

超高效液相色谱法直接测定糖浆中 低聚半乳糖质量分布

杨新磊*, 陈波

(安捷伦科技中国有限公司, 上海 200080)

摘要: **目的** 建立一种超高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用测定糖浆中低聚半乳糖质量分布的方法。**方法** 采用 Agilent Poroshell 120 HILIC(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm)色谱柱分离, 以乙腈-水梯度洗脱。通过调节进入蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)的流动相流速以及组成来校正不同聚合度聚半乳糖的响应一致性。以葡萄糖、乳糖、麦芽三糖、麦芽四糖和麦芽五糖为校正溶液来建立校正方法, 校正后以乳糖标准曲线来定量其他低聚半乳糖, 最终完成了在没有低聚半乳糖标准品的情况下对低聚半乳糖糖浆质量分布的测定。**结果** 样品中的乳糖与其他半乳糖分离的同时不同聚合度的低聚半乳糖按聚合度增加分段出峰, 互不干扰。乳糖在 0.25~5 mg/mL 范围内线性良好, log(峰面积)-log(浓度)的线性拟合曲线, 相关系数 r^2 为 0.996。以麦芽四糖和麦芽五糖来验证方法准确性, 所得回收率分别为 107%和 110%。方法重现性良好, 以 2 mg/mL 乳糖为考察对象, 连续 6 针进样保留时间 RSD<0.05%, 峰面积 RSD<0.78%。**结论** 该方法可快速、准确用于低聚半乳糖糖浆中不同聚合度半乳糖的质量分布。

关键词: 低聚半乳糖; 质量分布; 蒸发光散射检测器; 超高效液相色谱法

Direct determination of the mass profiling of galactooligosaccharides in syrup by ultra high performance liquid phase chromatography

YANG Xin-Lei*, CHEN Bo

(Agilent Technologies China Co., Ltd., Shanghai 200080, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for mass profiling determination of galactooligosaccharides (GOS) in syrup by ultra high performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector (ELSD). **Methods** The sample was separated on the Agilent Poroshell 120 HILIC column (3.0 mm×100 mm, 2.7 μm) with ACN-water gradient elution. Reverse gradient and flow rate compensation were used to adjust the universal response of GOSs. The mixed solution of glucose, lactose, maltotriose, maltotetraose and maltopentaose was employed for calibration. Then the mass profiling determination of GOS was accomplished via the calibration curve of lactose without any GOS standards by the developed method. **Results** The lactose in syrup could be baseline-separated from other galactobiose, meanwhile, GOS with different DPs had no interference with each other. The linearity was good ($r^2=0.996$) for lactose with log(area)-log(conc.) fitting in the range of 0.25~5 mg/mL. The accuracy was proved satisfied by obtaining recoveries of 107% and 110% for maltotetraose and maltopentaose separately. It was also showed that the developed method had ex-

*通讯作者: 杨新磊, 应用工程师, 主要研究方向为液相色谱分离与应用。E-mail: xin-lei_yang@agilent.com

*Corresponding author: YANG Xin-Lei, Application Engineer, Agilent Technologies China Co., Ltd., Shanghai 200080, China. E-mail: xin-lei_yang@agilent.com

cellent precision with 0.05%RSD of retention time and 0.78%RSD of peak area for lactose with 6 consecutive injections at 2.0 mg/mL. **Conclusion** The proposed method is fast and accurate, which is suitable for mass profiling determination of GOS in syrup.

KEY WORDS: galactooligosaccharide; mass profiling; evaporative light scattering detector; ultra high performance liquid chromatography

1 引言

低聚半乳糖(galactooligosaccharide, GOS)是一种功能性低聚糖,已经被证明对人体有很大的益处^[1]。我国卫生部于2007年已经批准GOS为新的营养添加剂,允许添加在婴儿配方食品、较大婴儿和幼儿配方食品中^[2]。作为一种膳食纤维,GOS在很多动物乳汁中都存在,但作为添加剂,其来源都来自于工业生产,一般以乳糖为原料,经 β -半乳糖苷酶催化水解半乳糖苷键,将乳糖水解成为半乳糖和葡萄糖,同时通过转移半乳糖苷的作用,将水解下来的半乳糖苷转移到半乳糖或葡萄糖分子,生成GOS,即Gal-(Gal) n -Glc/Gal(n 为0~6)^[3]。因此,商品化GOS糖浆中除了不同聚合度的GOS外,还有葡萄糖、半乳糖和乳糖的存在。

由于商品化GOS标准品的缺乏以及结构的复杂性,GOS含量测定非常困难。AOAC 2001.02方法利用 β -半乳糖苷酶将乳糖和GOS水解成半乳糖,通过离子色谱方法测定样品水解前后半乳糖含量的差异,利用平均聚合度来推算GOS含量^[4]。该法目前被广泛用于GOS的测定,但前处理复杂,准确的平均聚合度获取也较困难^[5-7]。近年来,样品水解后采用液相色谱方法测定GOS含量的报道也日趋增加^[8-10]。水解方法破坏了GOS的组成,导致无法获知不同聚合度GOS的质量分布,进而影响GOS质量优劣的准确判断。Hernandez-Hernandez等^[11]采用液质联用方法对不同聚合度GOS的部分糖苷键进行了表征并比较了不同商品化GOS糖浆之间的差异,但并未进行含量测定。Sean等^[12]利用2-氨基苯甲酰胺(2-aminobenzamide, 2-AB)先将GOS标记,以亲水作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)机制进行分离,GOS被标记后按聚合度增加依次出峰进入荧光检测器测定,利用GOS标记上的荧光官能团进行定量,最终得到GOS含量及不同聚合度GOS质量分布。本文以HILIC分离未衍生的

GOS,利用流速补偿校正蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)响应,建立快速测定糖浆中GOS质量分布的超高效液相色谱(UHPLC)方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

安捷伦1290 Infinity II超高效液相色谱(美国安捷伦公司),包含高速泵(G7120A)、自动进样器(G7167B)、柱温箱(G7116B)、蒸发光散射检测器(G4260B)和OpenLAB CDS Chemstation软件C01.07。流速补偿采用另一1290高速泵(G7120A)。色谱柱为安捷伦Poroshell 120 HILIC(3.0 mm \times 100 mm, 2.7 μ m)。乙腈购自Merck公司(色谱级),水为MilliQ纯水机新制。葡萄糖、半乳糖、乳糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖以及GOS糖浆为江苏省食品药品监督检验研究院林慧博士友情提供。滤膜为安捷伦0.2 μ m再生纤维素滤膜,零死体积不锈钢三通来自安捷伦公司。

2.2 试验方法

UHPLC方法参数见表1。补偿泵通过三通接入色谱柱和ELSD之间的流路。

2.3 溶液配制

2.3.1 ELSD响应校正溶液配制

准确称取葡萄糖、乳糖、麦芽三糖、麦芽四糖和麦芽五糖各5.0 mg(精确至0.1 mg)于25 mL容量瓶中,加水/乙腈(50:50, $V:V$)定容,摇匀,即得0.2 mg/mL混标溶液,用于ELSD响应校正。该溶液置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存,使用前用0.2 μ m滤膜过滤。

2.3.2 乳糖标准溶液配制

取50.0 mg(精确至0.1 mg)乳糖于10 mL容量瓶中,加水/乙腈(50:50, $V:V$)定容,摇匀,即得5 mg/mL乳糖储备液,该溶液置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存,使用前用0.2 μ m滤膜过滤。将该储备液用水/乙腈(50:50, $V:V$)逐级稀释成2.5、2.0、1.5、1.0、0.5、0.25 mg/mL溶液,用于绘制校准曲线。

表 1 UHPLC 方法参数
Table 1 Parameters of UHPLC method

项目	参数			
色谱柱	Agilent Poroshell 120 HILIC (3.0×100 mm, 2.7 μm)			
柱温	40 °C			
流动相 A	水			
流动相 B	乙腈			
流速	0.6 mL/min			
进样量	1.5 μL			
ELSD	雾化温度: 70 °C, 蒸发温度: 70 °C, 气流量: 1.2 SLM, 采样频率: 80 Hz, 平滑: 10, 增益: 1			
梯度	时间(min)			B%
	0			90
	8			75
	8.5			90
	12			90
	0			90
补偿泵	时间(min)	H2O%	ACN%	流速(mL/min)
	0	25	75	1.5
	1.5	22.2	77.8	1.5
	2.5	20.3	79.7	1.2
	3.3	18.8	81.2	0.36
	4.4	16.8	83.2	0.12
	5.6	14.5	85.5	0
	8	10	90	0
	12	10	90	0

2.4 样品前处理

取糖浆样品 2000.0 mg(精确至 0.1 mg)于 100 mL 容量瓶, 加水/乙腈(50:50, *V:V*)定容, 摇匀, 即得 20 mg/mL 样品溶液。该溶液过 0.2 μm 滤膜后, 待测。

3 结果与分析

3.1 色谱柱和检测器的选择

单糖及寡糖分析的经典方法是采用氨基柱或配体离子交换色谱柱(如钙型离子交换柱、氢型离子交换柱等)分离, 以示差检测器检测, 但是对于低聚半乳糖的分析, 这 2 种方法都存在一定局限性。使用氨基柱时, 随着聚合度的增加, 低聚半乳糖越来越难以洗脱下来, 导致分析时间较长; 使用配体离子交换柱时, 五糖及以上低聚半乳糖分离较差且无法分离半乳二糖和乳糖, 很难实现不同聚合度 GOS 的质量分

布测定。HILIC 因其对极性化合物的有效保留, 在糖类化合物的分析中越来越受到关注^[13]。HILIC 方法选择空间大, 可以采用不同极性色谱柱(酰胺柱、二醇基柱、两性柱、氨基柱、硅胶柱等)完成对单糖或寡糖的分离。另一方面, ELSD 用于糖类的检测不仅灵敏度高于示差检测器, 而且可以运行梯度方法, 能大幅缩短低聚半乳糖的分析时间。因此本文方法选择 Agilent Poroshell 120 HILIC 为分离色谱柱, ELSD 为检测器, 糖浆样品分离色谱图如图 1 所示。随着 GOS 聚合度的增加, 羟基数目越来越多, 与 HILIC 柱表面形成的亲水层吸附力逐渐增强, 因此不同聚合度的 GOS 按聚合度分段出峰且互不干扰, 非常利于不同聚合度质量分布的测定。另一方面, 同样聚合度的 GOS, 由于其构型的差异也会导致其与 HILIC 柱亲水层作用的差异, 这种差异可以有效地分离乳糖与半乳二糖, 从而消除乳糖对 GOS 质量分布测定的影响。

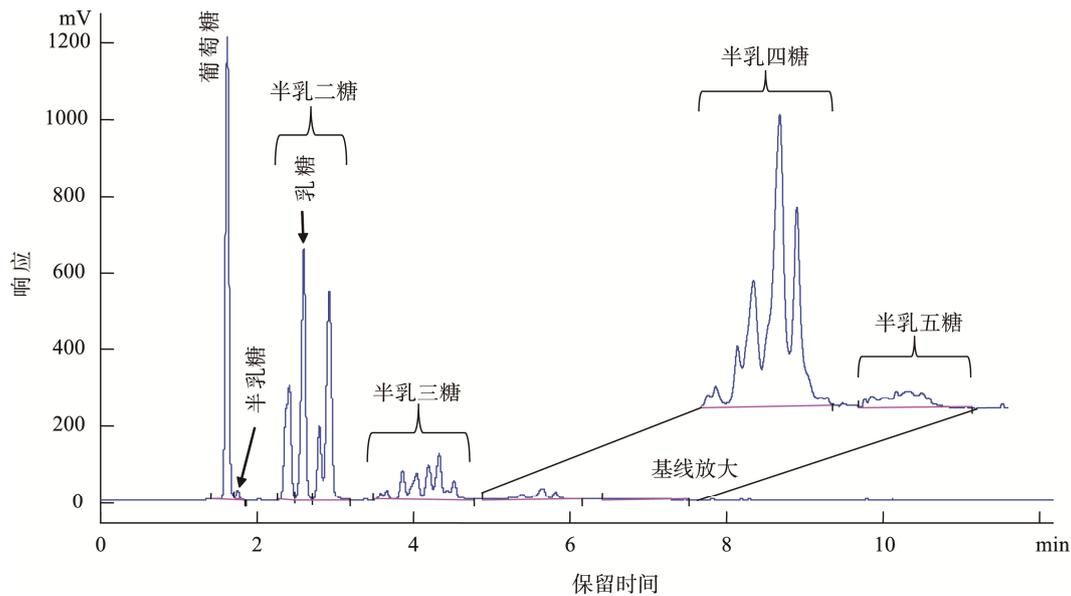


图 1 低聚半乳糖糖浆样品分离色谱图(ELSD 雾化温度: 70 °C, 蒸发温度: 70 °C, 气流量: 2.4 SLM, 采样频率: 80 Hz, 平滑: 10, 增益: 1; 其他条件参考表 1, 未启用流速补偿)

Fig. 1 The chromatogram of GOS syrup (ELSD nebulization Temp.: 70 °C, Evaporation Temp.: 70 °C, Gas: 2.4 SLM; Date rate: 80 Hz; Smooth: 10; Gain: 1; Other parameters refer table 1; no compensation of flow rate)

3.2 ELSD 响应一致性校正方式的选择

在没有待测物标准品的情况下进行定量, ELSD 是一个很好的选择, 其响应值在特定条件下与化合物结构无关。因此, 在测定不挥发或半挥发化合物时, 用已知化合物标定未知物含量的准确性要高于紫外检测器。然而, 由于 ELSD 的响应与待测物进入检测器时的流动相组成有很大关系, 因此在梯度方法中很难保证不同保留时间下化合物的响应一致性。André 等^[14]利用反梯度补偿方法克服了不同流动相组成下化合物响应的差异, 将目标物响应从最大 2 倍差异降低到了只相差 27%, 但该方法对校正 HILIC 模式下分离低聚糖时 ELSD 响应并无帮助。如图 2 所示, 在质量浓度相同情况下, 即使采用反梯度补偿, 葡萄糖的峰面积仍然是麦芽五糖峰面积的近 5 倍(内置表格中的数据均为连续 3 针进样的平均值)。其原因可能是: 1)HILIC 模式下, 虽然也是梯度洗脱, 但是流动相中有机相比例较高(>75%), 待测物的雾化效果在高有机相条件下差异较小, 因此反梯度补偿校正的效果不明显, 这也与文献[10]实验结果类似; 2) 如文献[10], 对于分子量差异不大的化合物(最大 310,

最小 214)反梯度补偿可有效的进行响应值校正, 但对于低聚糖而言, 从单糖到五糖, 分子量从 180 到 828, 即使在同样条件下雾化效果也会有差异, 这种差异是反梯度补偿无法校正的。

另一种校正 ELSD 响应的方法是通过调节雾化气流量来改变进入检测器颗粒数量, 从而实现响应一致性^[15]。该方法对低聚糖的响应校正效果较好, 但调节过程繁琐, 需要精细优化气流量, 对于方法的转移存在较大风险。ELSD 作为一种浓度型检测器, 在同样进样量下其响应和流速成反比, 因此可以通过调节流速来改变响应。如表 2 所示, 首先通过正常方式获得 0.2 mg/mL 各糖响应值, 计算得出在未校正时葡萄糖、乳糖、麦芽三糖和麦芽四糖相对于麦芽五糖的响应值倍数关系。再以麦芽五糖为基准, 按倍数关系计算出各糖相对于麦芽五糖的流速, 如乳糖按倍数校正流速为 $3.0 \times 0.6 \text{ mL/min} = 1.8 \text{ mL/min}$, 实际补偿流速为 $1.8 - 0.6 = 1.2 \text{ mL/min}$ 。以此类推, 得到流速补偿时间表。另一方面, 补偿时流动相组成仍然按照反梯度方法进行, 0 至 8 min 之间各时间节点流动相组成按 75%~90%乙腈组成线性推算, 如 4.4 min 乙腈组成为 $75\% + (15/8) \times 4.4 = 83.2\%$ 。按完整流速补偿方法

(表 1)重新进样糖混标溶液(0.2 mg/mL), 各糖响应值一致性大幅增加(如图 3 所示), 按归一化计算含量最小为 17.55%(葡萄糖), 含量最大为 21.94%(麦芽四糖),

相差不超过 5%, 图中表格数据均为连续 3 针进样的平均值。未补偿前同样浓度下, 葡萄糖峰面积为麦芽五糖的 3.5 倍。

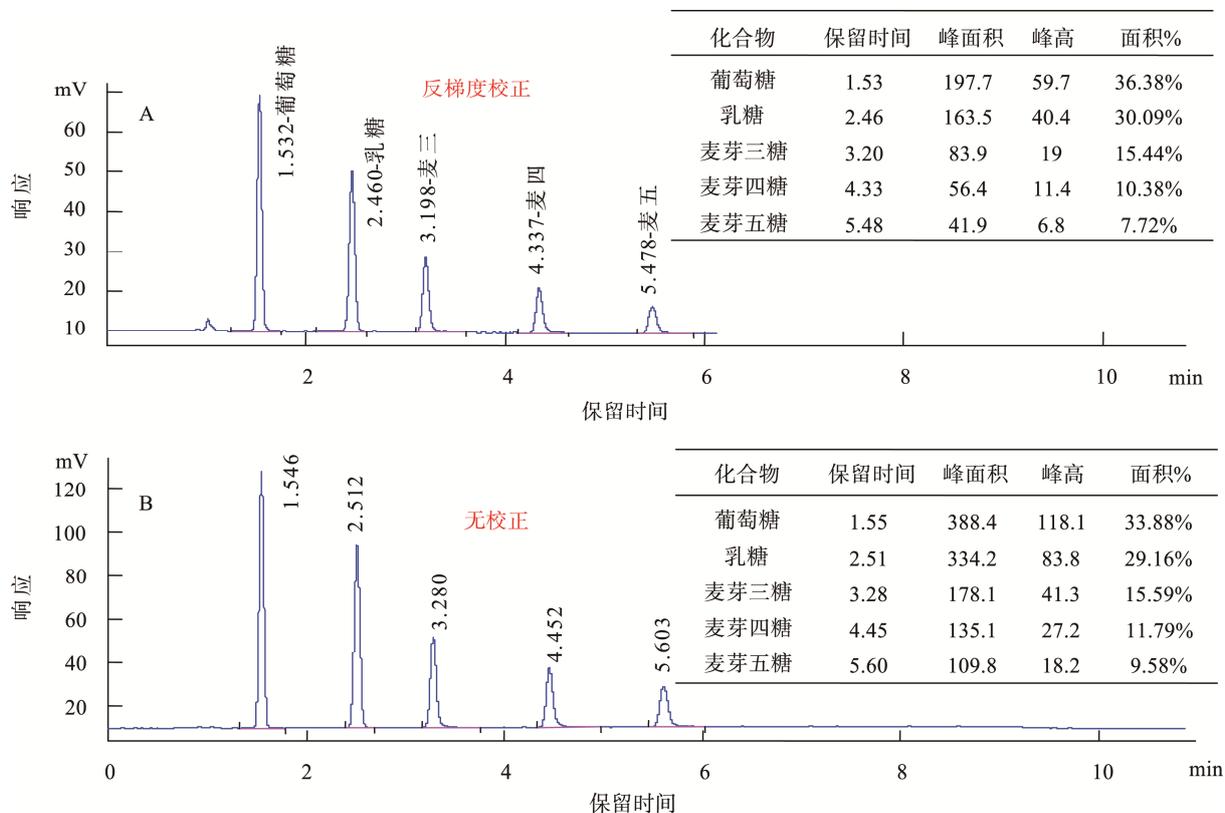


图 2 葡萄糖、乳糖、麦芽三糖、麦芽四糖和麦芽五糖在有无反梯度条件下的响应

Fig. 2 Responses of glucose, lactose, maltotriose, maltotetraose and maltopentaose with and without reverse gradient calibration (浓度 0.2 mg/mL; 补偿泵反梯度方法: 流速 0.6 mL/min, 0-8-8.5-12 min, 75-90-75-75%ACN; 其他方法细节参考表 1;

A-采用反梯度校正, B-无校正)

(0.2 mg/mL of each conc.; reverse gradient calibration of makeup pump: 0.6 mL/min of flow rate, 0-8-8.5-12 min, 75-90-75-75%ACN; other parameters refer table 1; A-with reverse gradient compensation, B- without compensation)

表 2 流速补偿表
Table 2 Flow rate compensation

化合物	保留时间 (min)	未补偿时		流速(mL/min)		
		峰面积	倍数关系	未补偿	按倍数需要	实际补偿
葡萄糖	1.5	388.4	3.5	0.6	2.1	1.5
乳糖	2.5	334.2	3.0	0.6	1.8	1.2
麦芽三糖	3.3	178.7	1.6	0.6	0.96	0.36
麦芽四糖	4.4	135.1	1.2	0.6	0.72	0.12
麦芽五糖	5.6	109.8	1	0.6	0.6	0

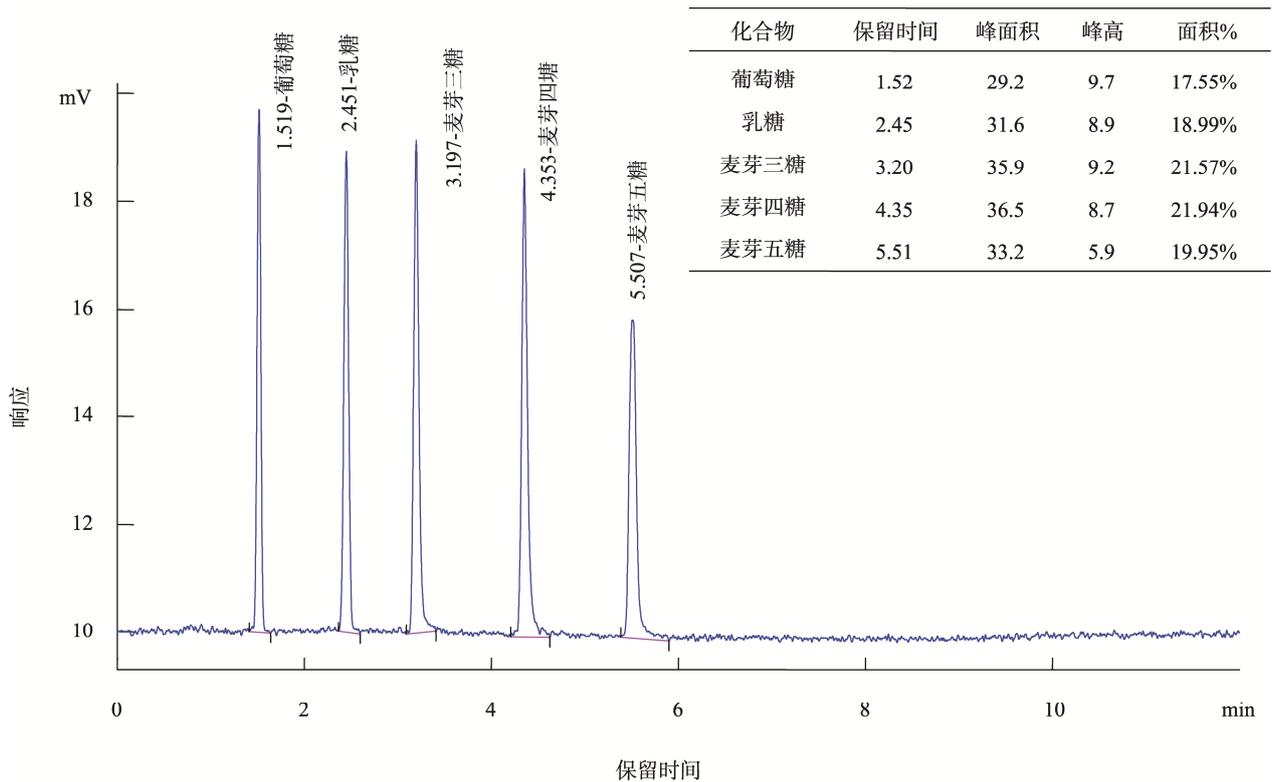
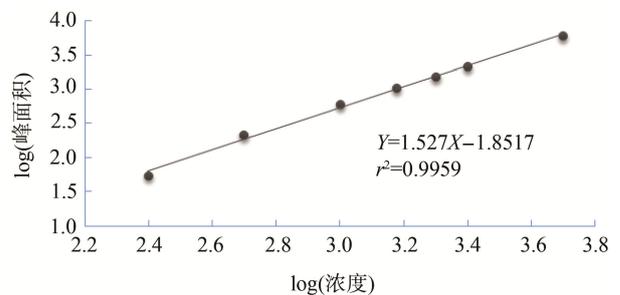


图3 流速补偿后糖混标色谱图

Fig. 3 The chromatogram of mixed standard after flow rate compensation

3.3 方法标准曲线、重复性和准确性

采用流速补偿后, 同样质量浓度下不同聚合度的寡糖响应比较接近, 因此可以选用乳糖标准曲线来定量其他低聚半乳糖。将 2.3.2 中乳糖的标准溶液按浓度由低到高进样, 每个浓度点平行进样两针, 每个浓度点峰面积平均后取 \log 对数与浓度取 \log 对数进行线性拟合, 拟合曲线见图 4, 在 250~5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 线性良好, $r^2=0.996$ 。以 2 mg/mL 乳糖溶液考察方法重复性, 连续 6 针进样, 乳糖保留时间 $\text{RSD}<0.05\%$, 峰面积 $\text{RSD}<0.78\%$ 。为验证方法准确性, 分别配制 1 mg/mL 麦芽四糖和 1 mg/mL 麦芽五糖按补偿后方法进样, 以乳糖标准曲线来计算麦芽四糖和麦芽五糖含量, 分别为 1.07 mg/mL(麦芽四糖)和 1.10 mg/mL(麦芽五糖), 表明方法有较高的准确性。由于无法获得低聚半乳糖标样, 所以无法按传统方法获得低聚半乳糖的定量限和检出限。本文测定样品为低聚半乳糖糖浆, 含量较高, 检出限只对半乳六糖含量有影响, 五糖以下影响甚微。

图4 $\log(\text{峰面积})-\log(\text{浓度})$ 线性拟合曲线Fig. 4 The linear fitting curve of $\log(\text{peak area})-\log(\text{conc.})$

3.4 样品测定

按 2.4 方法溶解样品, 配制 3 份平行样品, 每份样品进样 2 次, 典型色谱图如图 5 所示。将不同聚合度下的所有峰面积累积作为该聚合度聚半乳糖峰面积, 半乳二糖峰面积除去乳糖, 取 6 次数据平均值, 代入乳糖拟合方程, 计算得到不同聚合度聚半乳糖含量。其中, 如果有峰面积总和超出线性范围, 则分开计算。以半乳二糖为例, 乳糖前面出峰的半乳二糖作为一部分进行含量计算, 乳糖后面出峰的半乳二

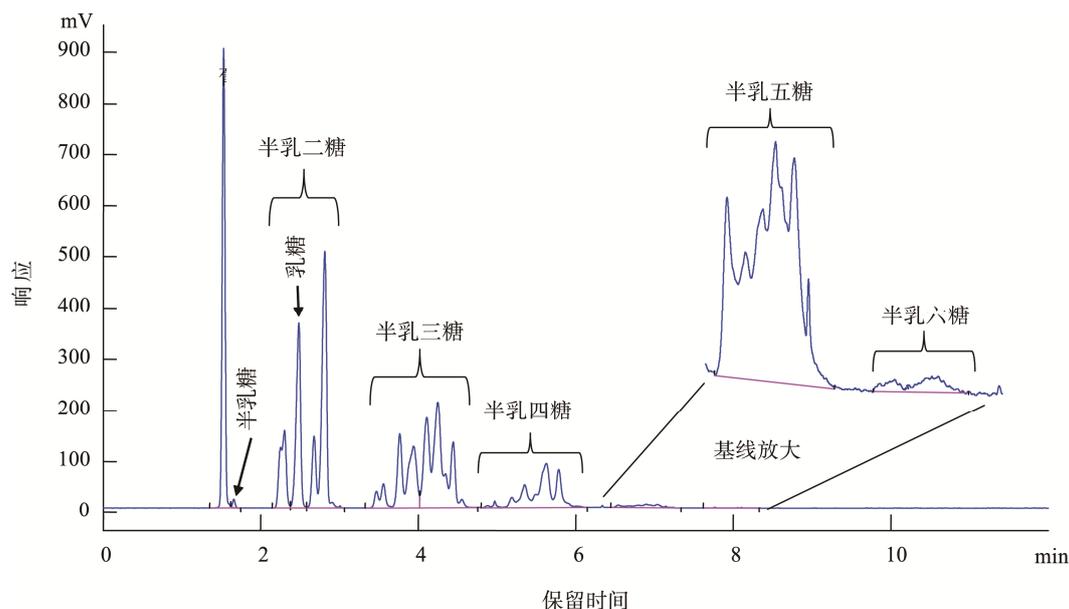


图 5 20 mg/mL 低聚半乳糖糖浆样品按流速补偿后方法进样所得色谱图

Fig. 5 The chromatogram of 20 mg/mL GOS syrup after flow rate compensation

表 3 GOS 糖浆中不同聚合度聚半乳糖质量分布

Table 3 The mass profiling of GOS with different DPs in syrup

	半乳糖二糖	半乳糖三糖	半乳糖四糖	半乳糖五糖	半乳糖六糖	总含量
含量	19.97%	25.49%	9.91%	2.40%	—	57.77%

注: “—”表示未检出

糖作为一部分进行含量计算, 再将这两部分含量之和作为总半乳糖二糖的含量。样品中半乳糖二糖至半乳糖五糖含量见表 3 所示, 半乳糖六糖含量较低, 低于线性范围, 所以未得到其含量。从样品色谱图上可以看出, 样品中的葡萄糖、半乳糖和乳糖也有很好的分离, 可以同时定量, 由于本文主要关注 GOS, 所以未考虑其他糖的含量测定。另外, 从保留时间看半乳糖六糖出峰时间在 7.5~8.5 min, 而校正溶液中麦芽五糖的出峰时间为 5.5 min, 小于半乳糖六糖出峰时间。按本文校正方法, 未对出峰时间大于 5.5 min 低聚糖进行校正, 对于聚合度大于 5 的 GOS 测定结果存在一定的不准确性。下一步实验计划添加商品化的聚合度更高的低聚糖来完善该方法。

4 结论

本文通过市售商品化低聚糖标准品对 ELSD 响应进行校正, 达到同样质量浓度下不同聚合度的低

聚糖响应值接近, 再将该方法用于 GOS 糖浆样品测定, 用乳糖标准曲线即可完成 GOS 质量分布测定。此外, 本文方法对样品中的葡萄糖、半乳糖和乳糖也有很好的分离效果, 可同时完成非 GOS 的糖含量测定, 有利于测定 GOS 糖浆的准确组成, 对于制定 GOS 的质量标准有很高的参考价值。

参考文献

- [1] Tomomatsu H. Health effects of oligosaccharides [J]. Food Technol, 1994, 48(10): 61-65.
- [2] 中华人民共和国卫生部公告, 2007 年第 12 号[EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/mohbgt/pw10709/200804/18986.shtml>. The 12th Announcement of National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, 2007 [EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/mohbgt/pw10709/200804/18986.shtml>.
- [3] Crittenden RG, Playne MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides [J]. Trends Food Sci Technol, 1996, 7(11): 353-361.

- [4] AOAC official method 2001. Determination of trans-galactooligosaccharides(TGOS) in selected food products [S].
- [5] 李建文, 王竹, 杨月欣. 高效离子色谱法测定糖浆中低聚半乳糖含量[J]. 卫生研究, 2006, 35(5): 584-586.
Li JW, Wang Z, Yang YX. Determination of galactooligosaccharide in syrups by highperformance ion exchange chromatography method [J]. J Hyg Res, 2006, 35(5): 584-586.
- [6] 徐莉, 潘丽, 禩开智. 低聚半乳糖含量的测定方法[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(2): 179-181.
Xu L, Pan L, Xuan KZ. Study on the determination of galactooligosaccharide [J]. Food Ferm Ind, 2011, 37(2): 179-181.
- [7] 林慧, 刘成志, 张志国, 等. 高效液相色谱双柱法测定低聚半乳糖原料聚合度[C]. 第六届华东地区色谱质谱学术报告会, 2014.
Lin H, Liu CZ, Zhang ZG, *et al.* Determination of the average degree of polymerization of GOS syrup by HPLC with two columns [C]. The Sixth Chromatography and Mass Spectrometry Symposium of East China, 2014.
- [8] 张志国, 王硕, 生庆海. HPLC-ELSD 法检测液态奶中的低聚半乳糖[J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 68-70.
Zhang ZG, Wang S, Sheng QH. Determination of galactooligosaccharides in liquid milk by HPLC-ELSD [J]. Food Mach, 2011, 27(3): 68-70
- [9] 李静芳, 彭美纯. 高效液相色谱法测定低聚半乳糖的含量[J]. 食品科技, 2012, 37(7): 279-282.
Li JF, Peng MC. Determination of galactooligosaccharide by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci Technol, 2012, 37(7): 279-282.
- [10] 张志国, 王彩霞, 史玉东, 等. 一种测定低聚半乳糖平均聚合度的方法[P]. 20131076139.7, 2013-05-14.
Zhang ZG, Wang CX, Shi YD, *et al.* A method to determination the average degree of polymerization of galactooligosaccharide [P]. 20131076139.7, 2013-05-14.
- [11] Hernandez-Hernandez O, Calvillo I, Lebron-Aguilar R, *et al.* Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the characterization of prebiotic galactooligosaccharides [J]. J Chromatogr A, 2012, 1220(1): 57-67
- [12] Sean A, Thierry B, Julien M, *et al.* Determination of β -galactooligosaccharides by liquid chromatography [J]. Int J Anal Chem, 2014 (2014), Article ID 768406.
- [13] 傅青, 王军, 梁图, 等. 糖类化合物亲水作用色谱保留行为评价[J]. 色谱, 2013, 31(11): 1051-1056.
Fu Q, Wang J, Liang T, *et al.* Systematic evaluation of retention behavior of carbohydrates in hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2013, 31(11): 1051-1056.
- [14] André V, Tadeusz G, Frédéric L, *et al.* Improving the universal response of evaporative light scattering detection by mobile phase compensation [J]. J Chromatogr A, 2007, 1161: 183-191.
- [15] Agilent AN5990-9159EN, Universal quantification using the Agilent 385-ELSD Evaporative Light Scattering Detector [Z].

(责任编辑: 金延秋)

作者简介

杨新磊, 应用工程师, 主要研究方向为液相色谱分离与应用。
E-mail: xin-lei_yang@agilent.com