

高效液相色谱法测定发酵乳中的乳糖、葡萄糖和半乳糖

李琦, 张兰威*, 张英春, 易华西, 杜明, 韩雪, 郭春锋, 李婧妍, 薛超辉
(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要: 利用高效液相色谱法测定发酵乳中乳糖、葡萄糖、半乳糖的含量。样品通过 Carrez 法处理沉淀蛋白, 采用 Aminex HPX 87H 色谱柱, 5mmol/L H_2SO_4 溶液为流动相, 流速 0.6mL/min。结果表明: 利用该法进行色谱分析各组分达到较好的分离, 各糖组分在 0.5~12mg/mL 范围内呈现良好线性关系, 相关系数为 0.9986~0.9999 ($n=5$), 样品回收率为 96.45%~101.78%; 精密度实验表明, 各组分峰面积 RSD 在 0.62%~4.21% 之间 ($n=5$); 重现性实验表明, 各组分含量测定值 RSD 为 1.86%~3.44%。该法测定样品快速、准确、可靠, 为发酵乳贮藏过程中关键糖含量的测定提供参考依据。

关键词: 高效液相色谱法; 发酵乳; 乳糖; 葡萄糖; 半乳糖

Determination of Lactose, Glucose and Galactose Contents in Fermented Milk by HPLC

LI Qi, ZHANG Lan-wei*, ZHANG Ying-chun, YI Hua-xi, DU Ming, HAN Xue,
GUO Chun-feng, LI Jing-yan, XUE Chao-hui
(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: An HPLC method for the determination of lactose, glucose and galactose in fermented milk was established. Proteins from samples were precipitated with Carrez reagent. The chromatographic separation was achieved on an Aminex HPX 87H column using 5 mmol/L H_2SO_4 as mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min. Good separation was obtained for the analytes. The calibration curves established showed good linearity over the concentration range of 0.5 to 12 mg/mL, with a correlation coefficient of 0.9986 to 0.9999 ($n=5$). The mean spike recoveries for the sugars in fermented skim milk prepared in our lab varied from 96.45% to 101.78% with a RSD between 0.62% and 4.21% ($n=5$). The reproducibility RSDs ranged from 1.86% to 3.44%. The method was rapid, accurate and reliable.

Key words: high pressure liquid chromatography (HPLC); fermented milk; lacose; glucose; galactose

中图分类号: O657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-00162-05

酸奶中的活乳酸菌在贮藏或货架期间会代谢残余的乳糖继续产生乳酸, 此现象被称为酸奶后酸化^[1]。其代谢的主要过程为乳酸菌利用 β -半乳糖苷酶将乳糖分解为葡萄糖和半乳糖, 前者经 EMP 途径形成丙酮酸, 然后在 NADH 参与下由乳酸脱氢酶将其还原为乳酸。后酸化现象严重影响了酸奶的口感品质和益生菌活力^[2-3]。解决后酸化问题的关键在于研究乳酸菌代谢糖类产生乳酸的机制, 因此需对其贮存过程中涉及代谢的关键糖类物质即乳糖、葡萄糖、半乳糖含量及其变化过程进行检

测以找出乳酸菌后发酵产酸的关键步骤。因此, 准确测定各关键糖的含量对研究酸奶后酸化机制并解决后酸化问题尤为重要。

对糖类物质的检测已报道多种方法, 如高效液相色谱法、气相色谱法、纸层析法及酶法等^[4]。其中气相色谱法是测定糖及酸类物质较常用的方法, 但因糖类物质沸点高, 不易气化而需对其进行衍生化处理, 方法繁琐且易产生误差^[5]; 纸层析法灵敏度较低, 操作过程繁琐, 定量困难, 难以满足检测需求^[6]; 酶法进行样品

收稿日期: 2011-03-17

基金项目: 黑龙江省国际合作项目(GA06B05); 黑龙江省农业成果转化项目(NB08B007)

作者简介: 李琦(1985—), 女, 博士研究生, 研究方向为乳科学。E-mail: liqihit@163.com

*通信作者: 张兰威(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳科学、发酵微生物。E-mail: lanweizhang@yahoo.com.cn

测定时常受微生物培养基成分的干扰,且用该法对乳糖测定需先将其还原为单糖再进行,样品处理较复杂,易产生误差^[7];高效液相色谱法(high pressure liquid chromatography, HPLC)用于测定糖类物质,可快速、准确、可靠的对样品组分进行定性或定量检测,样品处理方法简单、快速。

目前利用高效液相色谱法检测乳制品中乳糖、葡萄糖、半乳糖已有较多报道,Mullin等^[8]利用HPLC对干酪进行了乳糖的分析测定;Laye等^[9]利用HPLC检测酸奶发酵过程中乳糖的含量;Samona等^[10]对贮藏酸奶中的半乳糖的含量进行检测。但由于葡萄糖和半乳糖互为手性同分异构体,为HPLC法对其分离检测增添了难度^[11-12]。HPLC色谱柱的选择对于单糖的分离检测非常重要,使用氨基键合相分析柱难于将单糖完全分离^[7,13]。离子交换树脂柱Aminex HPX 87在国外已应用于酸奶的糖类样品测定中^[11,13],可将单糖很好的分离,而国内利用此分析柱测定发酵乳中乳糖、葡萄糖、半乳糖还未见报道。

嗜热链球菌是发酵乳常用的乳酸菌种,也是酸奶发酵的两株必须菌之一。本实验通过高效液相色谱法利用Aminex HPX 87H分析柱,配合使用示差折光检测器(refractive index detector, RID)测定嗜热链球菌发酵乳在其贮存过程中乳糖、葡萄糖以及半乳糖的含量,为酸奶后酸化代谢机制的研究提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种与试剂

嗜热链球菌菌株lw1703la 哈尔滨工业大学食品学院贮藏;乳糖、半乳糖、葡萄糖标准品(均为色谱纯)美国Sigma公司;乙酸锌、亚铁酸钾、冰乙酸 美国Amresco公司。脱脂乳粉 双城雀巢公司。

1.2 仪器与设备

2695型高效液相色谱仪(配备四元梯度泵,150位自动进样器,2414型示差折光率检测器,Waters-Empower色谱管理系统) 美国Waters公司;Aminex HPX 87H分析柱(300mm×7.8mm,9μm) 美国Bio-Rad公司;PB-10型pH计 德国Satoris公司;DHP-9052恒温培养箱上海一恒公司;AE100S电子分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 脱脂发酵乳的制作与贮藏

嗜热链球菌lw1703la接种到质量分数12%的脱脂乳培养基中,37℃培养12h,连续传代活化3次,达到要求的活性。按体积分数3%的比例接种到50mL 12%的杀菌脱脂乳(115℃,15min)中混匀,42℃恒温培养至

pH4.55,立即冷却终止发酵,4℃后熟24h,将发酵乳移至25℃培养箱,将发酵乳在此条件贮藏10d^[1]。

1.3.2 样品的处理

1.3.2.1 三氯乙酸(TCA)法

称取均匀嗜热链球菌发酵乳样品5.0000g(精确至0.1mg),加25g水溶解,缓慢加入10% 5mL三氯乙酸溶液,加入至溶液使质量为50.0000g(精确至0.1mg),磁力搅拌30min,放置室温后5000r/min离心15min,获上清液并用0.22μm微孔滤膜过滤以去除蛋白及细菌菌体,-20℃保存^[11]。

1.3.2.2 Carrez 法

称取均匀嗜热链球菌发酵乳样品5.0000g(精确至0.1mg),加25g水溶解,缓慢加入Carrez I溶液和Carrez II溶液各2.5mL,加水至溶液使质量为50.0000g(精确至0.1mg),磁力搅拌30min,放置室温后5000r/min离心15min,获上清液并用0.22μm微孔滤膜过滤以去除蛋白及细菌菌体,-20℃保存。其中Carrez I溶液:称取10.6g亚铁氰化钾,加水溶解至100mL;Carrez II溶液:称取21.9g乙酸锌加3mL冰乙酸,加水溶解并稀释至100mL^[13]。

1.3.3 乳糖、葡萄糖及半乳糖的检测

1.3.3.1 色谱条件

色谱柱为Bio-Rad Aminex HPX 87H(300mm×7.8mm,9μm),流动相为5mmol/L H₂SO₄溶液,柱温60℃,流速0.6mL/min。

1.3.3.2 标准溶液的配制

配制5组混标溶液,使乳糖质量浓度分别为4、6、8、10、12mg/mL;半乳糖质量浓度分别为1、2、3、4、5mg/mL;葡萄糖质量浓度分别为0.5、1、1.5、2、2.5mg/mL。

1.3.3.3 分离与定量

将处理后的样品溶液进行HPLC色谱分析,进样量为20μL,每样品进样两针,采用外标法定量。

1.3.3.4 线性范围和相关系数及检出限

按1.3.3.2节方法配制各组标准溶液并进行色谱测定,以标准品的峰面积(Y)对其质量浓度(X/(mg/mL))绘制工作曲线。回归方程、相关系数和检出限。

1.3.3.5 回收率的测定

精确称取贮藏10d的发酵乳样品5.0000g并向样品中添加乳糖、葡萄糖、半乳糖的标准品依次为60、80、100mg,按Carrez法处理样品。

$$\text{样品回收率}/\% = \frac{\text{加标样品检出量} - \text{样品量}}{\text{标准品加入量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3.6 精密度实验

取贮藏 10d 的同一发酵乳样品 5.0000g(含葡萄糖 60mg), 按 1.3.2.2 节方法处理后, 平行进样 5 针, 经色谱测定各组分峰面积。

1.3.3.7 重现性实验

取 3 份贮藏 10d 发酵乳样品, 质量分别为 4.9998、5.0003、4.9999g。按 1.3.2.2 节方法进行样品处理后, 测定其各组分含量。

1.3.4 统计分析

数据采用 SPSS 14.0 软件进行统计分析, 数据间的显著性差异利用 ANOVA($P < 0.05$)进行分析。

2 结果与分析

2.1 分离体系与分析条件

2.1.1 样品处理方法的选择

为避免发酵乳样品对色谱柱的污染及对样品测定量的干扰, 需在色谱检测前对样品进行处理以去除样品中的脂肪, 蛋白及固醇类物质^[14]。本实验选择三氯乙酸法和 Carrez 试剂法分别对样品进行处理, 以样品乳糖、葡萄糖、半乳糖的峰面积及测定结果为指标, 选择最佳样品处理方法。不同处理色谱图见图 1。

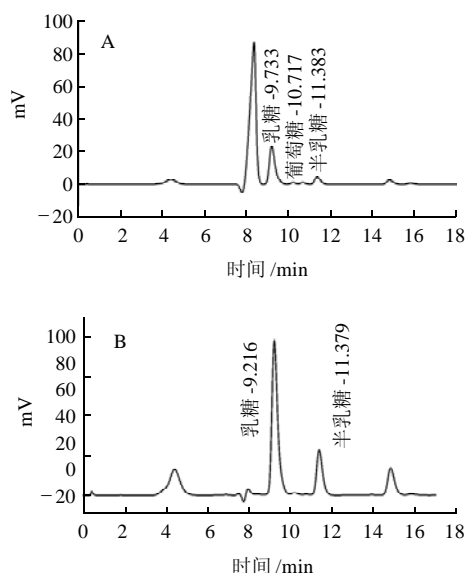


图 1 三氯乙酸法处理样品(A)和 Carrez 法处理样品(B)色谱图
Fig.1 HPLC chromatograms of fermented milk treated with TCA or Carrez reagents

表 1 三氯乙酸法和 Carrez 法的样品测定值

Table 1 Results of determination of fermented milk treated with TCA or Carrez reagents

方法	三氯乙酸法			Carrez 法		
	乳糖	葡萄糖	半乳糖	乳糖	葡萄糖	半乳糖
峰面积	377370	37502	79085	236035	未检出	63753
测定值/(mg/mL)	70.34	8.04	13.19	41.83	未检出	10.39

三氯乙酸法目前对于乳制品的处理较为常用, 结果如表 1 所示, 样品经 TCA 处理后进行 HPLC 测定时由于溶剂峰的存在会影响并增大各组分的色谱峰高^[15], 需对标准样品做同样处理后才能准确定量, 过程繁琐且易产生误差。使用 Carrez 法对样品进行处理, 其原理为 Carrez 试剂是通过亚铁氰化钾(Carrez I)及乙酸锌(Carrez II)反应形成氰亚铁酸锌沉淀, 使溶液中的蛋白质共同沉淀下来。用该法处理后可直接经微膜过滤, 方法简单快速, 在质谱分析中能消除杂质对样品的潜在影响, 排除干扰能力强。

2.1.2 HPLC 条件的确定

发酵乳中乳糖的初始代谢产物为互为手性同分异构体的葡萄糖和半乳糖, 为发酵奶中成分的分离和检测增添了难度。Indy 利用的 Alphasil 5NH₂ 色谱柱^[13]、Plaga 利用的 Nucleosil NH₂^[7]及 Jeon 使用的 Amino Spheir-5 色谱柱^[16]为氨基键合相分析柱, 难于将葡萄糖和半乳糖分离。色谱柱 Sugar PAK I 虽能较好的分离葡萄糖和半乳糖却不能将乳糖及其他二糖分离^[11]。而离子交换树脂柱 Aminex HPX 87 通过离子调节分配层析技术分离不同化学特性的混合物可以较好的分离各种糖类物质并准确定量^[17]。

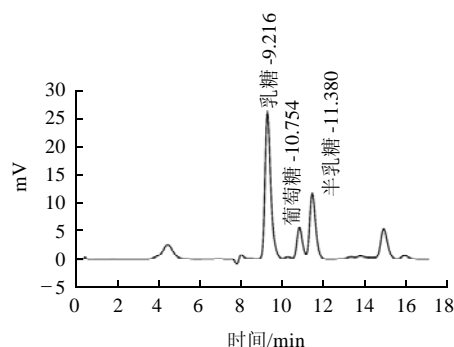


图 2 标准样品糖类 HPLC 色谱图
Fig.2 HPLC chromatogram of mixed sugar standards

关于色谱条件的选择, 选取 5mmol/L H₂SO₄ 溶液作为流动相, 以 0.5、0.6、0.7mL/min 不同流速测定了贮藏酸奶样品中各组分的含量, 以葡萄糖和半乳糖两峰的分度为评价指标, 选择分离效果最佳的流动相流速。如表 2 所示, 当流动相流速为 0.6mL/min 时, 葡萄糖和半乳糖分离效果较好, 分度为 1.445, 而减缓流速为 0.5mL/min 并不能使分度提高, 因此选取流动相流速为 0.6mL/min, 且对发酵乳样品各组分的测定在 17min 内完成(图 2), 检测更为快速、准确。

表 2 不同流速对样品的分离度的影响

Table 2 Effect of flow rate on the degree of separation of samples

流速/(mL/min)	0.5	0.6	0.7
分离度	1.440	1.445	1.382

2.1.3 贮藏期间发酵乳中乳糖、葡萄糖、半乳糖的含量

选取1株发酵性能稳定的嗜热链球菌lw17031a,按1.3.1节方法发酵乳,分别在贮存期为0、4、10d测定其乳糖、葡萄糖、半乳糖的含量。结果如表3所示。

表3 贮藏期间发酵乳中乳糖、葡萄糖、半乳糖的含量

Table 3 Changes in sugar contents in fermented milk during storage as determined by the HPLC method

贮藏时间/d	乳糖/(mg/mL)	葡萄糖/(mg/mL)	半乳糖/(mg/mL)
0	50.01	未检出	6.67
4	43.82	未检出	9.74
10	42.93	未检出	10.01

表3为lw17031a发酵发酵乳25℃贮藏期间的关键糖含量的变化,其中乳糖的含量从新鲜酸乳的50.01mg/mL下降至42.93mg/mL。Richmond等^[17]指出在5℃条件下发酵乳贮藏50d乳糖含量为4.34%~3.70%;Toba等^[6]报道发酵乳5℃贮存10d乳糖含量从最初的4.73%下降至3.89%。由于发酵原料乳的起始乳糖含量,发酵原料乳的杀菌热处理条件,发酵及贮藏条件均会对乳糖的含量测定产生较大影响^[13,15],本实验使用的发酵原料乳由12%脱脂乳粉配制而成,Alm指出加入脱脂奶粉后会使原料乳的乳糖含量增加^[18],这可能是本实验乳糖测定值偏高的原因。

如图1(B)所示,本实验未检出嗜热链球菌发酵乳中葡萄糖的含量,这与Sanona^[10]和Li^[19]等报道一致,其他研究中关于发酵乳在发酵或贮藏中葡萄糖的检测值也极低。Toba利用气相色谱法检测出贮存发酵乳中葡萄糖含量仅为0.02%~0.04%^[6];Goodenough等^[20]利用纸层析法检测新鲜发酵乳的葡萄糖含量为0.00%~0.12%;Richmond等^[12]研究表明发酵乳贮藏至50d才可检测到葡萄糖且痕量。这种现象是由于葡萄糖在乳糖代谢产生时通过EMP途径瞬间转化而不会排放到胞外,因此含量极低未达到HPLC检出限^[11]。

由于半乳糖激酶在嗜热链球菌体内含量极低半乳糖不能通过Leloir代谢途径发生转化,最终在乳糖透膜酶的作用下排放到胞外^[21],本实验对嗜热链球菌发酵乳贮藏中半乳糖含量检测结果为6.67~10.01mg/mL,说明半乳糖处于不断累积状态,这与Thomas等^[22]关于嗜热链球菌半乳糖代谢选择性的结论一致。

2.2 HPLC的方法学考察

2.2.1 HPLC检测发酵乳线性范围和相关系数及检出限

按1.3.3.2节方法配制各组标准溶液并进行色谱测定,工作曲线、回归方程、相关系数和检出限见表4,

可知各组分的质量浓度0.5~12mg/mL与峰面积呈现良好的线性关系,相关系数在0.9986~0.9999之间,符合定量要求。根据信噪比 $R_{SN}=3$ 计算最低检出限。结果表明:乳糖、葡萄糖、半乳糖标准溶液的最低检出限分别为0.2、0.26、0.25mg/mL。

表4 HPLC方法检测发酵乳中各种糖的回归方程和相关系数及检出限

Table 4 Regression equations, correlation coefficients and limits of detection for lactose, glucose and galactose

组分	回归方程	相关系数	检出限/(mg/mL)
乳糖	$Y = 53792X - 978.79$	0.9999	0.2
葡萄糖	$Y = 48251X - 1271$	0.9991	0.26
半乳糖	$Y = 54357X + 2201$	0.9986	0.25

2.2.2 回收率测定

表5 HPLC方法的添加回收率实验($n=3$)

Table 5 Mean spike recoveries and RSDs for lactose, glucose and galactose in fermented skim milk prepared in our lab ($n=3$)

组分	本底量/mg	加入量/mg	测定值/mg	回收率/mg	平均回收率/%	RSD/%
乳糖	178.11	60	233.88	98.22	98.80	0.99
	178.11	80	253.59	98.25		
	178.11	100	277.93	99.93		
葡萄糖	0.00	60	61.73	102.88	101.78	1.25
	0.00	80	81.64	102.05		
	0.00	100	100.40	100.40		
半乳糖	46.83	60	101.32	94.84	96.45	1.46
	46.83	80	123.65	97.48		
	46.83	100	142.47	97.03		

由表5可见,乳糖、葡萄糖、半乳糖的平均回收率分别为98.80%、101.78%、96.45%,RSD分别为0.99%、1.25%、1.46%,表明该方法具有高的准确度。

2.2.3 精密度实验

精密度系指在规定的测试条件下,同一个均匀样品,经多次取样测定所得结果之间的接近程度,本实验采用峰面积的相对标准偏差(RSD)来表示,经测定乳糖、葡萄糖、半乳糖酸峰面积的RSD分别为2.46%、4.21%、0.62%($n=5$),峰面积RSD均不大于5%,表明该法实验精密度较高。

2.2.4 重现性实验

重现性实验结果表明,发酵乳样品中乳糖含量的RSD为1.86%,葡萄糖含量的RSD为3.44%,半乳糖含量的RSD为3.23%,RSD均不大于5%,表明该法重现性较好。

3 结 论

本研究利用高效液相色谱法测定发酵乳中乳糖、葡萄糖、半乳糖的含量,采用 Aminex HPX 87H 色谱柱,5mmol/L H₂SO₄ 溶液为流动相,流速 0.6mL/min,使用该法测定使各组分达到较好的分离,利用 Carrez 法处理样品简便,快速,方法的回收率和精密度较高,重现性较好,结果稳定。

参考文献:

- [1] 郭清泉, 张兰威, 夏秀芳. 普通酸奶制品在贮存过程中发酵剂菌的 β -半乳糖苷酶活性测定及变化规律研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(3): 34-36.
- [2] DONKOR O N, HENRIKSSON A, VASILJEVIC T, et al. Effect of acidification on the activity of probiotics in yogurt during storage[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(10): 1181-1189.
- [3] DONKOR O N, NILMINI S L I, STOLIC P, et al. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(6): 657-665.
- [4] 段善海, 缪铭. 现代分析技术在酸奶研究中的应用[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 854-857.
- [5] 张英春, 董爱军, 杨鑫, 等. 高效液相色谱法测定蓝莓果浆糖的组成和含量[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 229-231.
- [6] TOBA T, WATANABE, ADACHI S. Quantitative changes in sugars, especially oligosaccharides during fermentation and storage of yogurt[J]. Journal Dairy Science, 1982, 66(1): 17-20.
- [7] PLAGA A, STIIMPFEL J, FIEDLER H P. Determination of carbohydrates in fermentation processes by high performance liquid chromatography[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1989, 32(1): 45-49.
- [8] MULLIN W J, EMMONS D B. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography[J]. Food Research International, 1997, 30(2): 147-151.
- [9] LAYE I, KARLEKIND D, MORR C V. Chemical, microbiological and sensory properties of plain nonfat yogurt[J]. Journal of Food Science, 1993, 58(5): 991-996.
- [10] SAMONA A, ROBINSON R K, MARAKIS S. Acid production by *Bifidobacteria* and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk[J]. Food Microbiology, 1996, 13(4): 275-280.
- [11] VALVERDE V C, VILLA C M, HERRANZ J. Determination of soluble carbohydrates in yogurts by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Dairy Science, 1983, 67(4): 759-763.
- [12] RICHMOND M L, HARTE B R, GRAY J I, et al. Determination of sugars in yogurt and microbiological media by high performance liquid chromatography during processing and subsequent storage[J]. Journal of Dairy Science, 1987, 70(6): 1140-1147.
- [13] INDYK H E, EDWARDS M J, WOOLLARDB D C. High performance liquid chromatographic analysis of lactose-hydrolysed milk[J]. Food Chemistry, 1996, 57(4): 575-580.
- [14] 赵青山, 冯志彪. 高效液相色谱法在食品分析领域的应用[J]. 生命科学仪器, 2005, 3(6): 21-24.
- [15] EUBER J R, BRUNNER J R. Determination of lactose in milk products by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Dairy Science, 1979, 62(5): 685-690.
- [16] JEON I J, MANTHA V R. High performance liquid chromatography analysis of oligosaccharides formed during β -galactosidase action on lactose[J]. Journal of Dairy Science, 1985, 68(3): 581-588.
- [17] RICHMOND M L, BARFUSS D L, HARTE B R, et al. Separation of carbohydrates in dairy products by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Dairy Science, 1982, 65(8): 1394-1400.
- [18] ALM L. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals[J]. Journal of Dairy Science, 1982, 65(3): 345-352.
- [19] LI B W, SCHUHMANN P J, HOLDEN J M, et al. Determination of sugars in yogurt by gas-liquid chromatography[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983, 31(5): 985-989.
- [20] GOODENOUGH E R, KLEYN D H. Qualitative and quantitative changes in carbohydrates during the manufacture of yogurt[J]. Journal of Dairy Science, 1975, 59(1): 45-47.
- [21] GONZAILEZ J I, ROMERO C, MORALES F J, et al. An improved method for determination of the activity of β -galactosidase in yoghurt by high-performance liquid[J]. Chromatography chromatographia, 1996, 43(2): 85-88.
- [22] THOMAS T D, CROW V L. Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostat cultures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 48(1): 186-191.