

离子色谱-脉冲安培检测法测定 婴幼儿配方奶粉中的反式低聚半乳糖

韩春霞 李仁勇
赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

离子色谱法；脉冲安培法；低聚半乳糖；婴幼儿配方奶粉

目标

建立婴幼儿配方奶粉中低聚半乳糖准确测定的方法

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，其分子结构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)。在自然界中，动物的乳汁中存在微量的GOS，而人母乳中含量较多，婴儿体内的双歧杆菌菌群的建立很大程度上依赖母乳中的GOS成分。低聚半乳糖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。新生儿的消化功能比较薄弱，所以婴幼儿奶粉中都添加了低聚半乳糖的营养成分。

AOAC发布了测定特定食品中的反式低聚半乳糖离子交换色谱法 [AOAC Official Method 2001.02 Determination of trans-Galactooligosaccharides (TGOS) in Selected Food Products]，可用于测定婴幼儿奶粉中的低聚半乳糖。该方法的局限性在于，当样品中乳糖与低聚半乳糖比例大于6时，测试结果存在较大误差。婴幼儿奶粉中的乳糖含量约为50%，国产奶粉中低聚半乳糖的添加量大多在0.4%-2%，很难满足该方法乳糖与低聚半乳糖比例不大于6的要求。

本实验尝试建立使用低聚半乳糖原料为对照品直接测定低聚半乳糖的方法。低聚半乳糖中含有数种不同结构的低聚糖，利用不受奶粉本底干扰的色谱峰来定性定量，测定奶粉中GOS的加入量。本方法中，低聚糖与乳糖有很好的分离度，因而可以不受样品中高含量乳糖的干扰，可准确测定婴幼儿奶粉中的低聚半乳糖。

仪器

Thermo Scientific™ ICS-离子色谱系统，包括：
– ICS-5000 DP色谱泵
– ICS-5000 DC检测器
Thermo Scientific™ AS-AP自动进样器
Thermo Scientific™ Chromeleon™ 色谱工作站



耗材

Thermo Scientific™ OnGuard II RP Cartridges (1cc, P/N 057083)

Thermo Scientific™ Target2™ Nylon Syringe Filters (0.45 μm, 30mm, P/N F2500-1)

一次性使用无菌注射器，1mL (上海治宇医疗器械有限公司)

试剂与标准品

去离子水 (18.2 MΩ-cm, Thermo Scientific™ genPure Pro™ UV-TOC, P/N 50131948)

NaOH溶液 (50% w/w水溶液, Alfa Aesar)

NaAc (Thermo Scientific, P/N 059326)

低聚半乳糖 (云浮市新金山生物科技有限公司)

标准溶液的制备

精密称取GOS原料，加水溶解并稀释成含GOS1000 mg/L的溶液，作为储备液。精密量取储备液适量，加水溶解并稀释成含GOS50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、200 mg/L的溶液。

样品前处理

精密称取奶粉样品0.5 g，置于10 mL容量瓶中，加水4 mL，振摇使溶解，60℃水浴10分钟。放至室温后，加乙腈至刻度，摇匀。静置10 min使沉降（必要时延长沉降时间，或离心）。取上清液1 mL，加水稀释至10 mL，摇匀，过0.22 μm 滤膜及1.0 cc OnGuard RP柱。进样。

色谱条件

分析柱：Thermo Scientific CarboPac PA20, 3 x 150 mm (P/N 060142)

保护柱：Thermo Scientific CarboPac PA20, 3 x 50 mm (P/N 060144)

淋洗液：A: 18.2 MΩ去离子水

B: 250 mmol/L NaOH

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

D: 100mmol/L NaOAc

时间	流速	A	B	C	D
min	mL/min	%	%	%	%
0	0.45	58	40	0	2
10	0.45	58	40	0	2
40	0.45	15	40	0	45
45	0.45	15	40	0	45
45.1	0.40	0	0	100	0
55	0.40	0	0	100	0
55.1	0.40	20	80	0	0
60	0.40	20	80	0	0
60.1	0.45	58	40	0	2
65	0.45	58	40	0	2

进样体积：10 μL

柱温：30 °C

检测器：电化学检测，金电极（P/N 046110），标准糖电位

运行时间：65 min

结果与讨论

色谱条件优化及不同GOS原料特征峰的选择

GOS中含有聚合度2-8的低聚半乳糖。利用醋酸钠梯度可分离聚合度及结构不同的低聚糖。如图1所示，不同

厂家的GOS原料，其含有的低聚半乳糖的种类和量均有差异。新金山的GOS原料，可以找到5组/个不受奶粉空白干扰的特征峰，其他厂家可使用G1、G2作为特征峰。

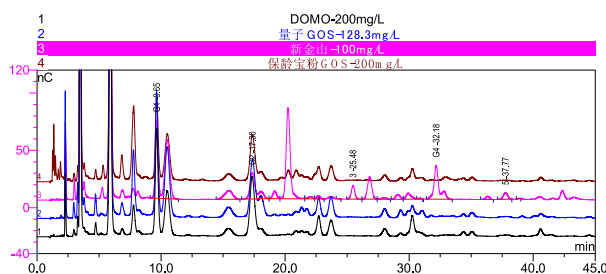


图1 不同厂家的低聚半乳糖色谱图

线性范围及线性方程

GOS特征峰的线性范围、相关系数、线性方程如表1所示。

表1 低聚半乳糖特征峰的线性范围、相关系数和线性方程

特征峰	浓度范围 (mg/L)	相关系数 %	截距	斜率
G1	10-250	99.997	0.1014	0.4151
G2	10-250	99.9994	0.0146	0.1309
3	10-250	99.995	-0.0401	0.0389
G4	10-250	99.993	0.1117	0.1398
5	20-250	99.994	-0.0828	0.0244

前处理条件的选择

温度提高时，GOS溶解度增加，60 °C水浴30分钟，可保证奶粉中GOS的溶出。奶粉中含有大量的蛋白和脂肪，需要在进入色谱柱之前除去。选择牛奶：乙腈 = 4 : 6 来沉降蛋白，沉降蛋白需要的时间为10 min左右。如未沉淀完全，可适当延长沉降时间，或离心分离。

回收率

精密称取空白奶粉样品（不含GOS）0.5 g，分别加入GOS 2.5 mg、5 mg、10 mg、15 mg（加标量相当于0.5%、1%、2%、3%），按照样品前处理项下的方法进行操作，计算回收率。同时在另一样品中同时加入GOS和FOS 2.5 mg、5 mg、10 mg、15 mg（加标量相当于0.5%、1%、2%、3%），按照样品前处理项下的方法进行操作，计算回收率。不同浓度的加标回收率如表2所示：

表2 加标回收率

	加标量	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	平均
1	0.5%	105.7%	90.3%	95.6%	122.3%	122.3%	107.2%
2 (同时加入FOS)	0.5%	105.9%	90.8%	96.3%	121.4%	121.4%	107.2%
3	1%	103.0%	99.6%	96.7%	107.0%	107.0%	102.7%
4 (同时加入FOS)	1%	111.9%	107.2%	106.8%	115.0%	115.0%	111.2%
5	2%	99.8%	95.6%	96.6%	100.9%	100.9%	98.8%
6 (同时加入FOS)	2%	100.2%	95.7%	99.6%	100.8%	100.8%	99.4%
7	3%	101.4%	99.1%	99.8%	101.8%	101.8%	100.8%
8 (同时加入FOS)	3%	100.8%	98.3%	101.3%	98.7%	98.7%	99.6%

重现性

平行称取7份样品，测得含量的RSD值，以峰1、峰2、峰3、峰4计算，不超过3%；以峰5计算，不超过5%。

	含量					平均
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	
1	1.91%	2.05%	2.05%	1.98%	2.23%	2.04%
2	1.85%	1.98%	1.98%	1.91%	2.00%	1.95%
3	1.88%	2.02%	2.02%	1.96%	2.01%	1.98%
4	1.82%	1.96%	1.96%	1.94%	1.91%	1.92%
5	1.85%	2.00%	2.00%	1.94%	1.97%	1.95%
6	1.92%	2.09%	2.09%	2.06%	2.06%	2.04%
7	1.84%	1.98%	1.98%	1.92%	2.00%	1.95%
平均	1.87%	2.01%	2.01%	1.96%	2.03%	1.98%
RSD	2.04%	2.23%	2.23%	2.55%	4.98%	2.53%

结论

本文采用优化的方法，在65 min内实现了奶粉中低聚半乳糖的良好分离。该方法线性范围宽，灵敏度高。将本方法应用于实际样品的检测和加标回收实验，均得到很好的结果。

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
 SCIENTIFIC