

婴幼儿配方乳粉中低聚半乳糖含量检测方法的前处理优化

王巧云*, 夏璇, 张敏, 李光辉, 马镇

(淮南益益营养食品科技有限公司, 淮南 232000)

摘要: **目的** 优化国际通用的测定婴幼儿奶粉中 GOS 方法的前处理步骤, 提高检测结果的准确度。**方法** 针对前处理条件增加了超声 10 min 的操作步骤; 在样液沉降蛋白时, 进行离心, 确定了最佳的离心条件: 10000 r/min, 10 min。此外优化了梯度洗脱时淋洗液比例。经离子色谱检测, 外标法定量发现 GOS 有 5 个不同特征峰, 经验证确定以 GOS2 作为 GOS 定量峰, 计算 GOS 含量。**结果** GOS 质量浓度在 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内标准曲线的相关系数(r^2)均大于 0.995, 在质量分数为 0.6、1.2、2.0、3.0、4.0 g/kg 5 个加标水平下, 方法回收率为 100%~120%, 相对标准偏差为 0.22%~6.40% ($n=2$)。**结论** 该优化后的方法, 样品提取更加充分, 样品峰分离效果更好, 回收率与重复性良好, 结果准确性更高, 对准确检测婴幼儿配方乳粉中 GOS 的含量具有一定的意义。

关键词: 婴幼儿配方乳粉; 低聚半乳糖; 超声波; 离心; 离子色谱系统

Optimization of pretreatment for the determination method of galactose oligosaccharide in infant formula milk powder

WANG Qiao-Yun*, XIA Xuan, ZHANG Min, LI Guang-Hui, MA Zhen

(Huainan Yiyi Nutritional Food Technology Co., Ltd., Huainan 232000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the pretreatment conditions of the international method for the determination of GOS to improve the accuracy of detection results. **Methods** Ten min ultrasonic treatment was added to the current pretreatment method and centrifugation was carried out for sedimentation protein. The optimal centrifugation conditions were determined: 10000 r/min, 10 min. In addition, the eluent ratio of gradient elution was optimized. Five different characteristic peaks of GOS were found by ion chromatography detection and quantitative external standard method. GOS2 was verified as GOS quantitative peak to calculate GOS content. **Results** The correlation coefficient (r^2) of the standard curve was greater than 0.995 in the range of 5-100 $\mu\text{g/mL}$. The recovery rates were 100.0% to 120.0% and the relative standard deviations were 0.22% to 6.40% ($n=2$) at the standard levels of 0.6, 1.2, 2.0, 3.0 and 4.0 g/kg. **Conclusion** The optimized method is more effective in sample extraction, better in separation of sample peak and better in recovery and repeatability, and higher in accuracy, which can satisfy the requirement of determination of GOS in infant formula milk powder.

KEY WORDS: infant formula milk powder; galactose oligosaccharide; ultrasonic; centrifugation; ion chromatography system

*通讯作者: 王巧云, 主要研究方向为乳制品的研究与检测。E-mail: 2243655250@qq.com

*Corresponding author: WANG Qiao-Yun, Huainan Yiyi Nutritional Food Technology Co., Ltd., Huainan 232000, China. E-mail: 2243655250@qq.com

1 引言

低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)是一种具有天然属性的功能性低聚糖及分子结构^[1], 一般是在半乳糖或葡萄糖分子上连接 1~7 个半乳糖基, 即 Gal-(Gal)*n*-Glc/Gal(*n* 为 0~6), 平均聚合度大概为 3.2^[2,3]。在自然界中, 动物的乳汁中存在微量的 GOS, 而人母乳中 GOS 含量较多, 婴儿体内的双歧杆菌建立, 很大程度上依赖母乳中的 GOS 成分。由于新生儿胃肠功能不成熟, 无法迅速建立和维持有益菌群, 而 GOS 又是人体肠道中双歧杆菌、嗜酸乳酸杆菌等有益菌极好的营养源和有效的增殖因子, 可以改善人体肠道的消化吸收功能。所以很多婴幼儿奶粉中都添加了 GOS 的营养成分^[4]。

随着 GOS 在婴幼儿奶粉中的广泛应用, 其检测方法也有了长足的进步。国内外的检测方法主要有薄层色谱法^[5]、高效液相色谱法^[6]、离子色谱法^[7,8], 而高效液相色谱一示差检测法较为普遍使用但液相色谱柱的分离效果不够理想、示差检测器灵敏度较低^[9]。离子色谱作为液相色谱的一种, 由于其优异的分选能力及配有高灵敏度的脉冲安培检测器, 在糖的检测中得到越来越多的应用^[10,11]。AOAC(AOAC Official Method 2001.02)^[12]为国际通用的测定婴幼儿奶粉中 GOS 方法, 但其局限性在于不适用于检测乳糖与 GOS 比例大于 6 的婴幼儿配方奶粉, 测试结果存在较大误差^[4]。本研究参考了 Thermo fisher 离子色谱-脉冲安培检测前处理方法(AN_C_IC-080)^[7], 对该方法前处理步骤进行了改进。另外, 由于市面上购买的低聚半乳糖二糖、三糖、四糖标准品与添加原料中所使用的 GOS 结构相差较大, 导致无法使用^[13,14], 所以我们采用 GOS 原料作为标准品。但是 GOS 原料作为标准品无法得到准确含量, 因此我们在使用该批次 GOS 原料时参照中华人民共和国国家卫生和计划委员会 2016-06-30 2016 年第 8 号附件^[15]中的检测方法, 用离子色谱法测定原料中 GOS 含量, 再以此作为标准品, 从而既能测定该批次原料中 GOS 含量, 又可以准确检测婴幼儿配方奶粉中的 GOS, 对准确检测婴幼儿配方乳粉中 GOS 的含量具有一定的意义。

2 材料与方 法

2.1 主要仪器

ICS-5000⁺ 离子色谱仪: 配有脉冲安培检测器, Au 电极和 AgCl 电极(美国 Thermo Fisher 公司); FJY1502-UVF 基因研究型超纯水机(青岛富勒姆公司); KQ5200DV 数显超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);

WHY-2 水浴恒温振荡器(常州国宇仪器制造有限公司); H1850R 医用离心机(长沙湘仪科学仪器有限公司); ME204 万分之一电子天平(梅特勒·托利多公司)。

2.2 试剂与耗材

无水乙酸钠(优级纯, 美国 Fisher 公司); 甲醇、乙腈(色谱级, 美国天地公司); 50% 氢氧化钠(分析级, 美国 Merck 公司); Thermo Scientific OnGuard RP 柱(1 cc Cartridge, Thermo Scientific 公司); 水系滤头(0.22 μm, 上海安谱公司); 实验室用水为超纯水。

2.3 标准物质

标准物质: GOS 原料(纯度 61.4%, 量子高科(中国)生物股份有限公司);

标准储备液: 精密称取(含 GOS)0.1 mg GOS 原料于 50 mL 烧杯中, 使用 60 °C 热水溶解, 冷却后转移至 100 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至 100 mL, 配制成 1 mg/mL 的溶液作为标准储备液。

标准工作液: 分别移取 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、5.00 mL 标准储备液于 6 个 50 mL 容量瓶中, 使用超纯水定容至刻度线, 配制成 5、10、20、40、80、100 μg/mL 标准工作液。

2.4 样品处理与测定

准确称取奶粉样品(添加与低聚半乳糖原料相同厂家的婴幼儿配方奶粉)2.5 g, 置于 50 mL 容量瓶中, 加入 40~50 °C 的温水约 20 mL, 涡旋混合, 超声溶解 10 min 使样品溶解, 放入 60 °C 水浴锅中水浴 10 min。水浴结束后冷却至室温, 加乙腈至刻度, 摇匀。静置 10 min 使沉降(必要时延长沉降时间), 取上清液置于离心管中, 10000 r/min 离心 10 min。取上清液 1 mL, 加水稀释至 10 mL, 摇匀, 过 0.22 μm 水系滤膜及 1.0 cc OnGuard RP 柱, 上机进样检测。GOS 有 5 个不同特征峰, 不同特征峰之间的计算结果往往大于 10%, 经过多次加标验证, 表明 GOS2 的峰形最为稳定, 用 GOS2 加标计算出的结果与实际添加量最为符合^[11-13]。故选取 GOS2 作为定量峰, 计算样品中 GOS 含量。

2.5 离子色谱参考条件

2.5.1 色谱条件

(1) 色谱柱: CarbpacTM PA 20 3 mm×150 mm(带 CarbpacTMPA 20 3 mm×30 mm 保护柱)

(2) 检测器: 脉冲安培检测器, Au 工作电极, Ag/AgCl 参比电极, 检测池温度 30 °C

(3) 淋洗液:

A: 水;

B: 250 mmol/L NaOH;

C: 1.0 mol/L NaOAc&100 mmol/L NaOH;

D: 100 mmol/L NaOAc。

(4) 柱温: 30 °C

(5) 进样体积: 10 μL

梯度洗脱条件如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions

时间/ min	流速/ (mL/min)	A/ %	B/ %	C/ %	D/ %
0	0.45	55	40	0	5
10.0	0.45	55	40	0	5
40.0	0.45	15	40	0	45
45.0	0.45	15	40	0	45
45.1	0.40	0	0	100	0
55.0	0.40	0	0	100	0
55.1	0.40	20	80	0	0
60.0	0.40	20	80	0	0
60.1	0.45	55	40	0	5
65.0	0.45	55	40	0	5

3 结果与分析

3.1 前处理条件的优化

对比 Thermo fisher 离子色谱-脉冲安培检测方法 (AN_C_IC-080), 针对前处理条件增加了超声 10 min 的操作步骤, 使样品提取更加充分; 在样液沉降蛋白时, 进行离心, 确定了离心条件: 10000 r/min, 10 min, 使样液沉降效果更佳。此外优化了梯度洗脱时淋洗液比例(设定流动相在 0~20 min 洗脱比例为 A55%, B40%, D5%, 30~45 min 洗脱比例为 A15%, B40%, D45%, 45~55 min 比例为 C100%, 55.1~60 min 为 A20%, B80%, 60.1~65 min 恢复初始设定), 使样品峰分离效果更好, 受其余杂质峰干扰减少。

3.2 相关系数、线性方程

利用醋酸钠梯度可分离聚合度及结构不同的低聚糖, 可找到 5 组特征峰, 如图 1 所示

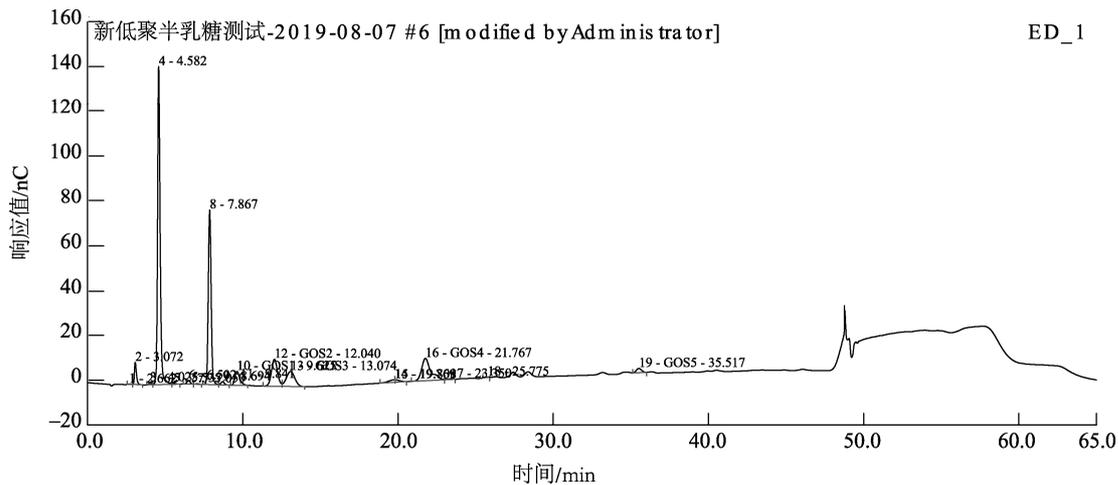


图 1 GOS 标准色谱图

Fig.1 Standard chromatogram of GOS

GOS 特征峰的相关系数与线性方程如表 2 所示。GOS 有 5 个不同特征峰, 经多次加标验证 GOS2 加标测定结果最稳定, 与实际添加值符合性最好, 故选取 GOS2 作为 GOS 定量峰, 计算 GOS 含量。

表 2 GOS 特征峰的相关系数和线性方程

Table 2 Linear equation and correlation coefficient of GOS

特征峰	线性范围/(mg/L)	相关系数 r^2	截距	斜率
G1	5~100	0.9999	0.0223	0.0042
G2	5~100	0.9995	0.0546	0.0273
G3	5~100	0.9998	0.0430	-0.0480
G4	5~100	0.9989	0.0673	0.0082
G5	5~100	0.9998	0.0073	0.0153

3.3 回收率验证

按照优化后的方法, 向称取好的样品中加入一定量的标准溶液, 进行样品前处理操作, 计算回收率。不同浓度的加标回收率如表 3 所示。由表 3 可得出, 采用本方法前处理条件进行检测, 回收率在 100%~120%之间, 相对标准偏差为 0.22%~6.40%, 准确度较高。为更直观地了解空白样品与加标样品之间谱图存在的差异性以及对比较况, 空白样品及加标样品谱图见图 2、图 3。

3.4 重复性验证

采用优化后的方法, 对同一空白样品采用相同加标浓度进行 10 组 20 次平行处理, 将处理好的样液各测定 1 次, 结果显示, 10 组 20 次平行检测结果的相对标准偏差为 5.8722776%, 重复性良好。

表 3 GOS 的加标回收率及精密度(n=2)
Table 3 Recovery rates and degree of precision of GOS (n=2)

样品名称	加标含量/(g/kg)	实际测得含量/(g/kg)	精密度/%	加标回收率/%
脱脂奶粉加标 1	0.597	0.626		104.8
	0.591	0.627	0.22	106.3
脱脂奶粉加标 2	1.188	1.214		102.2
	1.171	1.295	6.40	110.6
脱脂奶粉加标 3	1.952	2.164		110.8
	1.999	2.175	0.53	108..8
脱脂奶粉加标 4	3.095	3.498		113.0
	3.089	3.636	3.90	117.7
脱脂奶粉加标 5	3.989	4.249		106.5
	3.987	4.095	3.70	102.7

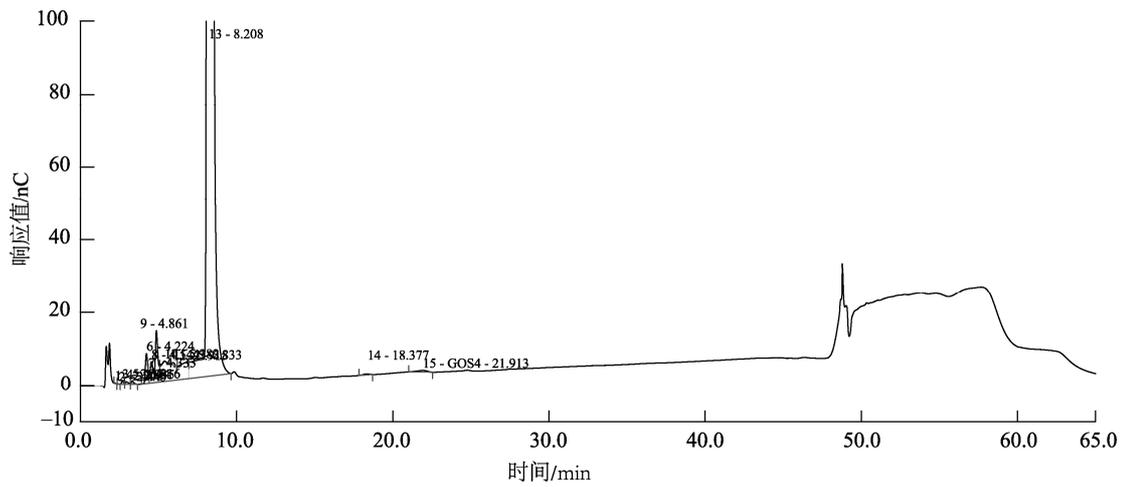


图 2 空白样品色谱图
Fig.2 Chromatogram of blank sample

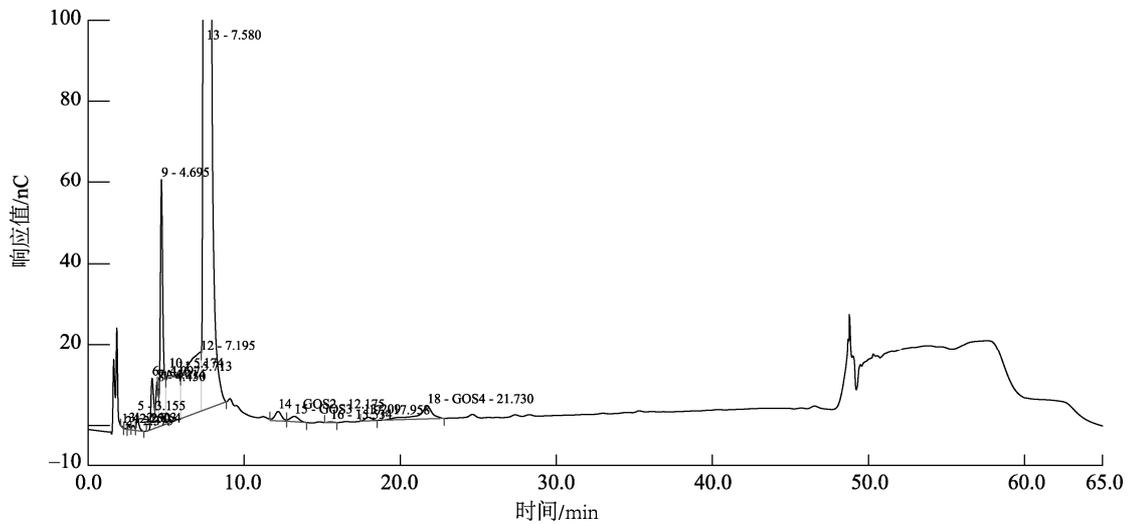


图 3 添加 4.0 g/kg GOS 色谱图
Fig.3 Chromatogram of sample with 4.0 g/kg GOS

4 结论与讨论

本研究参考 Thermo fisher 离子色谱-脉冲安培检测方法(AN_C_IC-080), 并优化了前处理条件, 采取超声处理与水浴加热, 使样品充分提取, 同时优化了洗脱时淋洗液比例, 以减少其余杂质峰的干扰, 使分离效果更好。采用 ICS-5000⁺离子色谱仪脉冲安培检测器, 应用糖四电位波形, CarbpacTM PA20, 3 mm×150 mm 分析柱, 对婴幼儿奶粉中 GOS 的含量进行定量分析, 同时考察了方法的精密度和准确度。结果表明对于婴幼儿配方乳粉这种基质复杂的样品, 更改前处理条件后, 检测峰型更好, 提取更充分, 重复测定相对标准偏差约为 5.87%, 回收率在 100%~120% 之间, 准确度较高, 且方法简便实用, 可以提高婴幼儿配方奶粉中 GOS 含量检测的效率与准确性, 为准确检测婴幼儿配方乳粉中 GOS 的含量提供了技术参考。

参考文献

- 毕云枫, 徐琳琳, 姜珊, 等. 低聚糖在功能性食品中的应用及研究进展[J]. 粮食与油脂, 2017, (1): 5-8.
Bi YF, Xu LL, Jiang S, *et al.* The application and research progress of oligosaccharides in functional food [J]. Food Oil, 2017, (1): 5-8.
- 孙常文, 周清涛, 王超, 等. 低聚半乳糖概述及其功能效果原理分析[J]. 食品安全导刊, 2015, (10): 55-58.
Sun CW, Zhou QT, Wang C, *et al.* Overview of galactooligosaccharide and analysis of its function and effect principle [J]. Chin Food Saf Magaz, 2015, (10): 55-58.
- 张志国, 生庆海, 王硕. HPLC 双柱法测定低聚半乳糖的平均聚合度[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 237-242.
Zhang ZG, Sheng QH, Wang S. Determination of average polymerization degree of galactooligosaccharides by HPLC double column method [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2013, 13(12): 237-242.
- 张志国. 低聚半乳糖检测方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, (8): 125-129.
Zhang ZG. Research progress on detection methods of galactooligosaccharides [J]. Food Res Dev, 2013, (8): 125-129.
- 吴昊, 丁鼎, 杨思行. 高效薄层色谱法分析低聚半乳糖及其共存物[J]. 中国乳品工业, 2001, 29(2): 25-28.
Wu H, Ding D, Yang SX. High performance thin layer chromatography analysis of galacto-oligosaccharide and other sugars in the syrup [J]. China Dairy Ind, 2001, 29(2): 25-28.
- 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.
- 韩春霞, 李仁勇. 离子色谱-脉冲安培检测法测定婴幼儿配方奶粉中的低聚半乳糖[C]. 第二十届全国色谱学术报告会及仪器展览会, 2015: 172.
Han CX, Li RY. Determination of trans galactooligosaccharide in infant formula milk powder by ion chromatography pulsed amperometric detection [C]. The 20th National chromatography Symposium and Instrument Exhibition, 2015: 172.
- 朱伟, 宁啸骏, 杜茹芸. 高效离子色谱法检测婴幼儿配方奶粉中的功能性低聚糖[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 230-234.
Zhu W, Ning XJ, Du RY. Detection of functional oligosaccharides in infant formula milk powder by high performance ion chromatography [J]. Food Sci, 2017, 38(24): 230-234.
- 郑惠玲, 邓宝浣, 肖桂秋, 等. 高效离子交换色谱法测定半乳糖、葡萄糖、乳糖及低聚半乳糖含量[J]. 食品科学, 2014, 35(6): 180-184.
Zheng HL, Deng BH, Xiao GQ, *et al.* Determination of galactose, glucose, lactose and galactooligosaccharide by high performance ion exchange chromatography [J]. Food Sci, 2014, 35(6): 180-184.
- 邵琪, 张丽茹, 王为, 等. 离子色谱法测定乳粉中低聚半乳糖含量[J]. 食品工业, 2017, 38(11): 309-312.
Shao Q, Zhang LR, Wang W, *et al.* Determination of galactooligosaccharides in milk powder by ion chromatography [J]. Food Ind, 2017, 38(11): 309-312.
- 柴银, 王虹, 刘雅萌, 等. 离子色谱测定多糖的单糖组成的方法学研究及其应用[J]. 药物生物技术, 2016, 23(4): 332-336.
Chai Y, Wang H, Liu YM, *et al.* Methodology study of monosaccharide composition by HPAEC-PAD and its application [J]. Chin J Pharm Biotec, 2016, 23(4): 332-336.
- AOAC 2001.02 离子色谱法测定食品中的低聚半乳糖[S].
AOAC 2001.02 Determination of galactooligosaccharide in food by ion chromatography [S].
- 张志国. 低聚半乳糖指纹图谱的构建[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(17): 162-168.
Zhang ZG. Construction of oligogalactose fingerprint [J]. Food Res Dev, 2017, 38(17): 162-168.
- 张志国, 孙亚范, 田玉新, 等. IC 指纹图谱测定婴幼儿配方奶粉中低聚半乳糖[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(12): 154-158.
Zhang ZG, Sun YF, Tian YX, *et al.* Determination of galactooligosaccharides in infant formula milk powder with IC fingerprint [J]. Food Res Dev, 2018, 39(12): 154-158.
- 国家卫生和计划生育委员会公告 2016 年 第 8 号[J]. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会公报, 2016, (6): 1-53.
National health and family planning commission announcement No.8, 2016 [J]. Gaz Natl Health Fam Plan Comm PRC, 2016, (6): 1-53.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



王巧云, 技术员, 主要研究方向为乳制品的研究与检测。

E-mail: 2243655250@qq.com