

高效液相色谱示差检测法测定饮料中低分子量抗性麦芽糊精含量

杨智健, 殷林虹, 胥 颖*

[可口可乐饮料(上海)有限公司亚太技术中心, 上海 200241]

摘 要: **目的** 优化标准方法 AOAC 2001.03 和 GB/T 22224-2008《食品中膳食纤维的测定 酶重量法和酶重量法-液相色谱法》的样品前处理过程, 以测定饮料中添加的低分子量抗性麦芽糊精的含量。**方法** 样品经一定比例稀释后, 添加丙三醇内标, 经色谱柱分离, 示差折光检测器测定, 内标法定量。**结果** 方法检出限和定量限分别为 0.01 和 0.03 g/L, 3 个添加水平的平均加标回收率为 93.2%~96.9%, 日内相对标准偏差<1.66%, 日间相对标准偏差 <1.81%。同时考察了市场上常见的添加低分子量抗性麦芽糊精作为膳食纤维的茶饮料, 碳酸饮料和包装饮用水, 测定结果和标签宣称膳食纤维含量基本相符, 且加标回收率为 95.9%~102.3%。**结论** 本方法样品前处理简单、快速, 适用于饮料中添加的低分子量抗性麦芽糊精含量的测定。

关键词: 低分子量抗性麦芽糊精; 饮料; 高效液相色谱示差检测法; 葡萄糖响应因子

Determination of low molecular weight resistant maltodextrin in beverage by using high-performance liquid chromatography coupled with refractive index detection

YANG Zhi-Jian, YIN Lin-Hong, XU Ying*

[Asia Pacific Technical Center, Coca-Cola Beverages (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 200241, China]

ABSTRACT: Objective To optimize the sample preparation process of standard methods AOAC 2001.03 and GB/T 22224-2008 *Determination of dietary fiber in foods-Enzymatic gravimetric method and enzymatic gravimetric method-liquid chromatography*, so as to analyze the content of low molecular weight resistant maltodextrin added in beverages. **Methods** The sample was diluted in a certain proportion and added with glycerol as internal standard, then separated by chromatographic column and analyzed by liquid chromatography coupled with refractive index detection. **Results** The limits of detection and quantitation were 0.01 and 0.03 g/L, respectively. The average method recoveries were 93.2%~96.9% for the 3 spiking levels, with related standard deviation<1.66% for intra-day and <1.81% for inter-day. Meanwhile, commercial products in different beverage categories (tea, sparkling and package water) were tested, the results were consistent with the labelled dietary fiber value, and the recoveries ranged from 95.9% to 102.3%. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and suitable for the determination of fortified low molecular weight resistant maltodextrin in beverages.

KEY WORDS: low molecular weight resistant maltodextrin; beverage; high performance liquid chromatography with refractive index detection; response factor for dextrose

*通讯作者: 胥颖, 博士, 主要研究方向为食品质量和安全检测。E-mail: yxu@coca-cola.com

*Corresponding author: XU Ying, Ph.D, Coca-Cola Beverages (Shanghai) Co., Ltd., Asia Pacific Technical Center, No.1188, Ziyue Road, Minhang District, Shanghai 200241, China. E-mail: yxu@coca-cola.com

1 引言

抗性麦芽糊精又叫难消化糊精,是以食用淀粉为原料,在酸性条件下经糊精化反应制得的一种低分子水溶性膳食纤维^[1,2],为葡萄糖的聚合物,分子质量分布为 504 聚合度(degree of polymerization, DP)(DP-3)到 10000(DP-62),平均分子质量为 2000。抗性糊精的结构相比于原始淀粉更为复杂,除了糊精化过程中没有参与反应而被保留的 α -1,4 和 α -1,6 糖苷键外,还生成了 α -1,2 和 α -1,3 糖苷键等不能或很难被 α -淀粉酶和糖化酶降解的分支结构,部分还原端上还存在有 β -1,6 葡萄糖苷结构的存在,分子结构见图 1。由于含抗人体消化酶(如淀粉酶等)作用的难消化成分,抗性糊精在消化道中不会被消化吸收,可直接进入大肠,作为膳食纤维发挥各种生理作用,如降低血糖、降低胆固醇和改善肠道功能等,有助于预防如高血压、糖尿病等慢性疾病^[3-9]。低分子质量抗性麦芽糊精是具代表性的低黏性水溶性膳食纤维,有良好的加工稳定性,又具有一般糖类的粉质特性,在食品饮料加工中可以像糖类一样简单添加,其中性口感不影响原有的风味,是理想的功能性食品原料^[10],目前亦越来越广泛应用于饮料行业。

国内外相关法律法规对产品中添加并宣称含有膳食纤维都有所规定,如 GB 28050-2011《食品安全国家标准预包装食品营养标签通则》^[11]要求其含量不少于 15 g/L。随着抗性麦芽糊精在食品饮料中的应用越来越广泛,对其含量的检测的需求也越来越大。目前公认的测定低分子质量抗性麦芽糊精含量的标准方法是酶解称重-液相色谱技

术,国际标准方法 AOAC 2001.03^[12]和国标 GB/T 22224-2008《食品中膳食纤维的测定 酶重量法和酶重量法-液相色谱法》^[13]皆采用了这种技术。然而,标准方法样品前处理过程因需考虑各种不同种类食品基质的影响,采用了比较复杂的样品处理过程,整个过程试剂成本高,耗时相当长,不能达到快速检测的目的。也有文献报道了几种相对简便的测定抗性麦芽糊精的方法,比如采用间接方法来测定抗性麦芽糊精含量^[14],该法通过酶解前后葡萄糖的含量来间接获得不可消化的抗性麦芽糊精的含量,但只适用于抗性麦芽糊精原料样品;2013 年报道的液相色谱法外标法测定抗性麦芽糊精含量^[15],其前处理简单,但仅针对果汁样品。

本研究基于标准方法,简化了饮料样品制备过程,通过与国标方法的比对实验,对方法的等效性进行了评估。与标准方法中的样品前处理步骤相比,无需采用酶解和脱盐等复杂步骤,样品经稀释过滤后,直接进行定量分析,以期在日常大批量样品的快速检测工作提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 材料和仪器

低分子质量抗性麦芽糊精(食用级,日本 MATSUTANI 公司);葡萄糖、丙三醇(分析纯,美国 sigma 公司)。

饮料样品为市售产品,包括添加低分子质量抗性麦芽糊精的包装饮用水、碳酸饮料和茶饮料(简称为包装饮用水、碳酸饮料和茶饮料)。

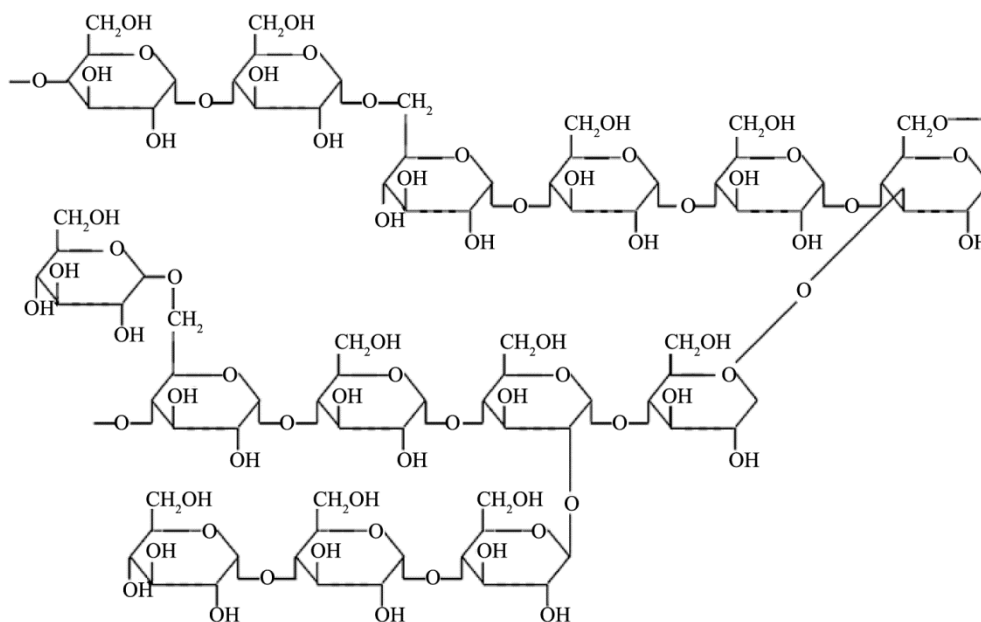


图 1 抗性麦芽糊精分子结构

Fig.1 Molecular structure of resistant maltodextrin

安捷伦 1260 高效液相色谱仪(包含四元泵、自动进样器、柱温箱、示差折光检测器)(美国 Agilent); XS204 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

2.2 实验方法

本研究采用高效液相色谱示差检测法, 通过凝胶色谱柱的分子筛作用, 将样品中被分离物按照分子大小进行分离, 同时通过串联两根凝胶色谱柱来增加塔板数, 以达到更好的分离效果。

2.2.1 低分子质量抗性麦芽糊精标准溶液的配制

准确称量低分子质量抗性麦芽糊精标准品 1.5 g(精确至 0.1 mg)于 100 mL 的容量瓶中, 加超纯水溶解并定容至 100 mL, 摇匀, 即得 15 g/L 的低分子质量抗性麦芽糊精标准溶液。

2.2.2 葡萄糖响应因子的测定

葡萄糖/丙三醇标准溶液的配制: 准确称量葡萄糖和丙三醇各 1.0 g(精确至 0.1 mg)于 100 mL 的容量瓶中, 分别加超纯水溶解并定容至 100 mL, 摇匀, 即得 10 g/L 的葡萄糖标准溶液和 10 g/L 的丙三醇标准溶液。

葡萄糖响应因子工作曲线: 分别移取 4、8、20 mL 10 g/L 葡萄糖标准溶液于 100 mL 容量瓶中, 各加入 16 mL 10 g/L 丙三醇标准溶液, 加超纯水定容至 100 mL。

葡萄糖响应因子的计算: 通过液相色谱分析, 计算葡萄糖峰面积与丙三醇峰面积的比值(Y)与葡萄糖浓度/丙三醇浓度的比率(X)所得曲线的斜率的倒数得到葡萄糖响应

因子。

2.2.3 样品前处理

移取 1 mL 饮料样品于 50 mL 容量瓶中, 并加入 1 mL 10 g/L 丙三醇标准溶液, 加超纯水定容至 50 mL。溶液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后供液相色谱测定。

2.2.4 结果计算

由低分子质量抗性麦芽糊精标准溶液样品的出峰时间定位, 确定样品色谱图中 $DP \geq 3$ 的葡萄糖聚合物的峰面积(如图 2), 从而通过丙三醇内标以及葡萄糖响应因子计算得到低分子质量抗性麦芽糊精的含量。

低分子质量抗性麦芽糊精含量(g/L) =

$$\frac{DP \geq 3 \text{ 部分峰面积}}{\text{丙三醇峰面积}} \times \text{丙三醇含量(g/L)} \times \text{葡萄糖响应因子} \times \text{稀释倍数}$$

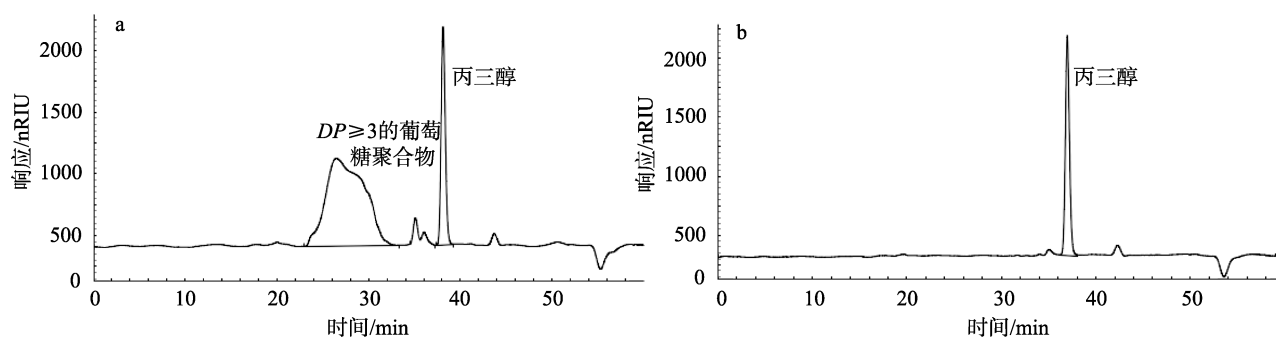
2.2.5 液相色谱条件

色谱柱: 保护柱 TSK guard column PWXL(6 mm $\times$ 40 mm, 12 μ m) 和 2 根串联的分析柱 TSK-GEL G2500 PWXL(7.8 mm $\times$ 300 mm, 7 μ m); 柱温: 80 $^{\circ}$ C; 流动相: 超纯水, 等度洗脱; 流速: 0.5 mL/min; 检测器: 示差折光检测器, 检测器温度: 80 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

3 结果与分析

3.1 样品前处理的优化

本研究在方法优化时, 为确保方法的广泛适用性, 本研究选取了市售饮料产品中样品基质相对复杂的茶饮料进行考察。



注: a. 标准品; b. 空白对照。

图 2 低分子质量抗性麦芽糊精的色谱图

Fig.2 Chromatogram of low molecular weight resistant maltodextrin

3.1.1 方法前处理步骤的简化

标准方法中样品在热稳定 α -淀粉酶, 蛋白酶, 淀粉葡萄糖苷酶的依次作用下, 将其中的淀粉, 蛋白质等酶解为单糖和氨基酸, 然后酶解液经乙醇沉淀, 抽滤, 残渣用于测定不溶性膳食纤维和在乙醇中沉淀的高分子质量可溶性膳食纤维, 抽滤液经脱盐后测定低分子质量抗性麦芽糊精的含量。因标准方法需广泛应用于各种食品基质, 需要完备的前处理过程去除基质中可能含有的淀粉、蛋白质、脂肪以及高浓度的盐成分等影响, 使得该方法的样品处理过程对基质相对简单的饮料样品来说过于复杂

耗时。本研究针对市场常见的包装饮用水、碳酸饮料和茶饮料中不含有蛋白质、淀粉和脂肪等成分的特性, 考察了将前处理方法简化为直接稀释过滤的可行性, 对茶饮料样品进行不同倍数稀释后过滤, 分别用 2 台液相色谱仪进行检测。结果如表 1 所示, 在 50 倍的稀释条件下, 3 个平行样品的相对标准偏差最小。同时考虑到低分子质量抗性麦芽糊精在饮料中的常见添加量(GB 28050-2011^[11]规定膳食纤维的含量声称要求为 $\geq 15\text{ g/L}$), 认为该稀释倍数具有广泛适用性, 最终确定常规样品检测的稀释倍数为 50 倍。

表 1 稀释倍数对低分子质量抗性麦芽糊精含量测定的影响
Table 1 Impact of dilution factor on low molecular weight resistant maltodextrin determination

稀释倍数	测定结果-仪器 1/(g/L)	相对标准偏差/%	测定结果-仪器 2/(g/L)	相对标准偏差/%
100 倍	16.7	3.90%	16.1	3.29%
	16.0		17.1	
	17.3		17.0	
	16.9		16.8	
50 倍	16.8	0.59%	16.8	0.34%
	17.0		16.9	
	16.6		17.6	
	17.4		16.9	
25 倍	17.1	2.37%	17.4	2.08%

3.1.2 盐含量对色谱定量分析中的影响

标准方法的样品前处理中涉及脱盐步骤, 本研究对样品简单稀释省去了脱盐步骤, 本研究通过在茶饮料样品中添加氯化钠的方法, 考察盐含量对检测结果的影响。如表 2 所示, 随着氯化钠添加量的增加, 实际测得的低分子质量抗性麦芽糊精结果也逐渐增大, 表明过高的盐含量对色谱定量分析会产生干扰。从色谱图中可见(如图 3 所示), 当 900 mg/L 氯化钠添加到茶饮料样品中, 出现了一个明显的色谱干扰峰, 并且无法与 $DP\geq 3$ 的葡萄糖聚合物色谱峰有效分离, 从而导致结果偏大。但对于目前常见的市售饮料产品, 包括包装饮用水、碳酸饮料和茶饮料, 盐含量较低, 因此简化后的前处理步骤通过稀释可弱化并消除样品中的盐对低分子质量抗性麦芽糊精在液相色谱分析中的干扰。

精含量如表 3 所示, 结果平均偏差在 1.0%以内, 证明本方法与标准方法的结果一致性良好。

3.2 与标准方法的一致性考察

本研究对包装饮用水、碳酸饮料和茶饮料, 分别使用简化方法(直接稀释过滤)和国标方法(酶解-醇沉-抽滤-脱盐)的前处理过程, 测得样品中的低分子质量抗性麦芽糊

表 2 盐含量对低分子质量抗性麦芽糊精色谱分析中的影响
Table 2 Impact of salt content on low molecular weight resistant maltodextrin determination

样品	氯化钠添加量/(mg/L)	结果偏差 /%
未添加氯化钠	0	/
添加氯化钠-1	250	+1.0
添加氯化钠-2	450	+1.0
添加氯化钠-3	600	+4.7
添加氯化钠-4	700	+8.0
添加氯化钠-5	900	+9.2

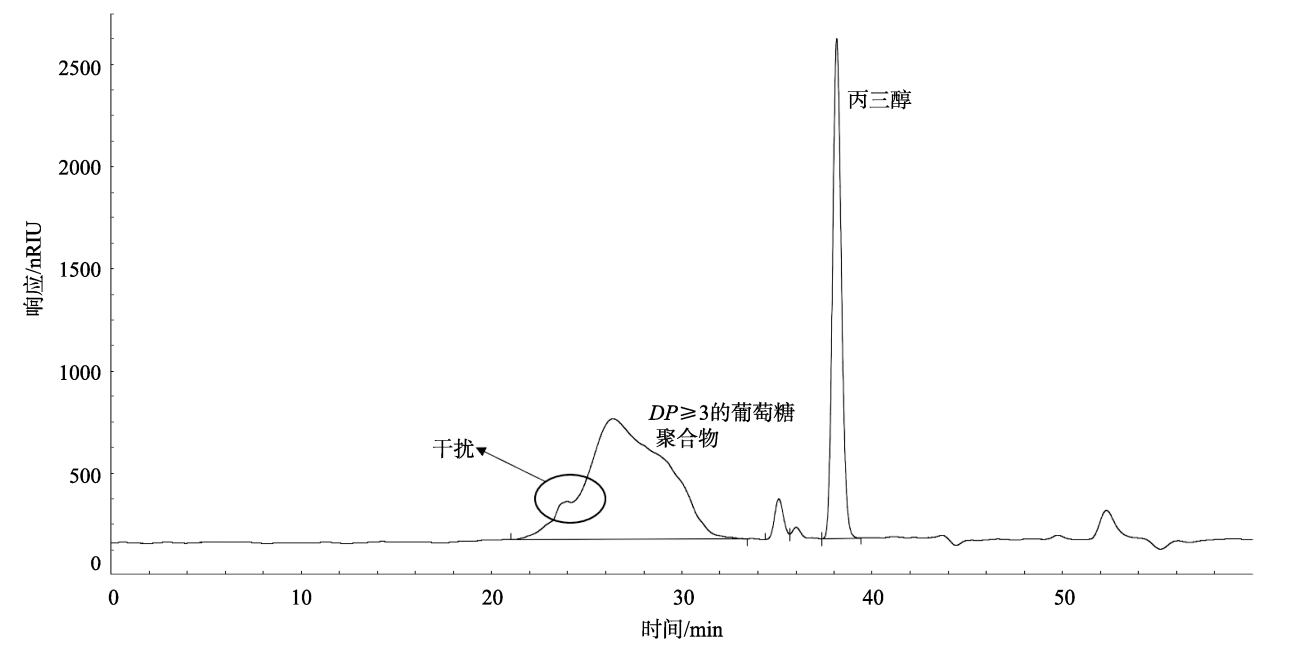


图 3 高浓度盐含量(氯化钠添加量 900 mg/L)对色谱图的干扰
Fig.3 Chromatographic interference by high concentration level of salt (addition with 900 mg/L NaCl)

表 3 国标方法和简化方法测定结果比较
Table 3 Comparison of testing results between GB method and simplified method

样品	国标方法酶解-醇沉-过滤-脱盐/(g/L)	简化方法直接稀释过滤/(g/L)	偏差/%	平均偏差/%
包装饮用水	11.0	11.1	0.9	
碳酸饮料	17.7	17.9	1.1	0.8
茶饮料	18.9	19.0	0.5	

3.3 方法学考察

选取了目前市面上最常见的一款添加低分子质量抗性麦芽糊精的碳酸饮料, 遵循 AOAC 验证准则^[16]对本方法进行验证, 评估了以下参数: 选择性, 线性, 检出限(limit of detection, LOD), 定量限(limit of quantitation, LOQ), 重复性, 准确性。

3.3.1 方法选择性

对所选样品进行加标实验, 添加水平为 15 g/L, 测得加标回收率为 98.1%, 表明该方法选择性良好。

3.3.2 方法线性

本方法采用内标法定量, 通过线性回归得到内标物和糖单元的相对响应因子, 糖单元在 0.4~2.0 g/L 浓度范围下与内标物浓度比值所得标准曲线线性关系良好, 线性相关系数为 $r^2=0.99998$ 。

3.3.3 方法检出限和定量限

配置含低浓度的低分子质量抗性麦芽糊精样品, 平行测

定 7 次得到标准偏差(σ), 根据 $LOD=3\sigma$ 和 $LOQ=10\sigma$ 计算得到检测限和定量限, 分别是 0.01 和 0.03 g/L, 方法灵敏度高。

3.3.4 方法精密度和准确度

对所选样品进行多水平加标实验, 添加水平分别为 7.5、15.0 和 30.0 g/L, 在同样测试条件下, 分别于日内和日间对每个添加水平平行测定 7 次, 计算平均加标回收率和平均相对标准偏差。如表 4 所示, 样品中的低分子质量抗性麦芽糊精的平均回收率为 93.2%~96.9%, 平均相对标准偏差为 0.85%~1.81%。结果表明本方法重复性和精密度良好。

3.4 实际样品检测

选取了市售 5 款添加低分子质量抗性麦芽糊精的饮料进行测定, 所选样品包括茶饮料, 碳酸饮料和包装饮用水, 以考察本方法的适用性。实际样品色谱图如图 4 所示, 实验结果如表 5 所示, 低分子质量抗性麦芽糊精的检测值和标签宣称的膳食纤维含量值基本相符。

表 4 样品中的低分子质量抗性麦芽糊精的平均回收率和精密度

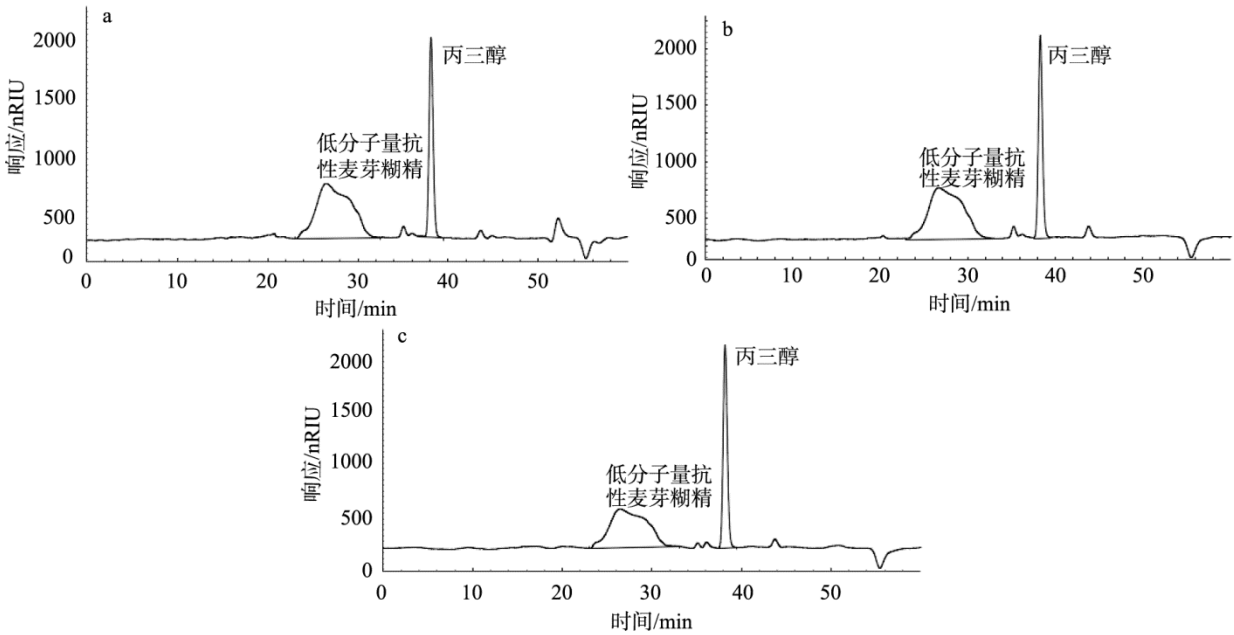
Table 4 Average recoveries and accuracy of low molecular weight resistance maltodextrin in sample

分析物	加标浓度/(g/L)	日内(n=7)		日间(n=7*2 d 测试)	
		相对标准偏差/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%	平均回收率/%
低分子质量抗性麦芽糊精	7.5	1.66	93.2	1.74	96.9
	15	1.48	94.3	1.81	96.8
	30	0.85	95.1	1.25	96.1

表 5 实际样品中的低分子质量抗性麦芽糊精的测定

Table 5 Determination of low molecular weight resistant maltodextrin in real samples

产品	标签宣称值/(g/L)	样品	实际测得含量/(g/L)	回收率/%
茶饮料-1	17	空白	17.2	96.1
		加标	31.6	
茶饮料-2	15	空白	16.5	102.3
		加标	31.8	
碳酸饮料-1	16	空白	17.3	95.9
		加标	31.7	
碳酸饮料-2	15	空白	17.7	98.9
		加标	32.6	
包装饮用水	15	空白	15.7	95.9
		加标	30.1	



注: a. 茶饮料; b. 碳酸饮料; c. 包装饮用水。

图 4 实际样品的色谱图

Fig.4 Chromatogram of samples

4 结 论

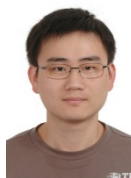
本研究基于标准方法 AOAC 2001.03 和 GB/T 22224-2008, 对前处理方法进行了优化, 建立了简单高效的饮料中低分子质量抗性麦芽糊精的检测方法。经实验验证该方法准确且重现性良好, 可用于添加低分子质量抗性麦芽糊精的多种饮料的测试需求, 在很大程度上降低了检测成本, 提高了工作效率。本样品处理的优化主要针对对简单的饮料基质, 对于含高脂肪、高蛋白以及同时含有不同来源膳食纤维的饮料品类, 还需做进一步的研究。

参考文献

- [1] Asp NG. Dietary fibre—definition, chemistry and analytical determination [J]. *Mol Asp Med*, 1987, 9(1): 17–29.
- [2] 孔刘娟, 刘峰, 栾庆民, 等. 抗性糊精制备方法、功能特性及在食品中应用研究[J]. *中国食品添加剂*, 2020, (3): 179–183.
Kong LJ, Liu F, Luan QM, *et al.* Study on preparation, functional characteristics of resistant dextrin and its application in food [J]. *Chin Food Addit*, 2020, (3): 179–183.
- [3] 刘娜, 魏霞, 苏昕宇, 等. 抗性糊精的减肥通便作用评价[J]. *食品与药品*, 2019, 21(5): 376–380.
Liu N, Wei X, Su XY, *et al.* Evaluation of weight reducing and laxative effect of resistant dextrin [J]. *Food Drug*, 2019, 21(5): 376–380.
- [4] Guerin DL, Li S, Pochat M, *et al.* Effects of nutrieose dietary fiber supplementation on body weight, body composition, energy intake, and hunger in overweight men [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2011, 62(6): 628–635.
- [5] Hira T, Suto R, Kishimoto Y, *et al.* Resistant maltodextrin or fructooligosaccharides promotes GLP-1 production in male rats fed a high-fat and high-sucrose diet, and partially reduces energy intake and adiposity [J]. *Eur J Nutr*. 2017, 57(3): 965–979.
- [6] Guerin DL, Pochat M, Reifer C, *et al.* The soluble fiber nutrieose induces a dose-dependent beneficial impact on satiety over time in humans [J]. *Nutr Res*, 2011, 31(9): 665–672.
- [7] ToKunaga K, Matsuoka A. Effects of a food for specified health use (FOSHU) which contains indigestible dextrin as an effective ingredient on glucose and lipid metabolism [J]. *J Jpn Diabetes Soc*, 1999, (42): 61–65.
- [8] Kishimoto Y, Oga H, Hayashi N, *et al.* Suppressive effect of resistant maltodextrin on postprandial blood triglyceride elevation [J]. *Eur J Nutr*, 2007, (46): 133–138.
- [9] Eui YS, Mutsuko O, Sara C, *et al.* Tumor suppression by resistant maltodextrin fibersol-2 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(3): 460–465.
- [10] 马梦垚. 抗性糊精特性及其在食品中的应用[J]. *现代食品*, 2019, (10): 91–93.
Ma MY. Characteristics of resistant dextrin and its application in food [J]. *Mod Food*, 2019, (10): 91–93.
- [11] GB 28050-2011 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则[S].
GB 28050-2011 National food safety standard-General rules for nutrition labeling of prepackaged food [S].
- [12] AOAC Official Method 2001.03 Dietary fiber containing supplemented resistant maltodextrin (RMD), high MW RMD by Method 985.29 and low MW RMD by HPLC enzymatic-gravimetric method and liquid chromatographic determination [S].
- [13] GB/T 22224-2008 食品中膳食纤维的测定 酶重量法和酶重量法-液相色谱法[S].
GB/T 22224-2008 Determination of dietary fiber in foods-Enzymatic gravimetric method and enzymatic gravimetric method-liquid chromatography [S].
- [14] 张伟薇, 徐勇. 一种间接快速测定抗性糊精含量的方法[J]. *广东化工*, 2014, (17): 167–168.
Zhang WW, Xu Y. An indirect method of rapid determination of resistance dextrin content [J]. *Guangdong Chem*, 2014, (17): 167–168.
- [15] Alok S, Nikhil KS, Meena S, *et al.* Determination of fortified resistant maltodextrin in juices by high performance liquid chromatography [J]. *Int J Chem Anal Sci*, 2013, (4): 39–43.
- [16] AOAC requirements for single laboratory. Validation of chemical methods [S].

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



杨智健, 硕士, 首席分析师, 主要研究方向为食品质量和安全检测。
E-mail: jameyang@coca-cola.com



胥颖, 博士, 主要研究方向为食品质量和安全检测。
E-mail: yxu@coca-cola.com