

高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中低聚半乳糖的含量

LC-459

摘要： 本文使用岛津高效液相色谱仪建立了婴幼儿配方乳粉中低聚半乳糖的分析方法。本方法采用质谱进行定性，使用高效液相色谱仪外标法定量，其中，麦芽糖、乳糖以及麦芽三糖至麦芽七糖在 1.0 µg/mL-500 µg/mL 浓度范围内，线性相关系数大于 0.9999，仪器检出限均在 0.032 µg/mL~0.12 µg/mL 范围内，仪器定量限均在 0.11 µg/mL~0.40 µg/mL 范围内。使用 10 µg/mL 的标准溶液连续进样 6 针，保留时间的 RSD 在 0.019%~0.16% 之间，峰面积的 RSD 在 0.093%~0.65% 之间。婴幼儿配方乳粉中的低聚半乳糖加标回收率在 97.01%~98.97% 之间，该方法满足《GB 5009.289-2023 食品安全国家标准 食品中低聚半乳糖的测定》方法要求。

关键词： 高效液相色谱仪 三重四极杆质谱联用仪 低聚半乳糖

技术特点：

- ❖ 使用 ShimNex He Amide 超高效色谱柱，单针分析时间仅需 35 min，与国标参考色谱条件相比，单针可以节约 1/2 的时间，且从液相到质谱无需进行分流，操作更便捷。
- ❖ 使用 Labsolutions 软件中“时间校正”功能，可对质谱的保留时间一键进行自动校正，可使质谱的保留时间与液相的保留时间保持一致，操作便捷，使定性更加直观。

低聚半乳糖（GOS）是一种具有天然属性的功能性低聚糖，是由半乳糖或葡萄糖连接 1~7 个半乳糖基而成，在人母乳中含量较多，动物的乳汁中含量较少。

低聚半乳糖作为益生元能够维持肠道微生物平衡；研究发现，GOS 能够调节肠道上皮细胞的屏障功能，增强细胞对细菌或病毒的抵御能力。除此之外，GOS 还有抑制肿瘤细胞生成、改善人体矿物质吸收、改善心血管疾病等作用。由于新生儿消化系统尚处

于发育阶段，婴儿体内益生菌菌群的建立很大程度上取决于母乳中的 GOS 成分，因此婴幼儿配方乳粉营养成分中一般都添加了 GOS 来提升婴幼儿的消化能力和免疫水平。

本文参考《GB 5009.289-2023 食品安全国家标准 食品中低聚半乳糖的测定》，以更为常用的三重四极杆质谱替代高分辨质谱进行定性，采用岛津高效液相色谱建立了婴幼儿配方乳粉中低聚半乳糖的定量检测方法，可为相关从业人员提供参考。

实验部分

1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪，配置信息如下：

系统控制器：CBM-40

输液泵：LC-40B XR

自动进样器：CTO-40S

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.128

脱气机：DGU-405

柱温箱：SIL-40C XR

检测器：RF-20A XS 及 LCMS-8045

1.2 分析条件

液相色谱条件（定量）

色谱柱：ShimNex HE Amide (150 mm x 2.1 mm I.D., 3 µm)，
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N:380-01242-91

流 动 相 : A-50 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4) ; B- 乙腈
 进 样 体 积 : 5 μ L 柱 温 : 30 $^{\circ}$ C
 流 速 : 0.3 mL/min 洗 针 液 : 甲醇 / 水 =1/1 (v/v)
 检 测 器 : 激发波长为 355 nm, 发射波长 430 nm
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 98%, FCV 初始为 0, 时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
1.50	泵	B Conc	98
2.00	泵	B Conc	90
11.00	泵	B Conc	89
11.00	柱温箱	FCV	1
15.00	泵	B Conc	81
20.00	泵	B Conc	70
28.00	泵	B Conc	61
28.10	泵	B Conc	20
30.00	泵	B Conc	20
30.10	泵	B Conc	98
35.00	控制器	STOP	

其中: FCV 的 0 代表接入废液端; FCV 的 1 代表质谱端。

质谱条件 (定性)

离子化模式 : ESI (-) 雾化气流速 : 3.0 L/min
 接口电压 : -4 kV 干燥气流速 : 10.0 L/min
 接口温度 : 300 $^{\circ}$ C 加热气流速 : 10.0 L/min
 D L 温度 : 250 $^{\circ}$ C 碰撞气 : 氦气
 加热模块温度 : 400 $^{\circ}$ C 扫描模式 : 多反应监测 (MRM)
 MRM 参 数 : 见表 2

表 2 MRM 参数

聚合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
二糖	461.18	461.18	25.0	7.0	22.0
三糖	623.23	623.23	25.0	7.0	22.0
四糖	785.28	785.28	24.0	8.0	28.0
五糖	947.34	947.34	28.0	7.0	26.0
六糖	1109.39	1109.39	32.0	7.0	42.0
七糖	1271.44	1271.44	38.0	8.0	48.0

1.3 标准品溶液的配制

称取乳糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖标准品适量，用水溶解，分别配制成 10.0 mg/mL 的标准储备溶液。准确量取以上标准溶液适量，用水稀释成浓度为 1.0 mg/mL 混合标准溶液。取 1.0 mg/mL 混合标准溶液适量，用水配制成 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 、250.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准系列工作液。移取 20 μL 标准系列工作溶液于 2 mL 具旋盖离心管中，加入 200 μL 2-氨基苯甲酰胺衍生溶液，涡旋混合 30 s。再移取 0.50 mL 混合溶液于 2 mL 离心管中，加入 200 μL 乙酸铵溶液 (0.2 mol/L, pH 4.5 \pm 0.1)，再 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 30 min，取出放至室温，加入 0.70 mL 乙腈，混匀后 6000 r/min 离心 5min，上清液用 0.22 μm 有机微孔滤膜。待测定。

1.4 实验原理

试样中低聚半乳糖（聚合度为 2~7 的混合物）经水溶液提取、2-氨基苯甲酰胺衍生，用淀粉葡萄糖苷酶酶解去除麦芽糊精、淀粉干扰后，用高效液相色谱 - 荧光检测器检测，由于麦芽糖与低聚半乳糖的有相同的基团可以进行荧光标记，且不同聚合度的麦芽糖类聚糖的标准品容易获得，因此，采用相对应聚合度和相对分子质量的麦芽糖类聚糖标准物质外标法定量，扣除乳糖、麦芽糖含量后，得出低聚半乳糖含量。采集的色谱峰根据相同试样条件下，液相色谱串联质谱法确定的相同聚合度的低聚半乳糖的保留时间定性。

■ 样品前处理

样品前处理根据《GB 5009.289-2023 食品安全国家标准 食品中低聚半乳糖的测定》进行，具体前处理流程如下所示。

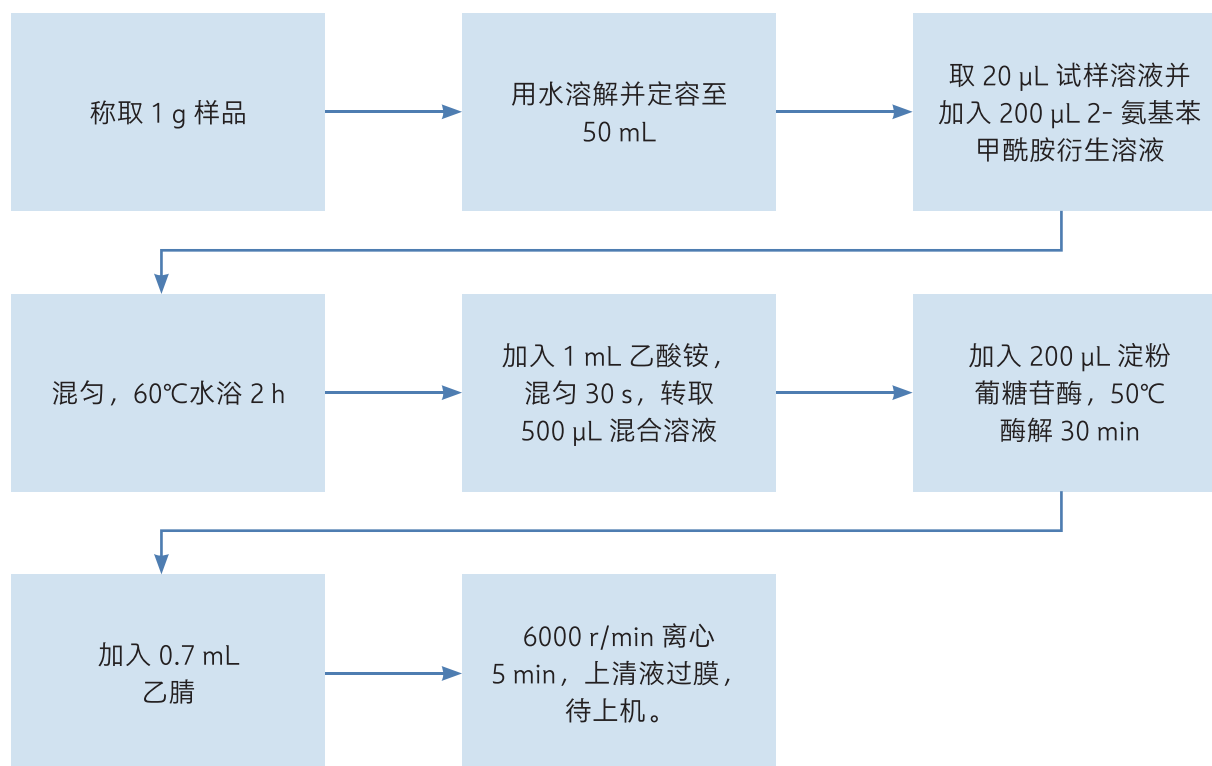


图 1 样品前处理流程图

■ 结果与讨论

3.1 不同聚合度麦芽糖标准溶液谱图

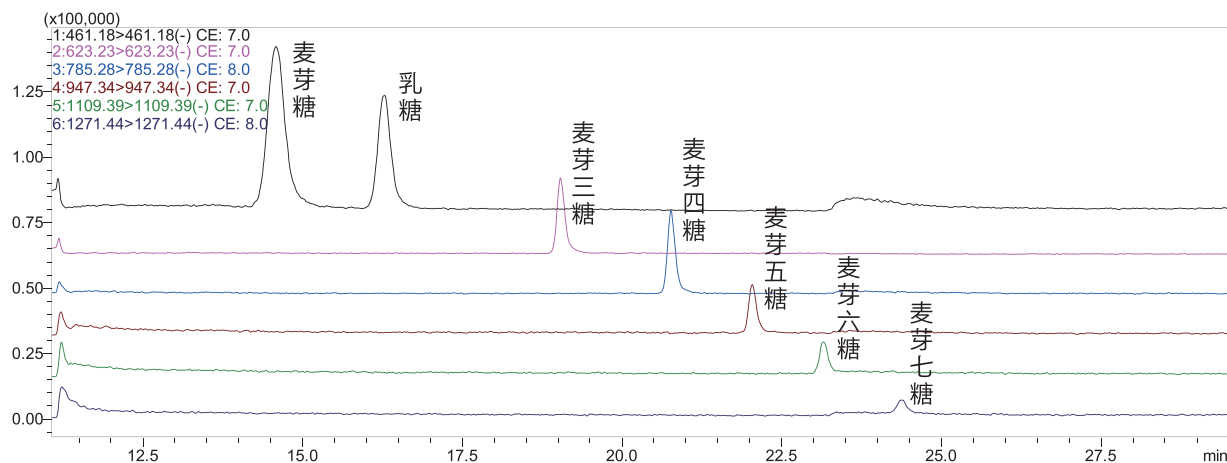


图2 不同聚合度麦芽糖标准品溶液 MRM 色谱图

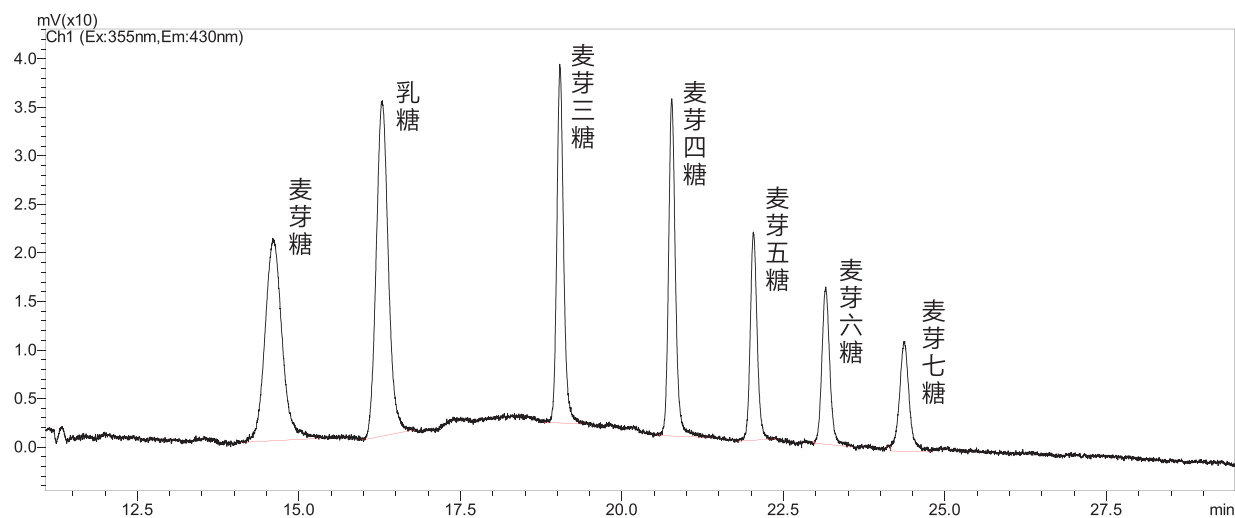


图3 不同聚合度麦芽糖标准溶液色谱图 (1.0 µg/mL)

为了避免样品中的其他杂质进入质谱，造成污染，通过二位六通阀，在 0 min~11 min 切入废液，在 11 min 后切回质谱，进行质谱监控。

由于从荧光检测器出口到质谱入口，存在系统体积，因此，荧光检测器的保留时间和质谱的保留时间存在时间差，可以通过 Labsolutions 软件中“时间校正”功能，对质谱的保留时间进行校正，可使质谱的保留时间与液相的保留时间一致，如图 2~3 所示，可简化后续样品的质谱定性保留时间校正的计算过程。

本方法使用的是 ShimNex HE Amide 的 UHPLC 的色谱柱，色谱条件的流速设置为 0.3 mL/min，在保证各个聚合度糖分离度的同时，缩短了单针分析时间，简化了从液相到质谱分流的过程，同时整个数据采集过程系统压力不超过 25 MPa，可以兼容常规液相系统。压力变化曲线如图 4 所示。

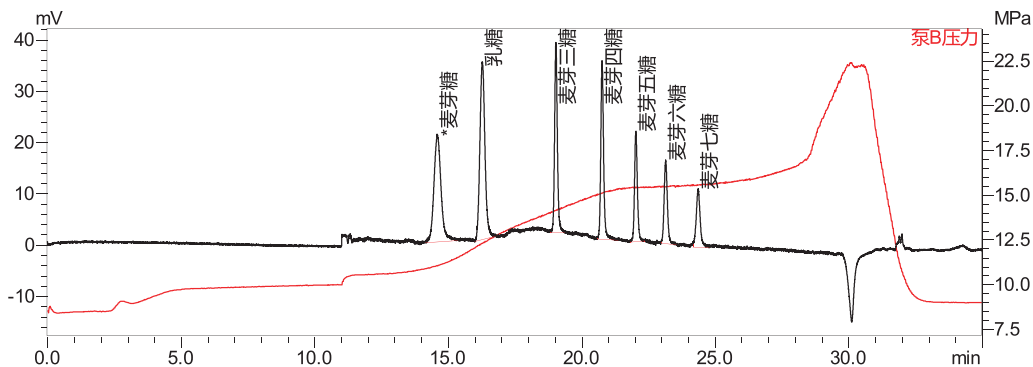


图 4 整个采集过程中压力变化曲线

3.2 校准曲线和检出限

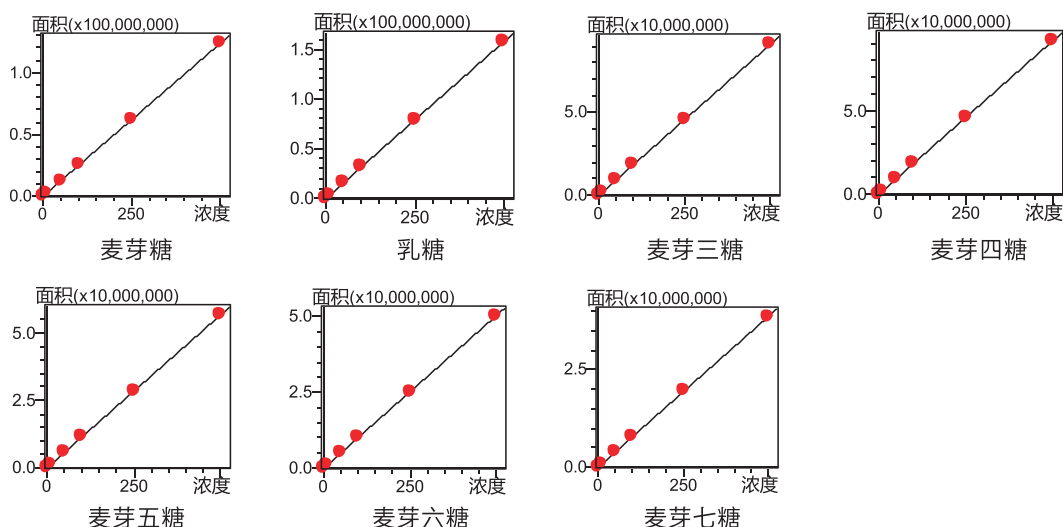


图 5 不同聚合度麦芽糖和乳糖标准曲线

分别衍生 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 、250.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 的不同聚合度麦芽糖和乳糖的混合标准溶液，取 5 μL 进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标做标准曲线，如图 5 所示。不同聚合度麦芽糖和乳糖在 1.0 $\mu\text{g/mL}$ -500.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好，相关系数 R 大于 0.9999，各校准点准确度在 98.0%-102.6% 之间。根据 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 标样数据，以 3 倍信噪比 (峰至峰) 计算方法检出限，各化合物检出限以及线性相关系数如表 3 所示。

表 3 各组分相关系数及检出限

ID	组分名称	相关系数 R	准确度	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
1	麦芽糖	0.9999	98.4%~100.7%	0.060	0.20
2	乳糖	0.9999	98.0%~102.5%	0.032	0.11
3	麦芽三糖	0.9999	98.3%~101.6%	0.033	0.11
4	麦芽四糖	0.9999	98.2%~101.9%	0.037	0.12
5	麦芽五糖	0.9999	98.6%~102.6%	0.061	0.20
6	麦芽六糖	0.9999	98.3%~100.8%	0.090	0.30
7	麦芽七糖	0.9999	98.8%~101.8%	0.12	0.40

3.3 精密度

取 10 µg/mL 混合标准品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，保留时间 RSD 在 0.019%~0.16% 范围内，峰面积 RSD% 在 0.093%~0.65% 范围内。

3.4 实际样品测定及回收率测定

按照以上建立的方法对市售的婴幼儿配方乳粉进行测定，根据下述公式计算的样品中低聚半乳糖的总含量。

$$X = \frac{(\sum \rho_{Dpi} - \rho_0) \times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000}$$

X ——试样中低聚半乳糖含量，单位为克每千克 (g/kg)；

ρ_{Dpi} ——样品中由标准曲线得到的不同聚合度糖衍生物（已去除了乳糖和麦芽糖）的浓度，单位为微克每毫升 (µg/mL) (i=2~7)；

ρ_0 ——空白试样溶液中衍生物的浓度，单位为微克每毫升 (µg/mL)；

V ——试样定容的体积，单位为毫升 (mL)；

1000 ——换算系数；

m ——试样的质量，单位为克 (g)；

表 4 样品及不同水平加标中不同聚合度低聚半乳糖的测定浓度 (µg/mL)

#	样品名称	二糖峰簇	三糖峰簇	四糖峰簇	五糖峰簇	六糖峰簇	七糖峰簇	低聚半乳糖总浓度
1	样品	186.366	339.379	107.061	36.416	15.403	N.D.	684.625
2	加标 1	340.806	601.693	199.533	77.148	20.944	9.789	340.806
3	加标 2	378.142	662.567	220.438	89.924	21.767	13.272	1386.109
4	加标 3	410.321	725.040	241.006	99.742	24.071	15.646	1515.827

注：“N.D.”表示未检出

空白试样溶液中未检出低聚半乳糖，样品中各聚合度低聚半乳糖液相色谱图及质谱图如图 6 所示，样品中各个聚合度低聚半乳糖 (n=2~7) 浓度如表 4 所示，经计算样品中低聚半乳糖的总含量为 33.6 g/kg。采用在乳粉中加入低聚半乳糖原料进行回收率试验。向乳粉中分别添加样品含量为 28.0 g/kg、35.0 g/kg、42.0 g/kg 的 3 个浓度水平的低聚半乳糖原料溶液，按照所建立的方法进行样品处理及测定，3 个加标浓度水平不同聚合度低聚半乳糖的测定浓度如表 4 所示，根据上述计算公式计算可得低聚半乳糖的加标含量。每个浓度水平重复 3 份平行样品，计算加标回收率和相对标准偏差 (RSD)。结果如表 5 所示。

表 5 各组分添加回收率结果 (n=3)

化合物	乳粉本底含量 (g/kg)	加标浓度水平 (g/kg)	加标结果 (g/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
低聚半乳糖	33.6	28.0	61.3	98.97	0.40
		35.0	67.9	98.25	0.23
		42.0	74.3	97.01	0.78

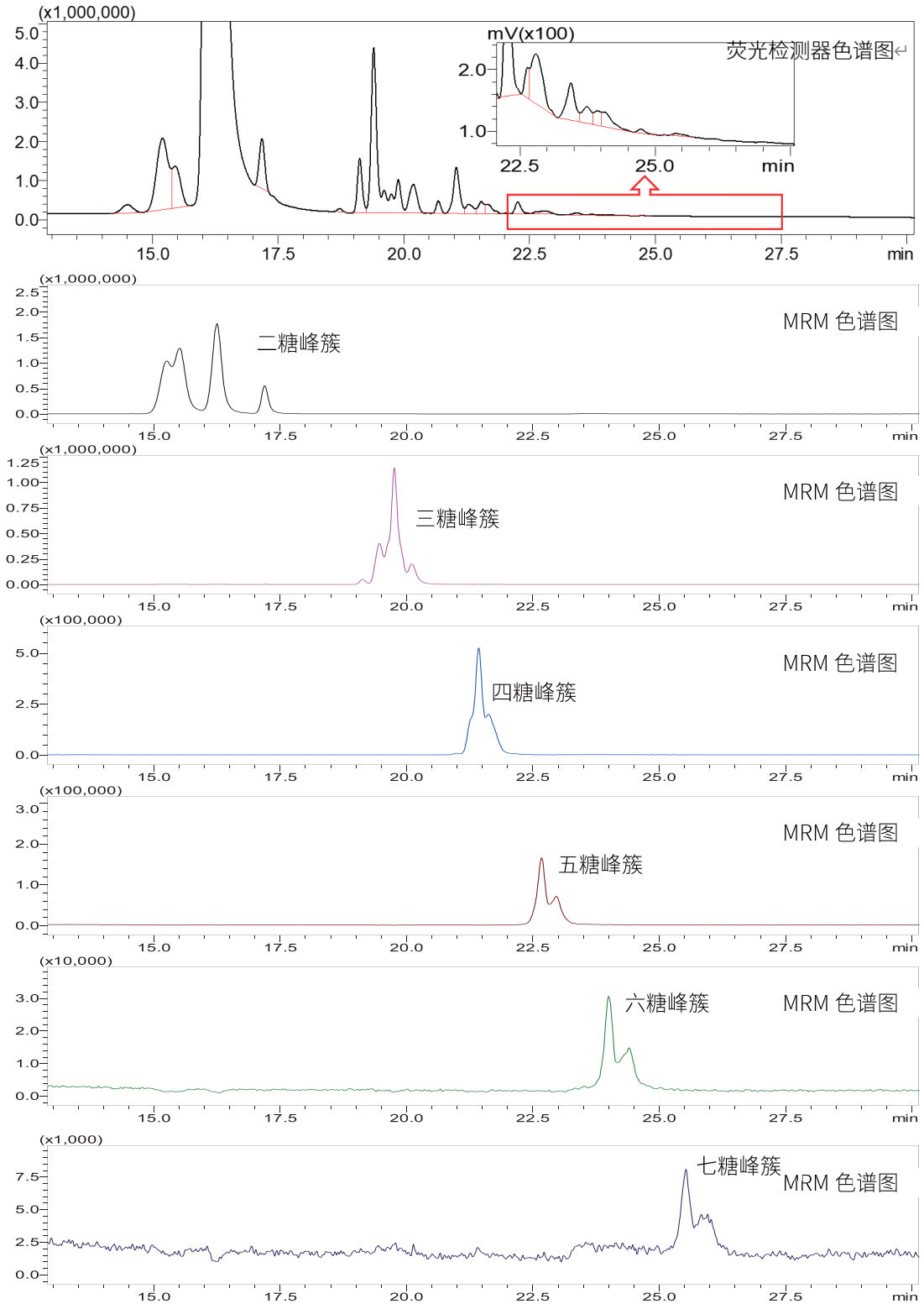


图 6 样品的液相色谱图及质谱 MRM 色谱图

■ 结论

本方法采用岛津高效液相色谱仪测定婴幼儿配方乳粉中低聚半乳糖含量进行测定，参考《GB 5009.289-2023 食品安全国家标准 食品中低聚半乳糖的测定》的附录 D 使用岛津三重四极杆液质联用仪对不同聚合度糖进行定性测定，进行了方法学考察，该方法分析效率高，专属性强，满足标准要求，可为相关从业人员提供参考。

岛津应用云

