Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

ACQUITY UPLC-ELSD测定奶粉和牛奶中八种糖的含量

赵淑军
沃特世科技有限公司

关键词： 超高效液相色谱 奶粉 牛奶 Fructose（果糖） Sorbose（山梨糖） Glucose（葡萄糖） Sucrose（蔗糖） Maltose（麦芽糖） Lactose（乳糖） Maltotriose（麦芽三糖） Maltotetraose（麦芽四糖）

实验方法

材料、试剂和仪器

乙腈为色谱纯，三乙胺为优级纯，实验用水为超纯水(18MΩ,TOC 3ppb)，ACQUITY UPLC®超高效液相色谱系统，Acquity ELSD检测器，（FILTER MIXER（425μl，P/N 205000403），可不用）

色谱条件

液相系统：	沃特世（Waters®） ACQUITY UPLC配ACQUITY ELSD蒸发光散射检测器
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH Amide 2.1mm × 100mm，1.7 μm，P/N:186004801
柱温：	35°C
分析时间：	18 min
进样量：	5μl（样品进样2ul）
流动相A：	水
流动相B：	0.2%TEA乙腈溶液；梯度洗脱
弱洗溶剂：	乙腈/水=90/10，800μl
强洗溶剂：	乙腈/水=10/90，500μl
进样方式：	不充满定量环（使用针溢出）

ELSD条件

增益：	500
数据率：	10pps
喷雾器模式：	冷却
漂移管温度：	55°C
气体压力：	30psi
实验室试验温度：	20°C
实验室试验湿度：	45%
工作电源：	220V稳定电源

梯度方法见下表：

表1 检测梯度表

时间/(min)	流量/(ml/min)	A%	B%	曲线
0	0.15	15	85	初始
2	0.15	22	78	6
11	0.15	50	50	4
18	0.15	15	85	1

数据处理系统

Empower 2

前处理方法

称取2.0 g奶粉样品或5ml液态奶样品，加入20mL（对于液态奶添加15ml）1/1的乙腈水溶液溶解，手摇震荡混匀，然后涡旋混匀2分钟，室温下8000r/min离心15分钟，取上清液过0.2um滤膜；对于某些样品由于糖含量很高，所以过滤后的样品可能需要用乙腈/水=70/30的溶液稀释一定倍数后，进样检测。

结果与讨论

标准配制

八种糖标准分别称取10mg，用1/1的乙腈水定容至1ml，然后用乙腈/水=70/30的溶液稀释配制各个浓度的标准品，进行实验。

八种糖UPLC分离检测色谱图及数据

图1是八种糖50ppm混合标准品用UPLC（ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱）分离，ELSD检测的色谱图，按照保留时间顺序分别是：Fructose（果糖）、Sorbose（山梨糖）、Glucose（葡萄糖）、Sucrose（蔗糖）、Maltose（麦芽糖）、Lactose（乳糖）、Maltotriose（麦芽三糖）、Maltotetraose（麦芽四糖）；包括5种单糖和3种多糖。有关数据见下表。

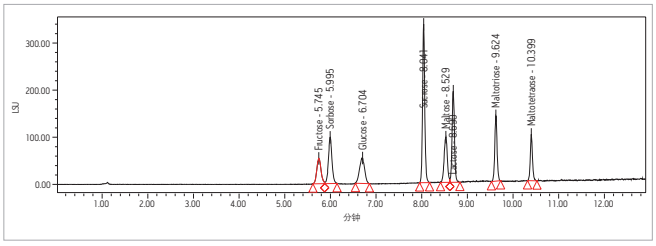


图1 八种糖UPLC分离检测色谱图

表2 八种糖标准品分离分析数据

名称	保留时间(分钟)	面积(微伏*秒)	% 面积	高度(微伏)	峰类型	USP分离度	s/n
Fructose	5.745	346696	7.83	53883	找到		58
Sorbose	5.995	529662	11.96	97981	找到	1.6	106
Glucose	6.704	418246	9.45	53922	找到	4.0	58
Sucrose	8.041	1117350	25.24	335744	找到	9.0	363
Mattose	8.529	476565	10.77	96141	找到	4.7	104
Lactose	8.690	716329	16.18	193308	找到	1.5	209
Mattotriose	9.624	492501	11.13	138706	找到	9.9	150
Mattotetraose	10.399	329529	7.44	98605	找到	8.5	107

其中较难分离的Fructose（果糖）和Sorbose（山梨糖）、Maltose（麦芽糖）和Lactose（乳糖）均分别达到1.6、1.5的分离度。

方法的检出限

如图2所示，为5ppm的混标色谱图，此浓度下按保留时间顺序八种糖的信噪比分别达到3、5、5、24、6、12、5和3，（进样量10μl）：

可见，八种糖中Fructose（果糖）、Sorbose（山梨糖）、Glucose（葡萄糖）、Maltose（麦芽糖）、Maltotriose（麦芽三糖）和Maltotetraose（麦芽四糖）的检测限为5ppm；此浓度下Lactose（乳糖）可达到定量限，而Sucrose（蔗糖）的定量限可以到达2ppm。

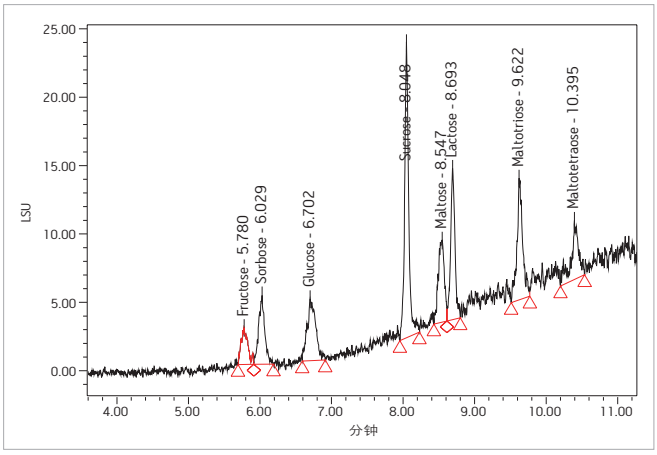
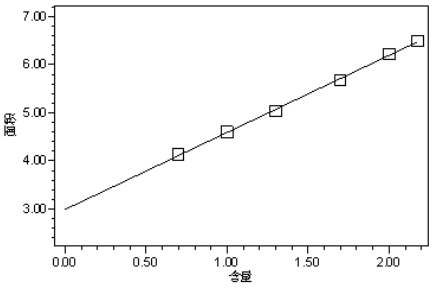
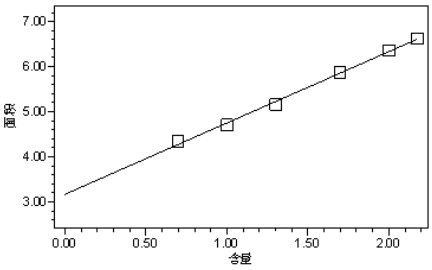


图2 5ppm的混标色谱图



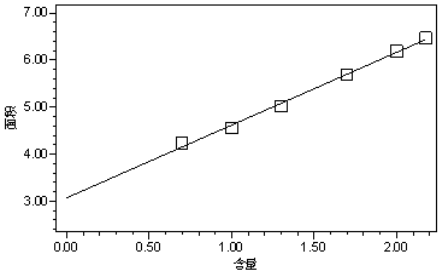
Peak Name: Maltose; Fit Type: Log-Log 线性; R^2: 0.999; Equation: Y = 1.60e+000 X + 2.99e+000

图3 Fructose工作曲线和方程



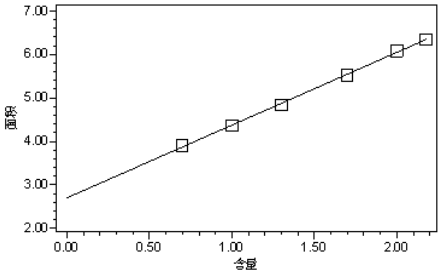
Peak Name: Lactose; Fit Type: Log-Log 线性; R^2: 0.997; Equation: Y = 1.58e+000 X + 3.17e+000

图4 Sorbose工作曲线和方程



Peak Name: Maltotriose; Fit Type: Log-Log 线性; R^2: 0.996; Equation: Y = 1.55e+000 X + 3.07e+000

图5 Glucose工作曲线和方程



Peak Name: Maltotetraose; Fit Type: Log-Log 线性; R^2: 0.999; Equation: Y = 1.67e+000 X + 2.70e+000

图6 Sucrose工作曲线和方程

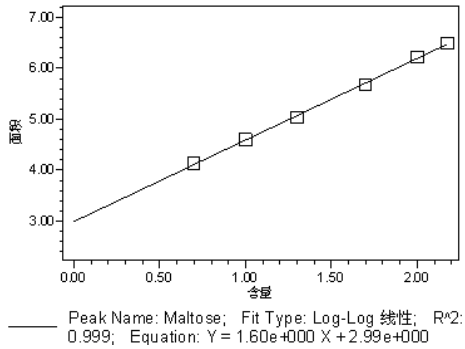


图7 Maltose工作曲线和方程

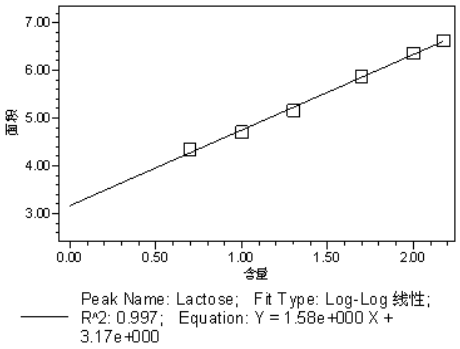


图8 Lactose工作曲线和方程

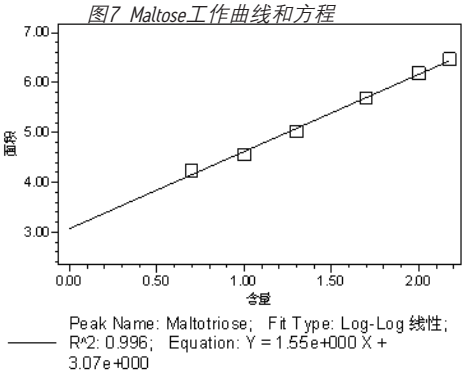


图9 Maltotriose工作曲线和方程

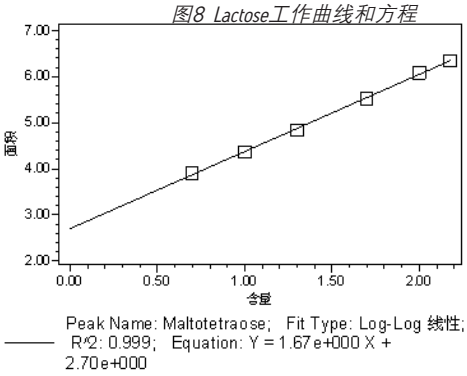


图10 Maltotetraose工作曲线和方程

方法的线性相关性

浓度分别为5.000、10.000、20.000、50.000、100.000、150.000 mg/L的八种糖标准品依次进样，进样量均为5μL，外标法定量。以峰面积A的lg值为纵坐标，浓度C的lg值为横坐标进行线性回归，得到8种糖的线性方程、复相关系数和线性曲线图如图3-图10所示，在5.000-150.000 mg/L范围8种糖均具有良好的lg-lg线性关系。

实际样品检测结果

从市场取某一奶粉样品，进行实际提取实验，进样检测，色谱图及结果数据见图11所示，可以看出此样品中含有蔗糖、乳糖、麦芽三糖和麦芽四糖四种糖成分，同时发现蔗糖和乳糖的含量相当高，已经超出检测器的响应范围；因此将此样品稀释100倍后再次进样检测，结果数据见图12。

由图11和12的数据可以知道此奶粉中含有蔗糖16.8mg/g、乳糖140.1 mg/g、麦芽三糖和麦芽四糖的含量分别只有1.9mg/g、1.3 mg/g。某液态奶提取后，稀释100倍检测结果见图13。

重现性

首先用50ppm混合标准6次连续重复进样，考察标准品在本方法下的稳定性，见图14所示重叠色谱图，重复数据见表3、表4。

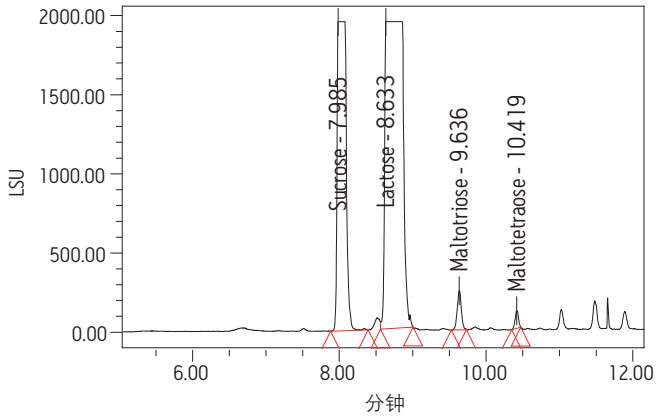
提取奶粉实际样品，由于乳糖含量较高，将其稀释了100倍，然后在不同天次连续3天进样检测，考察本方法对于实际样品日间的重现性情况，如图15所示是该实际样品3天内3次进样的重叠色谱图，由图可见该方法对实际样品在日间具有较好的重现性。

结论

本方法建立了用 Waters UPLC-ELSD 系统检测奶粉和牛奶实际样品中 Fructose（果糖）、Sorbose（山梨糖）、Glucose（葡萄糖）、Sucrose（蔗糖）、Maltose（麦芽糖）、Lactose（乳糖）、Maltotriose（麦芽三糖）、Maltotetraose（麦芽四糖）8 种常见糖的的定量分析方法。方法的检出限：有 6 种糖达到 5μg/g，另外两种糖 Sucrose 和 Lactose 在 5μg/g 下的信噪比可达到 24 和 12。使用 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱和三乙胺流动相体系，8 种糖均实现基线分离，可以用于奶粉和牛奶中常见这 8 种糖的含量测定。

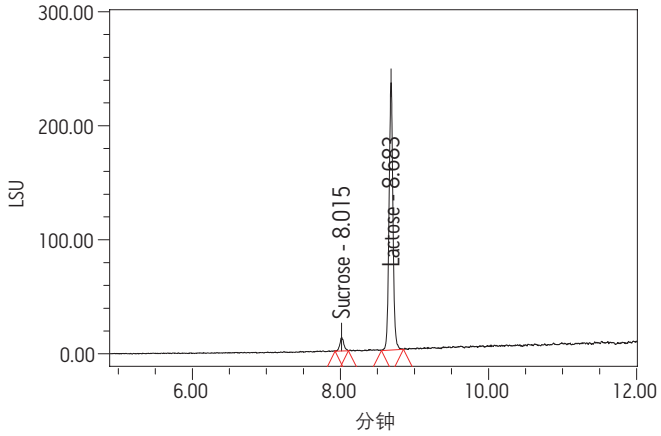
参考资料

Waters ACQUITY UPLC BEH Amide Columns Care & Use, P/N:715001371



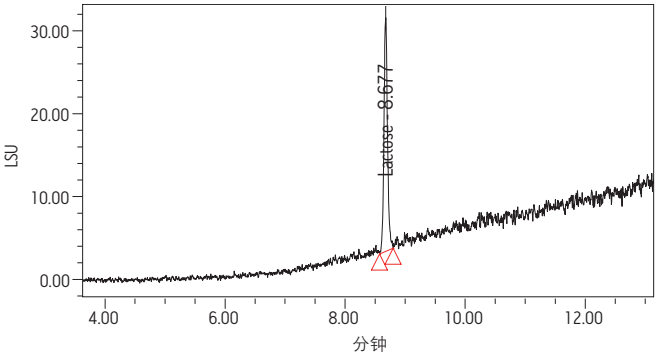
名称	保留时间(分钟)	面积(微伏*秒)	% 面积	高度(微伏)	积分类型	含量	单位
Fructose	5.746				丢失		
Sorbose	5.991				丢失		
Glucose	6.685				丢失		
Sucrose	7.985	16353040	32.80	1954279	BB	7001.522	ug/g
Maltose	8.518				丢失		
Lactose	8.633	32180012	64.55	1942011	BB	14380.591	ug/g
Maltotriose	9.636	960560	1.93	247390	BB	1901.108	ug/g
Maltotetraose	10.419	359170	0.72	111859	BB	1333.102	ug/g

图11 奶粉提取样品色谱图及结果数据



名称	保留时间(分钟)	面积(微伏*秒)	% 面积	高度(微伏)	积分类型	含量	单位	峰类型
Fructose	5.746				丢失			缺失
Sorbose	5.991				丢失			缺失
Glucose	6.685				丢失			缺失
Sucrose	8.015	45301	5.00	12140	BB	16833.663	ug/g	找到
Maltose	8.518				丢失			缺失
Lactose	8.683	860765	95.00	234194	BB	140075.906	ug/g	找到
Maltotriose	9.629				丢失			缺失
Maltotetraose	10.418				丢失			缺失

图12 奶粉提取样品稀释100倍色谱图及结果数据



名称	保留时间(分钟)	面积(微伏 秒)	% 面积	高度(微伏)	积分类型	含量	单位	峰类型
Fructose	5.746					丢失		缺失
Sorbose	5.991					丢失		缺失
Glucose	6.685					丢失		缺失
Sucrose	8.029					丢失		缺失
Maltose	8.518					丢失		缺失
Lactose	8.677	115200	100.00	28184	BB	3074.289	ug/g	找到
Maltotriose	9.629					丢失		缺失
Maltotetraose	10.418					丢失		缺失

图13 液态奶提取样品稀释100倍色谱图及结果数据

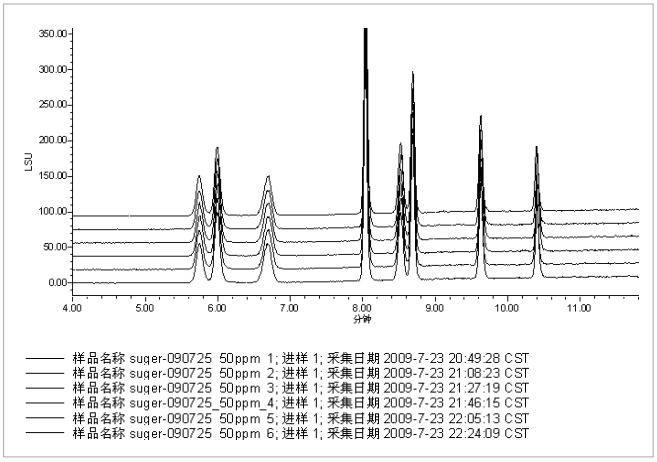


图14 50ppm标准品6次连续进样重叠色谱图

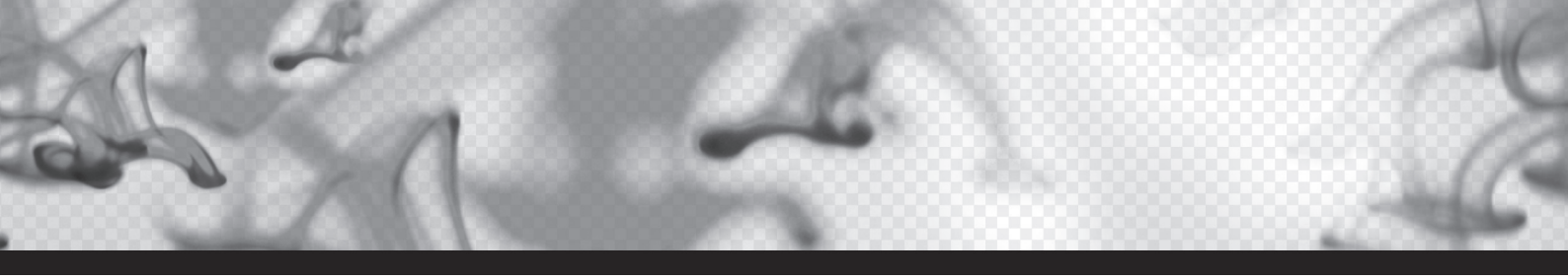


表3 8种分析物标准6次连续进样保留时间重现性表

组份结果

组份摘要：保留时间

	样品组名	采集日期	Fructose (分钟)	Sorbose (分钟)	Glucose (分钟)	Sucrose (分钟)	Maltose (分钟)	Lactose (分钟)	Maltotriose (分钟)	Maltotetraose (分钟)
1	tang_090725	2009-7-23 22:05:13 CST	5.740	5.994	6.707	8.045	8.532	8.697	9.635	10.406
2	tang_090725	2009-7-23 22:24:09 CST	5.740	5.992	6.704	8.039	8.526	8.691	9.629	10.398
3	tang_090725	2009-7-23 21:08:23 CST	5.745	5.995	6.704	8.041	8.529	8.690	9.624	10.399
4	tang_090725	2009-7-23 21:46:15 CST	5.748	5.988	6.695	8.037	8.519	8.691	9.638	10.417
5	tang_090725	2009-7-23 20:49:28 CST	5.749	5.992	6.678	8.037	8.520	8.687	9.630	10.406
6	tang_090725	2009-7-23 21:27:19 CST	5.752	6.001	6.700	8.039	8.527	8.687	9.637	10.416
Meen			5.746	5.993	6.698	8.040	8.525	8.691	9.632	10.407
Std.Dev.			0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01
%RSD			0.09	0.07	0.16	0.04	0.06	0.04	0.06	0.08

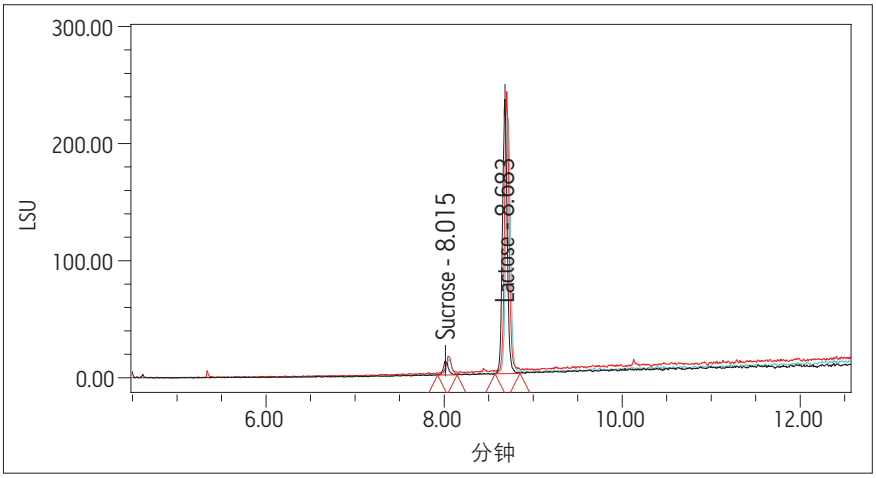


图15 实际奶粉提取样品日间重叠色谱图

表4 8种分析物标准6次连续进样峰面积重现性表

组份结果

组份摘要：保留时间

	样品组名	采集日期	Fructose (微伏*秒)	Sorbose (微伏*秒)	Glucose (微伏*秒)	Sucrose (微伏*秒)	Maltose (微伏*秒)	Lactose (微伏*秒)	Maltotriose (微伏*秒)	Maltotetraose (微伏*秒)
1	tang_090725	2009-7-23 22:05:13 CST	354618	545060	438062	1140458	487672	726145	506344	326732
2	tang_090725	2009-7-23 22:24:09 CST	356083	534300	437821	1132175	481857	728233	499234	323316
3	tang_090725	2009-7-23 21:08:23 CST	355120	547474	438539	1124477	478193	718707	504888	336143
4	tang_090725	2009-7-23 21:46:15 CST	350116	538270	447919	1115084	478887	738904	501336	326372
5	tang_090725	2009-7-23 20:49:28 CST	361989	555435	443966	1106920	476046	731810	514378	345616
6	tang_090725	2009-7-23 21:27:19 CST	357658	553336	447541	1116876	472319	731942	489793	327559
Meen			355931	545646	442311	1122998	479162	729290	502662	330956
Std.Dev.			3896.4	8267.9	4775.9	11743.7	5238.9	6765.1	8184.1	8373.6
%RSD			1.1	1.5	1.1	1.0	1.1	0.9	1.6	2.5