, (3): 35-38  
Huang MQ, Huang BH, Cai TY, *et al.* Tin caulis dendrobii polysaccharide extraction, separation and analysis [J]. *J Med Herb*, 1994, (3): 35-38
- [6] Wang J, Sun GX, Gong A, *et al.* Microwave assisted synthesis of isoquercitrin using enzymatic hydrolysis of rutin [J]. *Adv Mater Res*, 2014, 1033-1034: 311-314.
- [7] 连喜军, 鲁晓翔, 蔡保松, 等. 国际标准酶法测定  $\beta$ -葡聚糖含量的研究 [J]. *粮油食品科技*, 2006, (6): 87-90  
Lian XJ, Lu XX, Cai BS, *et al.* Study on the determination of beta glucan content by international standard enzyme method [J]. *Sci Technol Cereals, Oils Foods*, 2006, (6): 98-103
- [8] Palazzolo G, Horvath P, Zenobiwong M. Correction: The flavonoid isoquercitrin promotes neurite elongation by reducing rhoa activity [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49979.
- [9] Redaelli R, Frate VD, Bellato S, *et al.* Genetic and environmental variability in total and soluble  $\beta$ -glucan in European oat genotypes [J]. *J Cereal Sci*, 2013, 57(2): 193-199.
- [10] Welch RW, Jcw B, Leggett JM. Interspecific and intraspecific variation in grain and groat characteristics of wild oat (*Avena*) species: Very high groat (1 leads to 3), (1 leads to 4)-beta-D-glucan in an *Avena atlantica* genotype [J]. *J Cereal Sci*, 2000, 31(3): 273-279.
- [11] 郑殿升, 吕耀昌, 田长叶, 等. 中国裸燕麦  $\beta$ -葡聚糖含量的鉴定研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2006, (1): 93-98  
Zhen DS, Lu YC, Tian CY, *et al.* Identification of beta glucan content of naked oat in China [J]. *J Plant Genet Resour*, 2006, (1): 93-98
- [12] Eva V, Fanny L, Lubica JK, *et al.* Isoquercitrin esters with mono- or dicarboxylic acids: Enzymatic preparation and properties [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 899.
- [13] 张娟, 杜先锋, 饶砚琴. 刚果红法测定燕麦中  $\beta$ -葡聚糖含量的研究[J]. *安徽农业大学学报*. 2007, (1): 55-60  
Zhang J, Du XF, Rao NQ. Determination of beta glucan content in oat by Congo red method [J]. *J Anhui Agric Univ*, 2007, (1): 55-60
- [14] Jackson GD, Berg RK, Kushnak GD, *et al.* Nitrogen effects on yield, beta $\alpha$  glucan content, and other quality factors of oat and waxy hulless barley [J]. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 1994, 25(17-18): 3047-3055.
- [15] Peng YY, Wei YM, Baum BR, *et al.* Phylogenetic inferences in *Avena*, based on analysis of FL intron2, sequences [J]. *Tag Appl Genet*, 2010, 121(5): 985-1000.
- [16] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].  
GB/T 27404-2008 Laboratory quality control specification-Food physical and chemical testing [S].

(责任编辑: 姜 珊)

## 作者简介



游景水, 执业药师, 质量工程师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。  
E-mail: youjingsui@163.com