

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定无糖食品中寡糖

LCMSMS-062

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定无糖食品中寡糖的方法。本方法以水提取样品，使用 Inertsil HPLC Column NH2 柱 (2.1 I.D. × 150 mm L., 3 μm) 分离，电喷雾负离子 MRM 模式检测。使用 13C6- 葡萄糖作为内标绘制果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖的校准曲线，线性范围分别为果糖 0.1~40 mg/L，葡萄糖 0.25~100 mg/L，蔗糖 0.05~20 mg/L，乳糖和麦芽糖 0.25~25 mg/L，校准曲线的相关系数均在 0.999 以上。对 3 种不同混合标准溶液进行重复性实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06% ~ 0.42% 和 1.52% ~ 2.67% 之间，系统重复性良好。方法的加标回收率为 83.8%~106%。方法检出限为果糖 0.5 mg/kg，葡萄糖 1.5 mg/kg，蔗糖 0.3 mg/kg，乳糖 1.5 mg/kg，麦芽糖 1.3 mg/kg。

关键词： 超高效液相色谱串联三重四极杆质谱 无糖食品 寡糖 果糖 葡萄糖 蔗糖 乳糖 麦芽糖

寡糖(oligosaccharides)广泛存在于各种天然食品中，例如水果、牛奶、蜂蜜、蔬菜等。目前在食品中使用的寡糖品种有果糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖等。所制食品有饮料、饼干、布丁、发酵乳、巧克力等。目前，检测食品寡糖的方法有化学法、高效液相色谱法和质谱法。液相色谱法与现在使用的测定糖含量的菲林滴定法相比具有检测速度快、适用范围广的特点，但是也存在方法检出限高、排除干扰能力差等缺点。目前，欧盟检测寡糖的标准检测方法包括 NADPH 光谱法测定水果、蔬菜汁中果糖和葡萄糖含量 (BS-EN-1140:1995) 及高效液相色谱 - 示差折光法测定果汁和蔬菜汁中葡萄糖、果糖、山梨醇和蔗糖的含量 (BS-EN-12630:1996) ；国际分析化学协会 (AOAC) 涉及寡糖检测的方法主要以高效液相色谱 - 示差折光法分析牛奶巧克力、谷类食品中果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖及蔗糖 (AOAC

980.13, 982.14) ；我国检测食品寡糖的最新标准检测方法采用高效液相色谱 - 示差折光法测定食品中葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖 (GB/T2222.1-2008) 。高效液相色谱 - 示差折光法在分析寡糖中得到广泛的应用，对于葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖的检出限均为 4 g/kg，而且不能消除无糖食品中广泛添加的糖醇等甜味剂对寡糖测定时产生干扰。已有报道利用高效液相色谱串联质谱法检测寡糖，对于葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖的方法检出限均为 100 mg/kg。本方法利用 LCMS-8040 液相色谱串联质谱系统同时测定无糖食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖及麦芽糖，方法检出限为 0.5~1.5 mg/kg。本方法具有灵敏度高，选择性好，分析速度快等特点，适合测定无糖食品中寡糖的快速测定，为寡糖的日常监管工作提供技术支持，保障食品的食用安全。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD × 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Inertsil HPLC Column NH2 2.1 I.D. × 150 mm L., 3 μm
流动相：A 相 - 水溶液
B 相 - 乙腈

流速：0.8 mL/min

柱温：40°C

进样量：6 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 87%，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
6.00	Pumps	Pump B Conc.	87
6.01	Pumps	Pump B Conc.	83
8.00	Pumps	Pump B Conc.	83
8.01	Pumps	Pump B Conc.	87
12.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(-)
 离子喷雾电压: -4.5 kV
 雾化气: 氮气 3.0 L/min
 干燥气: 氮气 15 L/min
 碰撞气: 氩气
 DL 温度: 250°C
 加热模块温度: 400°C
 扫描模式: 多反应监测 (MRM)
 驻留时间: 60 ms
 延迟时间: 3 ms
 MRM 参数: 见表 2

1.3 标准品溶液的配制

标准物质: 共 6 种, 分别为果糖、葡萄糖、¹³C6-葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖。

标准工作溶液配制: 用水配制 1.0 mg/mL 的母液, 再用乙腈稀释成不同浓度的混合标准工作液, 浓度水平见表 3。

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	DL Bias (V)	Qarry Bias (V)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q1 Pre Bias (V)
果糖	179.10	89.10*	-30.0	-30.0	20.0	9.0	15.0
	179.10	59.15	-30.0	-30.0	20.0	18.0	22.0
葡萄糖	179.10	89.10*	-30.0	-30.0	20.0	9.0	15.0
	179.10	59.15	-30.0	-30.0	20.0	18.0	22.0
蔗糖	341.05	179.15*	-30.0	-30.0	24.0	13.0	10.0
	341.05	89.10	-30.0	-30.0	24.0	22.0	16.0
乳糖	341.10	161.10*	-30.0	-30.0	25.0	9.0	29.0
	341.10	101.15	-30.0	-30.0	25.0	17.0	19.0
麦芽糖	341.10	161.10*	-30.0	-30.0	24.0	8.0	30.0
	341.10	179.15	-30.0	-30.0	24.0	9.0	17.0
¹³ C6-葡萄糖 (内标)	185.15	92.15*	-30.0	-30.0	21.0	9.0	16.0

注: * 表示定量离子

表 3 混合标准工作液浓度(mg/L)

化合物名称	C6	C5	C4	C3	C2	C1
果糖	0.1	0.2	1.6	4.0	20	40
葡萄糖	0.25	0.5	4.0	10	50	100
蔗糖	0.05	0.1	0.8	2.0	10	20
乳糖	0.25	0.5	2.0	4.0	15	25
麦芽糖	0.25	0.5	2.0	4.0	15	25
¹³ C6-葡萄糖 (内标)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0

1.4 样品前处理方法

参照《食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定 高效液相色谱法》（GB/T 22221-2008）中的样品提取和净化方法。

饮料等液体样品，准确称取样品溶液 2.5 g 至 50 mL 容量瓶，用水定容，混合均匀。准确吸取此溶液 4.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，混合均匀后，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后至样品瓶中，待上机测试。

糕点等固态食品，称取 2.5 g 样品，置于 50 mL 容量瓶中，用水定容，混合均匀，超声提取 30 min，准确移取提取溶液 4.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，混合均匀后，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后至样品瓶中，待上机测试。

结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

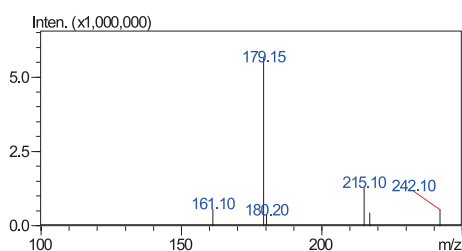


图 1 果糖的一级质谱图

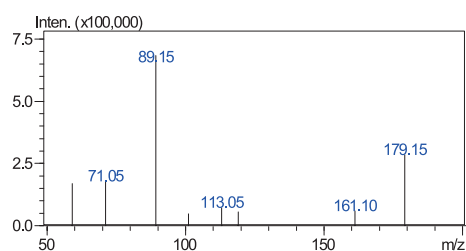


图 2 果糖的产物离子扫描图(CE值10V)

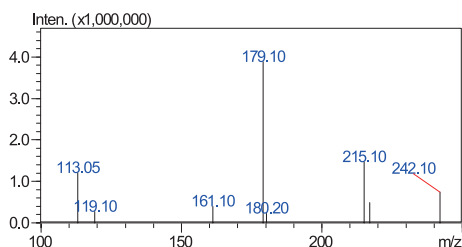


图 3 葡萄糖的一级质谱图

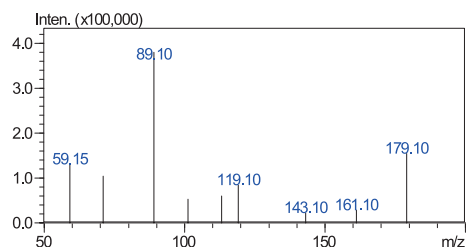


图 4 葡萄糖的产物离子扫描图(CE值10V)

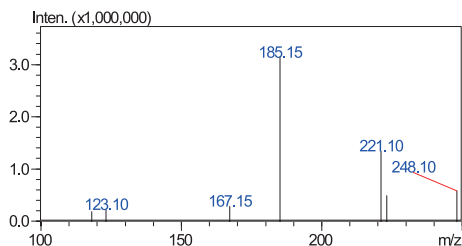


图5¹³C6-葡萄糖的一级质谱图

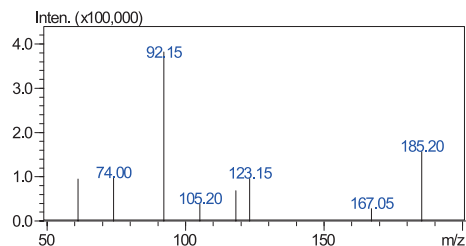


图6¹³C6-葡萄糖的产物离子扫描图(CE值10V)

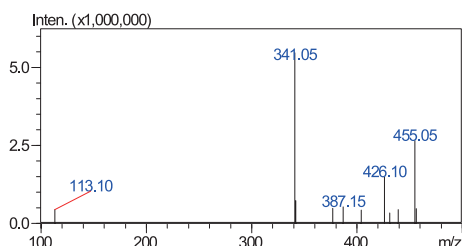


图 7 蔗糖的一级质谱图

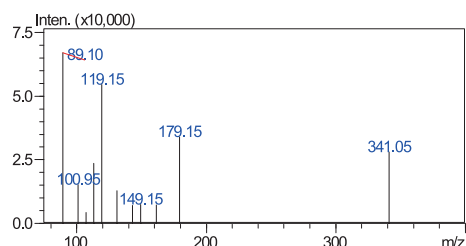


图 8 蔗糖的产物离子扫描图(CE值10V)

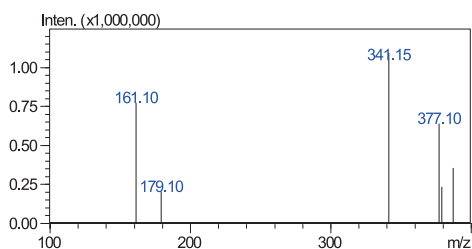


图9 乳糖的一级质谱图

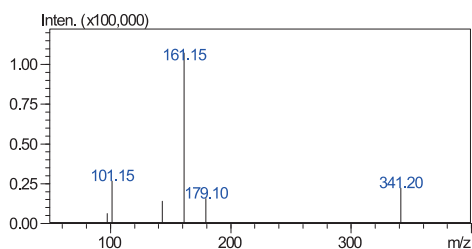


图10 乳糖的产物离子扫描图(CE值10V)

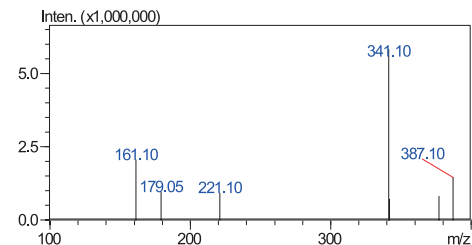


图11 麦芽糖的一级质谱图

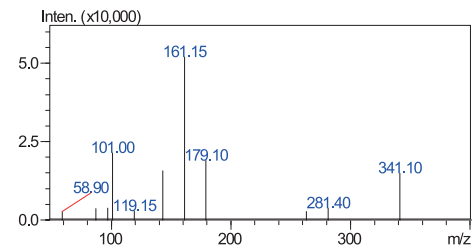


图12 麦芽糖的产物离子扫描图(CE值10V)

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

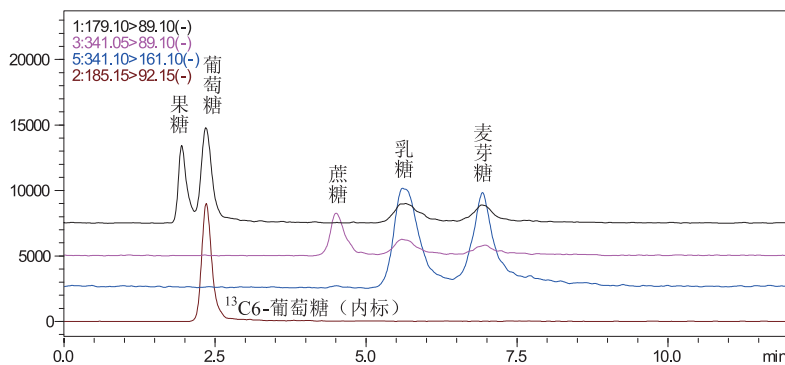


图13 标准样品的MRM色谱图(果糖 1.6mg/L, 葡萄糖 4.0 mg/L, 蔗糖 0.8 mg/L, 乳糖 4.0 mg/L, 麦芽糖 4.0 mg/L, ¹³C6-葡萄糖 5.0 mg/L)

2.3 线性范围

将表3中不同浓度的混合标准工作液按1.2中的分析条件进行测定, 内标法定量。以浓度比值为横坐标, 峰面积比值为纵坐标, 绘制校准曲线如图14~图18所示; 所得校准曲线线性关系良好, 线性方程及相关系数见表4。

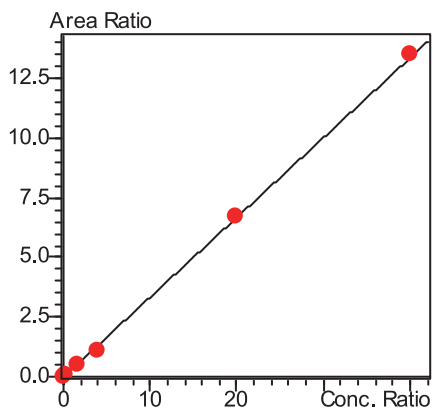


图14 果糖校准曲线

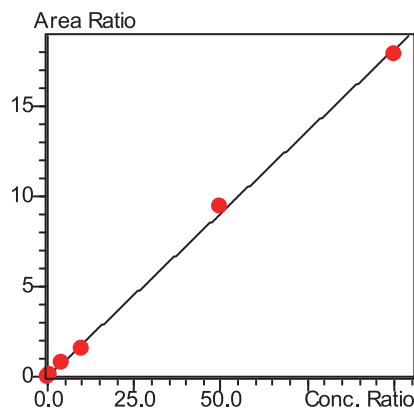


图15 葡萄糖校准曲线

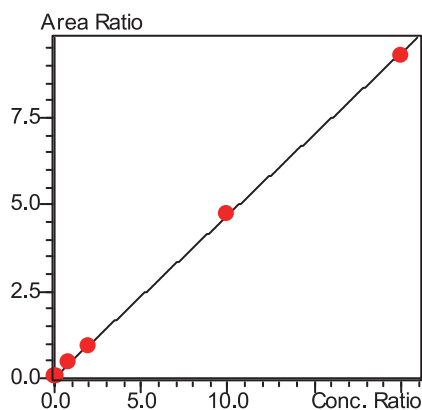


图 16 蔗糖校准曲线

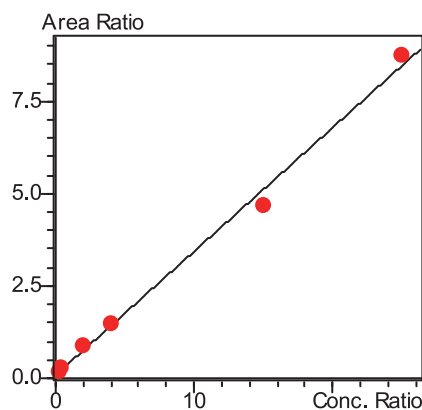


图 17 乳糖校准曲线

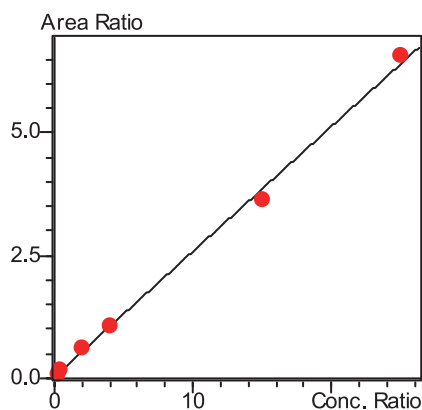


图 18 麦芽糖校准曲线

表 4 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (mg/L)	相关系数 r
1	果糖	$Y = (0.334312)X - (0.00945750)$	0.1~40	0.9990
2	葡萄糖	$Y = (0.181726)X + (0.00341908)$	0.25~100	0.9992
3	蔗糖	$Y = (0.466188)X + (0.0275324)$	0.05~20	0.9996
4	乳糖	$Y = (0.330991)X + (0.0917385)$	0.25~25	0.9990
5	麦芽糖	$Y = (0.249859)X + (0.0427362)$	0.25~25	0.9993

2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积比值的重复性结果如表 5 所示。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积比值的相对标准偏差分别在 0.06% ~ 0.42% 和 1.52% ~ 2.67% 之间，仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	R.T.	Area Ratio	R.T.	Area Ratio	R.T.	Area Ratio
果糖	RSD%	0.2mg/L	RSD%	1.6mg/L	RSD%	10mg/L
	0.420	1.84	0.173	2.00	0.196	1.83
葡萄糖	RSD%	0.5mg/L	RSD%	4.0mg/L	RSD%	25mg/L
	0.324	1.73	0.114	1.96	0.166	1.81

蔗糖	RSD% 0.1mg/L		RSD% 0.8mg/L		RSD% 5mg/L	
	0.289	1.66	0.060	1.74	0.173	1.86
乳糖	RSD% 0.5mg/L		RSD% 4.0mg/L		RSD% 15mg/L	
	0.408	1.64	0.206	1.67	0.161	1.52
麦芽糖	RSD% 0.5mg/L		RSD% 4.0mg/L		RSD% 15mg/L	
	0.134	2.67	0.085	2.32	0.144	1.65

2.5 灵敏度实验

为了考察仪器灵敏度，配制浓度为果糖 0.1 mg/L、葡萄糖 0.25 mg/L、蔗糖 0.05 mg/L、乳糖 0.25 mg/L、麦芽糖 0.25 mg/L 混标样品 7 份，平行进样 7 次分析结果，色谱图如图 19 所示。由 7 次进样测定面积比值的标准偏差 (S) 计算出检测限和最低定量浓度，此时检出限 MDL = 3.14 × S，定量下限 LOQ=4 × MDL。测定结果如表 6 所示。

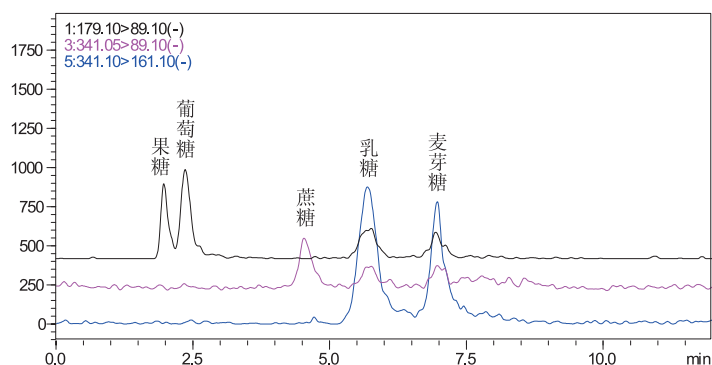


图 19 测试混合样品的 MRM 色谱图(果糖 0.1 mg/L、葡萄糖 0.25 mg/L、蔗糖 0.05 mg/L、乳糖 0.25 mg/L、麦芽糖 0.25 mg/L)

表 6 灵敏度实验结果

No.	名称	相对标准偏差 (RSD%)	检出限 (mg/L)	定量限 (mg/L)
1	果糖	3.36	0.0101	0.040
2	葡萄糖	3.94	0.0300	0.120
3	蔗糖	3.73	0.0056	0.022
4	乳糖	3.92	0.0294	0.118
5	麦芽糖	3.50	0.0263	0.105

2.6 回收率实验

以市售某无糖饮料为待测样品，检测果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖的含量。在所测无糖饮料中检出葡萄糖，色谱图如图 20，检测结果见表 6。以 2.5 g 无糖饮料为研究对象，加入果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖标准物质，加标浓度分别为果糖 50 mg/kg、葡萄糖 100 mg/kg、蔗糖 25 mg/L、乳糖 100 mg/kg、麦芽糖 100 mg/kg，色谱图如图 21 所示。无糖饮料中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖的加标回收率结果见表 7。

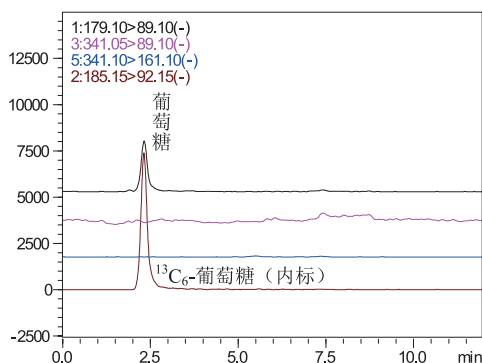


图 20 无糖饮料的 MRM 色谱图

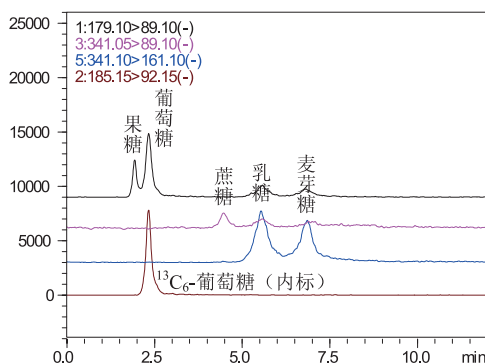


图 21 样品加标的 MRM 色谱图(果糖 50 mg/kg、葡萄糖 100 mg/kg、蔗糖 25 mg/L、乳糖 100 mg/kg、麦芽糖 100 mg/kg)

表 7 回收率实验结果

名称	基质浓度	加标浓度	实测浓度	回收率	加标浓度	实测浓度	回收率	加标浓度	实测浓度	回收率
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)
果糖	ND	10	8.65	86.5	50	42.9	85.7	200	177	88.6
葡萄糖	102	20	119	83.8	100	189	87.1	400	497	98.6
蔗糖	ND	5	4.38	87.5	25	22.4	89.6	100	91	90.6
乳糖	ND	20	19.3	96.5	100	106	106	400	378	94.4
麦芽糖	ND	20	18.1	90.6	100	102	102	400	382	95.4

2.7 实际样品检测结果

考察某种市售无糖饮料及无糖糕点中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖的含量，色谱图如图 22、23，检测结果如表 8 所示。

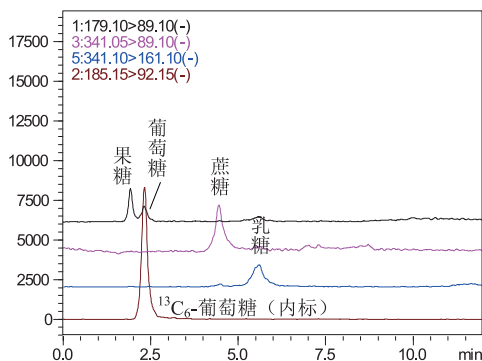


图 22 某市售无糖饮料的 MRM 色谱图

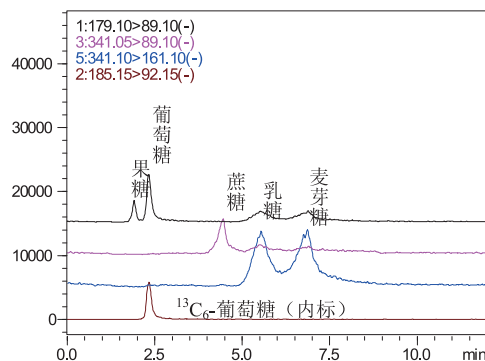


图 23 某市售无糖糕点的 MRM 色谱图

表 8 市售无糖食品的检测结果

名称	无糖饮料(mg/kg)	无糖糕点(mg/kg)
果糖	27.1	58.0
葡萄糖	23.7	337
蔗糖	52.1	163
乳糖	27.1	420
麦芽糖	ND	512

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定无糖食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖的方法。该方法在较短时间内完成 5 种糖类的分离分析，且线性范围宽，校准曲线的相关系数均在 0.9990 以上。对不同浓度的混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06% ~ 0.42% 和 1.52% ~ 2.67% 之间，系统精密度良好。方法的加标回收率为 83.8%~106%。方法检出限为果糖 0.5 mg/kg，葡萄糖 1.5 mg/kg，蔗糖 0.3 mg/kg，乳糖 1.5 mg/kg，麦芽糖 1.3 mg/kg。进一步利用本方法对市售的无糖饮料和糕点进行检测。实验表明，本方法具有灵敏度高，操作简单，适合快速测定无糖食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖。