

超滤离心净化-高效液相色谱法同时测定 配方乳粉中的单糖、双糖和低聚果糖

许丽珠¹, 李秀英¹, 黄金凤¹, 陈晓丹², 邓伟恒¹, 黄伟乾¹,
冼燕萍¹, 曾庆祝², 郭新东^{1*}

(1. 广州质量监督检测研究院, 广州 510110; 2. 广州大学化学化工学院, 广州 510006)

摘要: 目的 采用超滤离心截留技术快速除杂, 结合高效液相色谱仪, 建立一种同时检测配方乳粉中 7 种糖类化合物(果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖)的分析方法。**方法** 经实验优化, 选用截留分子量 3000 的超滤离心管高速离心去除样品溶液中的蛋白质、核酸和多糖等大分子物质, 以乙腈-水为流动相(75: 25, v:v)等度洗脱, Luna 氨基色谱柱分离, 示差折光检测器检测。**结果** 7 种目标分析物在 0.15~10.0 mg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 方法检出限在 0.039~0.087 g/100 g 之间; 当添加水平为 0.50~2.0 g/100 g 时, 回收率在 81.2%~105% 之间, 相对标准偏差(RSD, n=6)为 1.1%~6.2%。**结论** 该方法与国标方法的检测结果一致, 且前处理简单、结果准确、回收率高, 适合配方乳粉中 7 种单糖、双糖和低聚果糖的测定。

关键词: 超滤离心; 高效液相色谱法; 单糖; 双糖; 低聚果糖; 配方乳粉

Simultaneous determination of monosaccharides, disaccharides and fructo-oligosaccharides in milk powder by ultra-filtration clean up coupled with high performance liquid chromatography

XU Li-Zhu¹, LI Xiu-Ying¹, HUANG Jin-Feng¹, CHEN Xiao-Dan², DENG Wei-Heng¹,
HUANG Wei-Qian¹, XIAN Yan-Ping¹, ZENG Qing-Zhu², GUO Xin-Dong^{1*}

(1. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510110, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: Objective To establish a simple and rapid method based on ultra-filtration clean up method and high performance liquid chromatography (HPLC) to determine 7 kinds of carbohydrate compounds (fructose, glucose, sucrose, lactose, kestose, nystose and 1F-fructofuranosylnystose) in milk powder. **Methods** Milk powder sample was dissolved by water, and then treated with ultra-filtration centrifugal molecular weight cut-off 3000 tube to remove protein, nucleic acid and polysaccharide macromolecular substances by high-speed centrifugation. The separation was performed on a Luna NH₂ column with isocratic elution of acetonitrile: water (75:25, v:v) as the mobile phase. The analytes were determined by a refractive index detector (RID).

基金项目: 广东省质量技术监督局科技项目(2013PS04)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of Administration of Quality and Technology Supervision of Guangdong Province (2013PS04)

*通讯作者: 郭新东, 教授, 主要研究方向为食品营养与安全检测技术。E-mail: gdone@21cn.com

Corresponding author: GUO Xin-Dong, Professor, Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, No.38, Baqi er Road, Guangzhou 510110, China. E-mail: gdone@21cn.com

Results Under the optimal conditions, the calibration curves were linear in the range of 0.15 to 10.0 mg/mL with correlation coefficients larger than 0.999. The limits of detection (LODs) were from 0.039 to 0.087 g/100 g. The mean recoveries for milk powder sample at three spiked concentration levels of 0.50~2.0 g/100 g were in the range of 81.2% to 105%, and the relative standard deviations (RSD) ranged from 1.1% to 6.2% ($n=6$).

Conclusion This method is simple, rapid, and it is suitable for the identification and quantification of monosaccharides, disaccharides and fructo-oligosaccharides in milk powder.

KEY WORDS: ultra-filtration; high performance liquid chromatography; monosaccharides; disaccharides; fructooligosaccharides; milk powder

1 引言

低聚果糖(fructooligosaccharides, FOS), 又称寡果糖或蔗果低聚糖, 具有改善消化系统功能, 促进肠道有益菌增殖, 防止腹泻和便秘, 促进钙吸收, 预防龋齿等生理功能^[1,2], 葡萄糖、果糖、蔗糖和乳糖等糖类物质是乳粉的主要能量来源和重要营养素。然而摄入过多的糖类物质会带来一定的健康问题, 如龋齿、肥胖、糖尿病、高血压等。因此, 为了保证和控制乳粉质量, 建立简单可靠的检测方法对其中糖类物质的成分及含量分析、测定, 进而考察产品的功效, 具有重要意义。

目前, 国内对乳粉中糖类物质的检测方法主要有化学检测法^[3,4]、高效液相色谱法^[5-10]、离子交换色谱法^[11-14]等。高效液相色谱法具有普及率高、操作简便、快速、分离效果好等特点, 是目前检测糖类物质的主要手段; 离子交换色谱法具有绿色环保、快速灵敏等优点, 但易受复杂基质的干扰; 此外, 亦有其它关于食品中低聚果糖测定技术的报道, 如薄层色谱法^[15]、气相色谱-质谱法^[16]、液相色谱质谱联用法^[17,18]和基质辅助激光解吸离子化质谱法^[19]等; 然而, 这些方法在检测低聚果糖时受到处理复杂(如样品衍生)、仪器昂贵、或者检测灵敏度低等因素限制, 难以在实际检测中应用。

在样品前处理净化方面, 主要应用沉淀蛋白法, 如三氯乙酸沉淀法、亚铁氰化钾-乙酸锌沉淀法, 但沉淀法在除去样品中蛋白质干扰的同时也可能引入杂质干扰检测, 另外使用含金属离子高的沉淀剂对液相色谱柱的损伤较大。超滤离心法操作简单, 且不引入干扰或杂质, 是一种简单、快速的去除蛋白质的方法^[20]。本文基于超滤离心法的特点结合高效液相色谱法在低聚果糖的检测上的优势, 通过优化超滤

离心和液相色谱分离的条件, 建立了超滤离心净化-高效液相色谱法测定乳粉中7种单糖、双糖和低聚果糖的测定方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2695/2414 高效液相色谱仪配备示差检测器(美国 Waters 公司); 3K15 高速离心机(美国 Sigma 公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

果糖(fructose, Fru)、葡萄糖(glucose, Glu)、蔗糖(sucrose, Suc)、乳糖(Lactose, Lac)标准品来源于 Dr. Ehrenstorfer GmbH; 蔗果三糖(1-kestose, GF₂)、蔗果四糖(nistose, GF₃) 和 蔗 果 五 糖(1F-fructofuranosylnystose, GF₄)的标准品购自日本 WOKO 公司; 乙腈(HPLC 级, 德国 CNW 公司); 亚铁氰化钾和乙酸锌(分析纯, 广州化学试剂厂); 超纯水(18.2 MΩ, 实验室自制); 超滤离心管(1.5 mL, 截留分子量分别是 3 K、10 K, PALL 公司)。

乳粉样品均购自本地大型超市。

2.2 标准溶液的配制

单标标准储备液: 分别称取各种糖标准品 0.25 g(精确至 0.1 mg)于 150 mL 烧杯中, 用超纯水溶解, 转移并定容至 25 mL 容量瓶中, 保存在 4 ℃冰箱中。

混合标准工作液: 分别取配制好的各单标标准储备液超纯水配成不同浓度的混合标准工作液, 保存在 4 ℃冰箱中。

2.3 样品的处理

称取 5.00 g 乳粉样品于 100 mL 容量瓶中, 加入 80 mL 超纯水溶解后超声振荡提取 10 min, 取出后用超纯水定容, 振摇, 取样液于超滤管中, 以 10500 r/min 的速度高速离心 10 min, 取清液进行高效液相

色谱分析。

2.4 色谱条件

色谱柱: Luna 氨基柱($250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm } i.d.$, $5.0\text{ }\mu\text{m}$, 菲罗门); 检测器: 示差折光检测器, 温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相: 乙腈+水=75+25(*v*:*v*), 等度洗脱; 流速: 1.0 mL/min ; 进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$; 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 采集时间: 60 min。

3 结果与讨论

3.1 前处理条件的优化

3.1.1 超滤离心管截留分子量的选择
乳粉样品基质复杂, 含有大量蛋白质、脂类、有机小分子和矿物质等, 采用超滤离心管离心样品, 大分子物质截留在超滤膜上, 而糖等小分子物质则转移到滤液中, 因此选择合适截留分子的超滤离心管很重要。比较了截留分子量3000、10000的超滤管离心样品的情况, 结果表明截留分子量10000的超滤管处理后样品出现透滤现象, 滤液混浊; 而截留分子量3000的超滤离心管处理后获得澄清的滤液, 因此选择截留分子量3000的超滤离心管处理样品。

3.1.2 超滤离心条件的优化

为了获得良好的杂质去除效果, 将乳粉样品按2.3溶解、超声提取后, 样液用于考察超滤离心的速度(7000 r/min ~ 15000 r/min)与时间(2~15 min)对7种糖的回收率的影响, 如图1所示。结果表明, 超滤离心速度大于 12000 r/min 离心2 min时出现透滤, 滤液混浊; 而离心速度低于 10000 r/min 时无法获得滤液; 离心时间太短, 滤液体积太少; 离心速度在 10500 r/min ~ 11500 r/min , 样品中7种糖的回收率在81.2%~92.4%, 改变离心速度回收率差异不明显。然后考察了离心时间的影响, 离心5 min后, 随着离心时间的增加, 回收率保持在83%~91%, 增加不明显, 但是滤液增多, 有利于上机测试, 经过反复考察确定最佳的离心条件是 10500 r/min 离心10 min可获得足够体积的澄清滤液。

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 流动相的选择

在70%~80%范围内考察不同比例的乙腈-水作为流动相, 实验结果发现, 乙腈在流动相中比例增大, 色谱峰形有效改善, 有利于各组分的基线分离, 但是分析时间延长; 当增加流动相中水的比例时, 分离度变小, 分析时间变短。但水的比例过大, 将不利于流

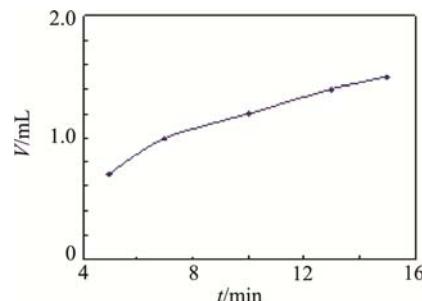


图1 超滤离心时间对样品滤液体积的影响

Fig. 1 Effect of centrifugation time to the volume

动相在漂移管内的汽化, 使基线噪声增大, 从而导致分析灵敏度的降低。综合考虑分离效果、分析时间等因素, 选择乙腈+水(75+25, *v*:*v*)的体系作为流动相。使用优化后的液相色谱条件分离3种低聚果糖的色谱图如图2所示, 7种糖分离度良好, 峰形对称。

3.2.2 色谱柱温度的优化

实验考察了色谱柱温度($20\text{~}50\text{ }^{\circ}\text{C}$)对样品中低聚果糖的检测的影响。如图3所示, 随着色谱柱温度的升高, 糖的色谱峰保留时间也提前, 分析时间缩短, 但是随着柱温的升高, 色谱峰的峰形出现不规则, 并且样品的目标色谱峰与杂质峰重叠。综合考虑分离度与分析时间, 实验选择色谱柱温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 以获得良好的分离度且目标分析物保留时间适宜。

3.3 方法学考察

3.3.1 标准曲线

参照2.3方法配制糖混合标准工作溶液。分别以各分析物的峰面积(*Y*)和对应的质量浓度(*X*, mg/mL)进行线性回归计算, 得到线性方程和相关系数(表1)。线性范围0.15~10.0 mg/mL之间。7种糖在各自线性范围内, 均有良好的线性关系(相关系数*R*大于0.999)。

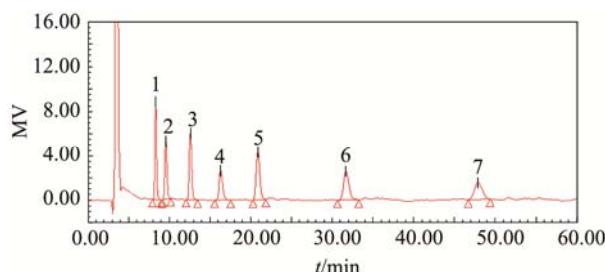


图2 7种目标化合物的混合标准溶液色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed standards of seven analytes (1. Fru, 2. Glu, 3. Suc, 4. Lac, 5. GF₂, 6. GF₃, 7. GF₄)

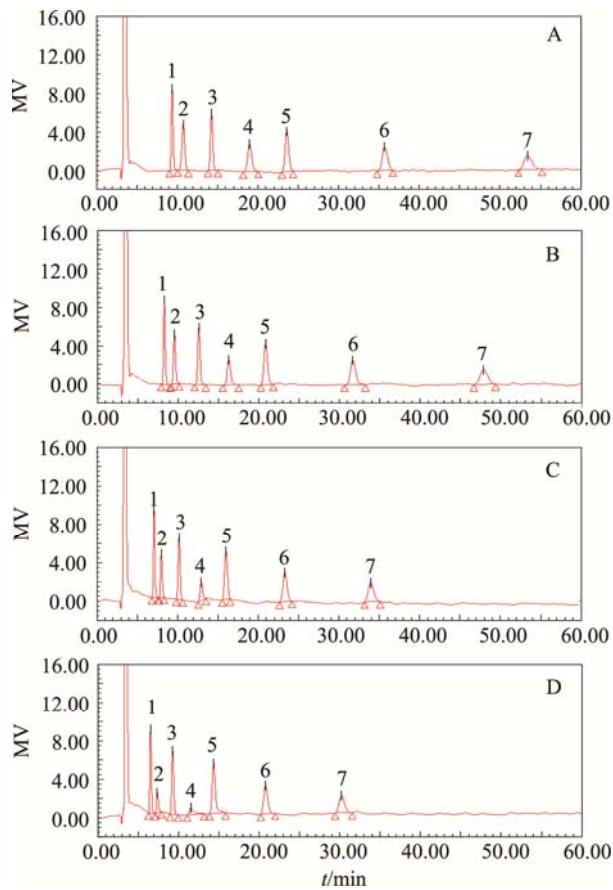


图3 不同色谱柱温度对7种糖的色谱峰影响

Fig. 3 Effect of column temperature on the chromatogram of analytes

(A. $T=20^{\circ}\text{C}$, B. $T=30^{\circ}\text{C}$, C. $T=40^{\circ}\text{C}$, D. $T=50^{\circ}\text{C}$)
(1. Fru, 2. Glu, 3. Suc, 4. Lac, 5. GF₂, 6. GF₃, 7. GF₄)

3.3.2 检出限与定量限

根据仪器的检出限(LOD, $S/N=3$)及定量限(LOQ, $S/N=10$), 结合样品的前处理过程, 计算得到 7

种糖的检出限在 0.039~0.087 g/100 g, 定量限为 0.13~0.29 g/100 g(见表 1), 表明该方法具有较高的灵敏度。

3.3.3 加标回收率和精密度

为验证方法的准确度, 按本实验方法对样品进行了 0.50 g/100 g、1.0 g/100 g 和 2.0 g/100 g 三个水平的加标回收实验($n=6$)。实验结果见表 2, 7 种糖的平均回收率为 81.2%~105%, 相对标准偏差(RSD, $n=6$)在 1.1%~6.2% 之间, 该方法显示了良好的准确性和重现性。

3.4 实际样品分析

采用本方法检测 15 个乳粉样品中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖的含量, 幼儿配方乳粉样品 1 色谱图见图 4。通过测定样品中蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖 3 种低聚果糖的总量, 将本方法与现行的国家标准方法进行比较。结果如表 3 所示, 由于受实验样本的均匀性、仪器波动、人员操作可能存在的随机误差的影响, 两种方法所得的结果间存在一定的的偏差, 但均小于 10%, 表明两种方法的测定结果较一致。本方法采用超滤离心法去除蛋白质等大分子干扰物, 操作简单, 可用于配方乳粉中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖 7 种糖含量的测定。

4 结论

本研究通过优化超滤离心净化和液相色谱分离的条件, 建立超滤离心净化-高效液相色谱测定配方乳粉中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、蔗果三糖、蔗果

表 1 7 种糖的线性方程、相关系数、方法检出限和方法定量限
Table 1 Linear regression equations, linear ranges, LOD and LOQ of seven analytes

分析物	线性范围 (mg/mL)	回归方程	回归系数 (R)	检出限 LOD (g/100 g)	定量限 LOQ (g/100 g)
Fru	0.50~10.0	$Y=124148X + 1674$	0.9999	0.039	0.13
Glu	0.50~10.0	$Y=101230X - 5585$	0.9999	0.078	0.24
Suc	0.50~10.0	$Y=69009X - 11576$	0.9997	0.061	0.19
Lac	0.50~10.0	$Y=53019X - 2178$	0.9998	0.082	0.25
GF ₂	0.25~10.0	$Y=131467X + 3209$	0.9999	0.040	0.13
GF ₃	0.25~10.0	$Y=133673X - 2737$	0.9993	0.063	0.22
GF ₄	0.15~7.50	$Y=126780X + 2144$	0.9998	0.087	0.29

表 2 配方乳粉中 7 种糖的加标回收率及精密度
Table 2 Recoveries and repeatability for seven analytes in formula powder

	0.50 g/100 g		1.0 g/100 g		2.0 g/100 g	
	Recovery R/%	RSD S _r /%	Recovery R/%	RSD S _r /%	Recovery R/%	RSD S _r /%
Fru	83.5	4.2	89.1	3.1	91.2	2.5
Glu	81.2	5.8	87.2	5.0	90.2	4.7
Suc	88.5	3.9	93.2	3.2	96.4	2.1
Lac	84.7	5.2	88.6	3.4	92.8	3.0
GF ₂	89.6	4.9	102	2.7	102	1.1
GF ₃	97.3	5.7	100	3.4	105	2.9
GF ₄	95.7	6.2	94.6	4.3	96.6	3.8

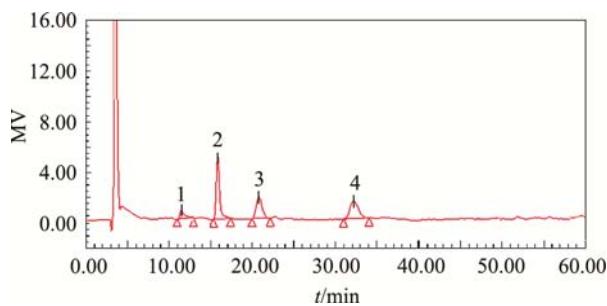


图 4 幼儿配方乳粉样品 1 的色谱图
Fig. 4 HPLC chromatogram of sample
(1. Suc, 2. Lac, 3. GF₂, 4. GF₃)

表 3 本法测定乳粉中 3 种低聚果糖含量与国家标准方法检测结果的比较(g/100 g)
Table 3 Comparison of FOS detection results in formula powder by this method and national standard method (g/100 g)

样品名称	FOS(超滤法)	FOS(沉淀法)	偏差(%)	标示值
婴儿配方乳粉 1	2.69	2.85	-5.8	3.00
婴儿配方乳粉 2	0.95	1.01	-6.1	0.98
婴儿配方乳粉 3	0.92	0.98	-6.3	1.02
较大婴儿配方乳粉 1	3.71	3.67	1.1	3.80
较大婴儿配方乳粉 2	0.85	0.89	-4.6	1.01
较大婴儿配方乳粉 3	0.92	1.00	-8.3	1.02
幼儿配方乳粉 1	3.60	3.45	4.3	3.70
幼儿配方乳粉 2	0.90	0.97	-7.5	0.98
幼儿配方乳粉 3	0.93	0.99	-6.2	1.02
儿童配方乳粉 1	3.22	3.17	1.6	3.30
儿童配方乳粉 2	3.25	3.30	-1.5	3.60
儿童配方乳粉 3	1.72	1.68	2.4	2.00
孕妇配方乳粉 1	3.35	3.55	-5.8	3.80
孕妇配方乳粉 2	2.89	2.78	3.9	3.00
孕妇配方乳粉 3	3.29	3.15	4.3	3.60

四糖和蔗果五糖 7 种糖的同时检测方法。样品经过水溶解后超滤离心去除蛋白质等大分子后经高效液相色谱分离, 示差检测器检测, 外标法定量。方法的净化效果好, 操作简单、快速, 定量结果与国标法较一致, 是一种测定配方乳粉中 7 种单糖、双糖和低聚果糖的有效方法。

参考文献

- [1] 杭峰, 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, 142(3): 108–111.
Hang F, Wu JF, Wang YY, et al. Study on the regulation effects of fOS on human intestinal flora [J]. J Dairy Sci Technol, 2010, 142(3): 108–111.
- [2] 薛山. 低聚果糖生物学功效及生产技术的研究新进展[J]. 食品工业, 2012, 33(4): 115–119.
Xue S. The new research progress of biological effects and production technology of fructo-oligosaccharide [J]. Food Ind, 2012, 33(4): 115–119.
- [3] GB/T 5009.7-2008 食品中还原糖的测定 [S].
GB/T 5009.7-2008 Determination of reducing sugar in foods [S].
- [4] GB/T 5009.8 -2008 食品中蔗糖的测定 [S].
GB/T 5009.8 -2008 Determination of saccharose in foods [S].
- [5] Downes K, Terry LA. A new acetonitrile-free mobile phase method for LC-ELSD quantification of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.) [J]. Talanta, 2010, 82(1): 118–124.
- [6] Benkeblia N. Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops [J]. J Chromatogr A, 2013, 1313: 54–61.
- [7] Monošík R, Magdolen P, Stredanský M, et al. Monitoring of monosaccharides, oligosaccharides, ethanol and glycerol during wort fermentation by biosensors, HPLC and spectrophotometry [J]. Food Chem, 2013, 138(1): 220–226.
- [8] 鲁玉侠. 高效液相色谱法检测橄榄果酒中的 Vc 和糖类物质[J]. 现代食品科技, 2011, 27(7): 861–863.

- Lu YX. Simultaneous determination of Vc and saccharides in olives wine by HPLC [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(7): 861–863.
- [9] 丁洪流, 李灿, 金萍, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定食品中的单糖、双糖、低聚果糖和糖醇[J]. 色谱, 2013, 31(8): 804–808.
- Ding HL, Li C, Jin P, et al. Simutaneous determination of monosaccharides, disaccharides, oligosaccharides and sugar alcohols in foods by high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection [J]. Chin J Chromatogr, 2013, 31(8): 804–808.
- [10] Oliver JD, Gaborieau, M, Hilder EF, et al. Simple and robust determination of monosaccharides in plant fibers in complex mixtures by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2013, 1291(24): 179–186.
- [11] Corradini C, Bianchi F, Matteuzzi D, et al. High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection and capillary zone electrophoresis with indirect ultra violet detection as powerful tools to evaluate prebiotic properties of fructooligosaccharides and inulin Original [J]. J Chromatogr A, 2004, 1054(1-2): 165–173.
- [12] Hogarth AJ, Hunter DE, Jacobs WA, et al. Ion chromatographic determination of three fructooligosaccharide oligomers in prepared and preserved foods [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(11): 5 326–5 330.
- [13] Kuhn RC, Filho FM. Separation of fructooligosaccharides using zeolite fixed bed columns [J]. J Chromatogr B, 2010, 878(22): 2023–2028.
- [14] Xi LL, Wang FL, Zhu ZY, et al. Ion-exchange chromatography combined with direct current amperometric detection at CuNPs/reduced graphene oxide-chitosan composite film modified electrode for determination of monosaccharide composition of polysaccharides from Phellinus igniariusOriginal [J]. Talanta, 2014, 119(15): 440–446.
- [15] Reiffová K, Nemcová R. Thin-layer chromatography analysis of fructooligosaccharides in biological samples [J]. J Chromatogr A, 2006, 1110(1-2): 214–221.
- [16] Hayashi S, Yoshiyama T, Fuji N, et al. Production of a novel syrup containing neofructooligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum* [J]. Biotechnol Lett, 2000, 22: 1465–1469.
- [17] Harrison SJ, Fraser K, Lane GA, et al. A reverse-phase liquid chromatography/mass spectrometry method for the analysis of high-molecular-weight fructooligosaccharides [J]. Anal Biochem, 2009, 395(1): 113–115.
- [18] 徐虹, 张海静, 宋焕禄. 高效液相色谱-质谱法同时测定食品中 5 种单、双糖的含量[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 234–238.
- Xu H, Zhang HJ, Song HL. Simultaneous determination of monosaccharide and disaccharide contents in foods by high performance liquidchromatography-mass spectrometry [J]. Food Sci, 2011, 32(12): 234–238.
- [19] Wang J, Sporns P, Low NH. Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: Quantification of fructooligosaccharides [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47 (4): 1 549–1 557.
- [20] 张婷婷, 曾明飞, 金燕, 等. 反相高效液相色谱-串联质谱法测定母乳及奶粉中核苷和核苷酸的含量[J]. 分析化学, 2014, 42(4): 585–591.
- Zhang TT, Zeng MF, Jin Y, et al. Determination of nucleosides and nucleotides in breast milk and infant formula by reversed phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2014, 42(4): 585–591.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



许丽珠, 工程师, 主要研究方向为食品安全与营养检测。

E-mail: 46161912@qq.com



郭新东, 教授, 主要研究方向为食品营养与安全检测技术。

E-mail: gdone@21cn.com