

食品中不可沉淀的可溶性膳食纤维（SDFS）的含量测定

高效液相色谱法

参考——GB 5009.88-2023

一、背景

《GB 5009.88-2014 食品安全国家标准 食品中膳食纤维的测定》中不能测低聚果糖、低聚半乳糖、聚葡萄糖、抗性麦芽糊精、抗性淀粉等膳食纤维组分，因此，对于添加了此类膳食纤维组分的样品，往往采用其他方法测定，再通过加和的方式得到食品中的总膳食纤维，给检测工作带来不便。《GB 5009.88-2023 食品安全国家标准 食品中膳食纤维的测定》中增加不可沉淀的可溶性膳食纤维的液相色谱测定方法，大大提高检测效率。

二、实验过程

1 范围

高效液相色谱法适用于植物性食品及其制品以及添加了膳食纤维组分的食品中不可沉淀的可溶性膳食纤维的测定。

2 试剂与材料

- 2.1 水：符合 GB/T 6682 规定的一级水；
- 2.2 二甘醇（ $C_4H_{10}O_3$ ）：CAS 号为 111-46-6，纯度>99 %；
- 2.3 D-葡萄糖（ $C_6H_{12}O_6$ ）：CAS 号为 50-99-7，纯度>99 %；
- 2.4 蔗果三糖（ $C_{18}H_{32}O_{16}$ ）：CAS 号为 470-69-9，纯度>98 %；
- 2.5 D-麦芽糖一水合物（ $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ ）：CAS 号为 69-79-4，纯度>98 %；
- 2.6 SRM 3233 强化早餐谷物标准品（美国 NIST）。

3 仪器与设备

- 3.1 高效液相色谱仪：K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 Plus CO 柱温箱（立式）、K2025 RID 示差折光检测器、Wookinglab 色谱工作站；
- 3.2 分析天平：精度 0.1 mg；
- 3.3 容量瓶：10 mL、50 mL、100 mL；
- 3.4 量筒：500 mL；
- 3.5 旋转蒸发器；
- 3.6 具塞离心管：20 mL；

3.7 阴离子交换树脂 (OH^-) 和氢离子交换树脂 (H^+) ;

3.8 涡旋振荡器;

3.9 一次性针头注射器: 2 mL;

3.10 微孔滤膜: 0.22 μm , 水相。

4 测定步骤

4.1 标准溶液的配制

4.1.1 二甘醇内标溶液 (100 mg/mL) 的配制

准确称取 10 g (精确至 0.1 mg) 二甘醇 (2.2), 用水溶解后转移至 100 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 混匀。临用新制。

4.1.2 D-葡萄糖标准溶液 (10 mg/mL) 的配制

准确称取 1.0 g (精确至 0.1 mg) D-葡萄糖 (2.3), 用水溶解后转移至 100 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 混匀。临用新制。

4.1.3 D-葡萄糖/二甘醇标准系列工作液的配制

分别吸取 0.50 mL、1.0 mL、2.0 mL、4.0 mL 和 8.0 mL 10 mg/mL D-葡萄糖标准溶液 (4.1.2) 至 10 mL 容量瓶中, 再加入 0.2 mL 100 mg/mL 二甘醇内标溶液 (4.1.1), 加水稀释并定容至刻度, 混匀, 制得标准系列工作液, 其中 D-葡萄糖含量分别相当于 0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL、4.0 mg/mL 和 8.0 mg/mL, 二甘醇含量相当于 2.0 mg/mL。临用新制。

4.1.4 定性用标准溶液的配制

称取约 0.10 g 蔗果三糖 (2.4) 和 0.10 g D-麦芽糖一水合物 (2.5), 用水溶解, 转移至 50 mL 容量瓶中, 分别加入 1 mL 100 mg/mL 二甘醇内标溶液 (4.1.1), 加水定容至刻度。临用新制。

4.2 试样测定液的制备

按照《GB 5009.88-2023 食品安全国家标准 食品中膳食纤维的测定》, 用量筒 (3.4) 移取 200 mL 经 DF06 膳食纤维测定仪处理后所得 SDFS 滤液至烧瓶中, 然后将盛有滤液的烧瓶安装到旋转蒸发仪 (设定旋转蒸发仪 (3.5) 的参数为 50 $^{\circ}\text{C}$, 转速为 100 rpm) 对应位置处, 将滤液旋蒸至近干; 再用 20 mL 纯水将近干溶液复溶。充分溶解后, 取 5 mL 溶液至具塞离心管 (3.6) 中, 离心管中提前加入 2g 的阴离子交换树脂 (OH^-) 和氢离子交换树脂 (H^+) (3.7), 然后反复颠倒混合至少 5 min 进行脱盐, 静置 10 min 后将上清液转移至新的离心管中。再向有离子交换树脂的离心管中加入 5 mL 纯水, 重复颠倒混合和静置的过程, 最后将上清液合并至新的离心管中。将脱盐后的溶液用 0.22 μm 水相滤膜过滤, 取续滤液, 即得试样测定液, 待液相色谱仪检测。

4.3 色谱条件

a) 色谱柱: Shodex OHpak LB-802.5, 8.0 $\times$ 300 mm, 6 μm 或者相当的色谱柱, 两根色谱柱串联;

- b) 保护柱: Shodex OHpak LB-G 6B, 6.0×50 mm, 13 μm;
- c) 流动相: 水 (2.1) ;
- d) 流速: 0.5 mL/min;
- e) 进样量: 20 μL;
- f) 洗针液: 水 (2.1) ;
- g) 柱温: 80 ℃;
- h) 检测器及参数: 检测器为示差折光检测器, 检测器温度为 50 ℃;
- i) 洗脱时间: 60 min。

5 结果

5.1 SDFS 保留时间的确定

待仪器工作状态稳定后, 将定性用标准溶液 (4.1.4) 按照上述色谱条件 (4.3) 上机测定, 平行测定 2 次。根据蔗果三糖和 D-麦芽糖保留时间和基线分离效果, 确定碳水化合物聚合度>3 与聚合度<3 的分界值及待测组分保留时间区间, 定性用标准溶液连续 2 针进样叠加色谱图如图 1, 积分结果如表 1 所示。

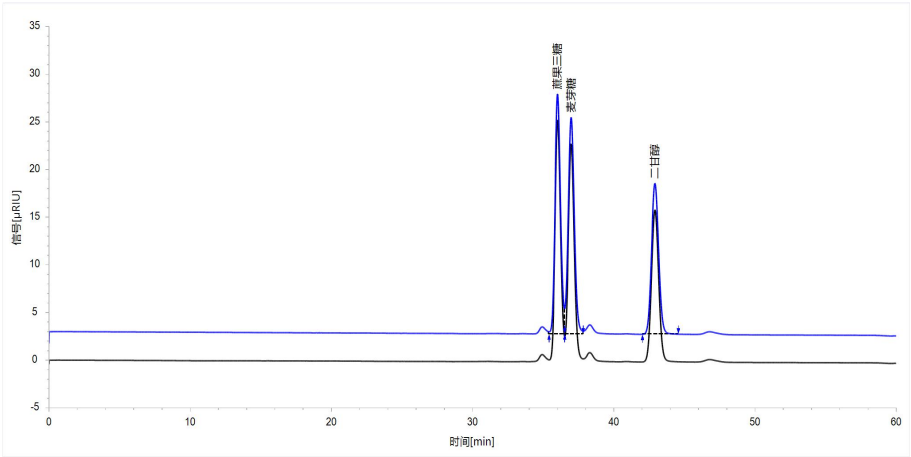


图 1 定性用标准溶液叠加色谱图

表 1 定性用标准溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (μ RIU. s)	峰高 (μ RIU)	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因子
蔗果三糖	36.002	682.826	25.169	42246	—	1.17
麦芽糖	36.976	684.461	22.721	35588	1.31	1.11
二甘醇	42.903	556.016	15.835	35077	6.97	1.09

依据图 1 及表 1 可知，由定性用标准溶液色谱图中蔗果三糖和 D-麦芽糖保留时间和基线分离效果，确定不可沉淀的可溶性膳食纤维（SDFS）与双糖的分界值为 36.520 min。

5.2 重复性测试

将 D-葡萄糖/二甘醇标准工作液（D-葡萄糖和二甘醇含量均为 2.0 mg/mL）连续进样 7 针，叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。

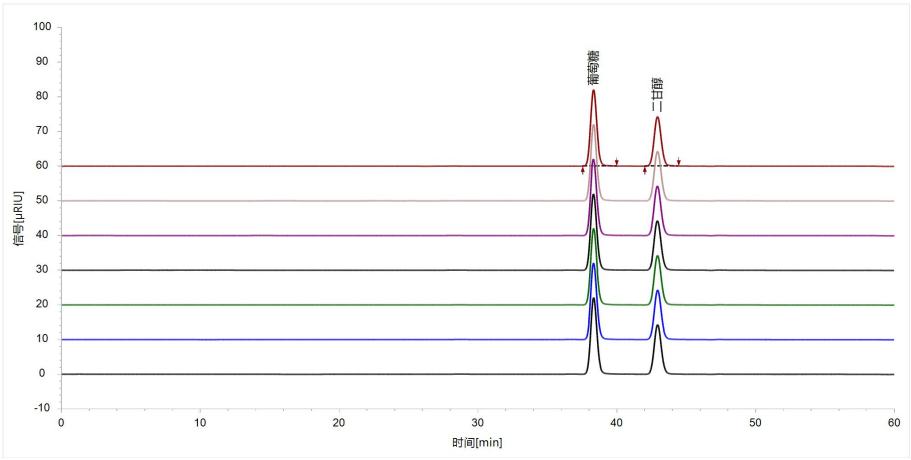


图 2 D-葡萄糖/二甘醇标准工作液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 D-葡萄糖/二甘醇标准工作液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物	项目	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
葡萄糖	保留时间 (min)	38.332	38.315	38.321	38.323	38.321	38.325	38.287	38.318	0.04
	峰面积 (μ RIU. s)	704.689	704.265	697.396	701.845	696.369	700.168	704.918	701.379	0.50
二甘醇	保留时间 (min)	42.944	42.940	42.931	42.918	42.918	42.927	42.922	42.929	0.02
	峰面积 (μ RIU. s)	514.125	510.738	511.258	509.218	510.392	512.785	512.639	511.594	0.33

由表 2 中数据可知，将 D-葡萄糖/二甘醇标准工作液（D-葡萄糖和二甘醇含量均为 2.0 mg/mL）连续进样 7 针进行重复性测试，葡萄糖保留时间的 RSD 为 0.04 %，峰面积的 RSD 为 0.50 %；二甘醇保留时间的 RSD 为 0.02 %，峰面积的 RSD 为 0.33 %，均具有良好的定性定量重复性。

5.3 D-葡萄糖响应因子（Rf）的确定

待仪器工作状态稳定后，将 D-葡萄糖/二甘醇标准系列工作液（4.1.3）按照上述色谱条件（4.3）上机测定。以标准系列工作液中 D-葡萄糖质量与二甘醇质量比值为横坐标，以 D-葡萄糖峰面积与内标二甘醇峰面积比值为纵坐标，绘制过（0，0）点校准曲线，曲线斜率即为响应因子（Rf）。

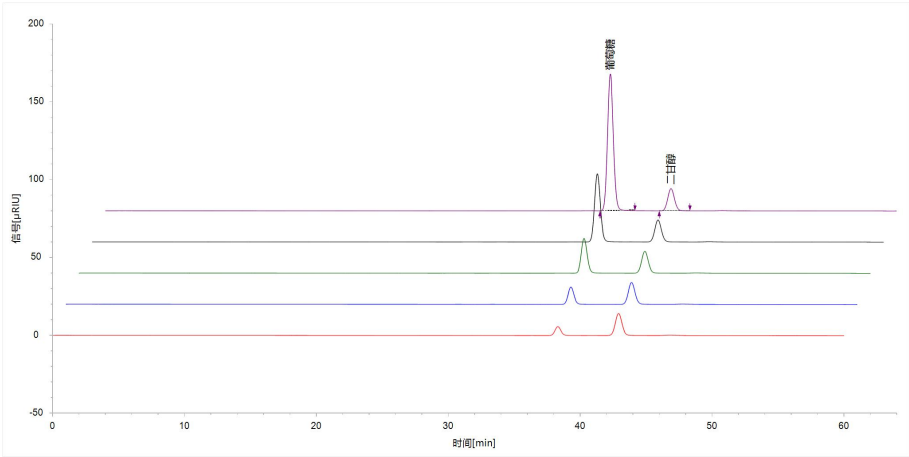
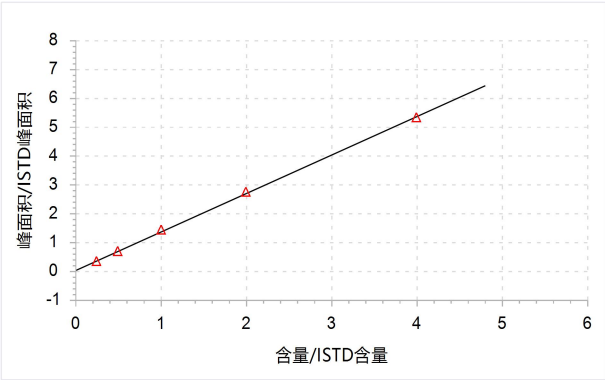


图 3 D-葡萄糖/二甘醇标准系列工作液叠加色谱图

表 3 D-葡萄糖/二甘醇标准系列工作液的校准曲线

目标物	校准曲线	线性方程、确定系数及响应因子
D-葡萄糖/二甘醇		线性方程： $y=1.33446*x+0.03754$ 确定系数： $R^2=0.9996$ 响应因子（Rf）=1.33446

由表 3 中校准曲线结果可知，葡萄糖在 0.5 mg/mL~8.0 mg/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系，曲线的确定系数 $R^2>0.999$ ，D-葡萄糖响应因子（Rf）为 1.33446。

5.4 SDFS 测定

将脱盐后试样测定液（4.2）上机测定，根据聚合度>3 聚合物峰面积（PASDFS）和二甘醇峰面积（PAIs）计算 SDFS 含量，计算公式如公式（1）。

$$X_{SDFS} = \frac{PA_{SDFS} \times m_{IS}}{PA_{IS} \times m \times Rf \times f} \times \frac{100}{1000} \quad \text{----公式 (1)}$$

式中： X_{SDFS} -----为试样中 SDFS 的含量，单位为克每百克（g/100g）；

PA_{SDFS} -----为试样测定液中待测物质峰面积，单位为 μ RIU. s；

PA_{IS} -----为试样测定液中内标物峰面积，单位为 μ RIU. s；

m_{IS} -----为试样酶解液中加入内标物质量，单位为毫克（mg）；

m -----为试样称量质量，单位为克（g）；

Rf -----为标准物质与内标物质响应因子，此处响应因子 $Rf=1.33446$ ；

f -----为试样因脱水、脱糖、脱脂导致质量变化的校正因子，若样品经多次处理，则将每个校正因子相乘得到总的校正因子；若试样无需处理，则为 1；

100-----为转换为百分比含量的系数；

1000-----为毫克转换为克的系数。

以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示，计算结果保留至小数点后 2 位。

空白溶液和试样测定液的色谱图如图 4~图 6 所示。

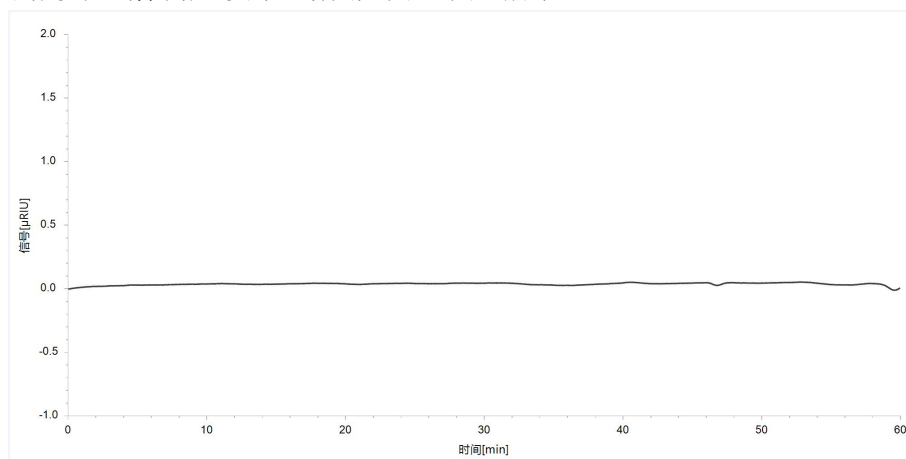


图 4 空白溶液的色谱图

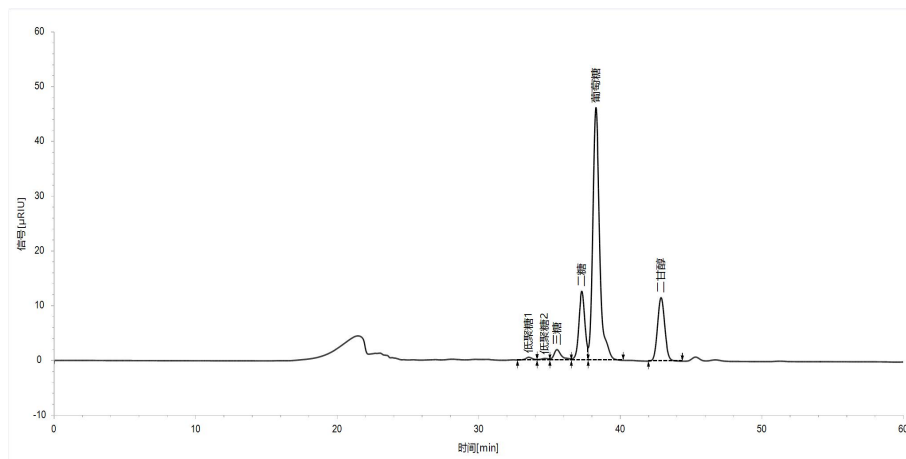


图 5 试样平行测定液 1 的色谱图

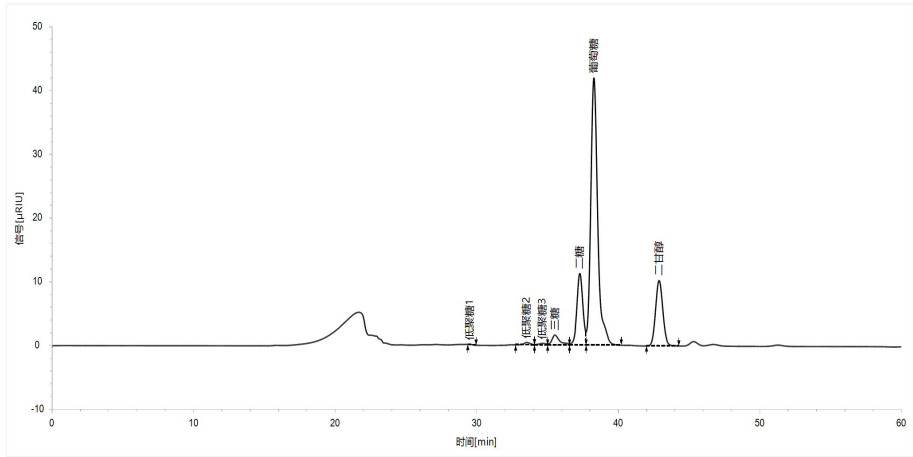


图 6 试样平行测定液 2 的色谱图

依据公式(1)进行计算，试样中经高效液相色谱仪测得的 SDFS 的含量结果如表 4 所示。

表 4 试样中 SDFS 含量结果表

试样	称样量 (g)	二甘醇峰面积 (μ RIU. s)	SDFS 总峰面积 (μ RIU. s)	SDFS (g/100g)	均值 (g/100g)	精密度 (%)	标准范围 (g/100g)
平行试样 1	1.0043	414.64	100.57	3.58	3.47	6.34	2.41~3.63
平行试样 2	1.0043	367.90	83.75	3.36			

从表 4 中结果可知，2 次平行测试中，试样中 SDFS 的结果分别为 3.58 g/100g、3.36 g/100g，即该试样中 SDFS 含量为 3.47g/100g，精密度为 6.34%，满足 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%的要求。

三、结论

本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定抗性糊精试样中不可沉淀的可溶性膳食纤维（SDFS）的含量。本实验以水为流动相，经 SEC 凝胶色谱柱分离，采用示差折光检测器检测，实验结果表明：由定性用标准溶液色谱图中蔗果三糖和 D-麦芽糖保留时间和基线分离效果，确定不可沉淀的可溶性膳食纤维（SDFS）与双糖的分界值为 36.520min；连续进样 7 针重复性测试中，葡萄糖保留时间的 RSD 为 0.04 %，峰面积的 RSD 为 0.50 %；二甘醇保留时间的 RSD 为 0.02 %，峰面积的 RSD 为 0.33 %，均具有良好的定性定量重复性；葡萄糖在 0.5 mg/mL~8.0 mg/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系，曲线的确定系数 $R^2>0.999$ ，D-葡萄糖响应因子（Rf）为 1.33446；2 次平行测试中，试样中 SDFS 的结果分别为 3.58 g/100g、3.36 g/100g，即该试样中 SDFS 含量为 3.47g/100g，精密度为 6.34%，满足 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%的要求。因此，悟空 K2025 高效液相色谱仪配备示差折光检测器，可用于《GB 5009.88-2023 食品安全国家标准 食品中膳食纤维的测定》中不可沉淀的可溶性膳食纤维（SDFS）的含量测定。

附 1：仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<u>Pump Unit</u> 泵单元
1	62 Mpa 二元高压输液泵（内置溶剂托盘）
2	流动相瓶（肖特瓶，1 L）
3	脱气机
4	四通道溶剂选择阀
5	自动在线清洗系统
B)	<u>Sample Injector</u> 进样器
1	自动进样器
2	样品瓶（2 mL，含瓶盖）
3	脱气组件
4	100 μ L 定量环
C)	<u>Column Oven</u> 柱温箱
1	立式柱温箱（室温以下 10℃至 90℃）
2	色谱柱：Shodex OHpak LB-802.5，8.0×300 mm，6 μ m，两根色谱柱串联
3	保护柱：Shodex OHpak LB-G 6B，6.0×50 mm，13 μ m
D)	<u>Detector</u> 检测器
1	示差折光检测器
E)	<u>Workstation</u> 工作站
1	Wookinglab 色谱工作站（中文版）00.03.58.05

附 2：悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪（可靠、精准、友好、合规）



报告人：王文霞

联系方式：15562662085