

高效液相色谱法测定婴儿配方奶粉中乳糖和蔗糖含量的前处理方法优化

陈星蓉*, 汪玉玲, 李 桑, 林腾奕, 陆婷婷, 梁培荣

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: 目的 优化 GB 5413.5-2010《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定》(第一法)中前处理步骤。**方法** 样品先用 15 mL 热水溶解, 再加入乙酸锌、亚铁氰化钾溶液各 2 mL, 涡旋振荡超声, 加水定容到 50 mL, 离心过滤, 最终通过高效液相色谱仪测定。**结果** 测定乳糖含量较低的样品时, 国标测定的结果与本方法相近, 2 种方法的相对标准偏差为 0.22%。国标方法的样品加标回收率为 99.0%, 本方法为 99.7%。本方法样品重复 6 次, 蔗糖重复性的相对标准偏差为 0.593%, 乳糖为 1.24%。当国标方法测定乳糖含量较高的样品时, 会出现糖析出的问题, 测得乳糖的含量远低于本方法。**结论** 本方法解决了国标前处理出现的样品糖析出问题。研究结果表明本方法的精密度高、准确度高, 线性范围良好, 操作简单, 是测定婴儿配方奶粉中蔗糖和乳糖含量的有效方法。

关键词: 婴儿配方奶粉; 乳糖; 蔗糖; 高效液相色谱法; 示差检测器

Optimization of pretreatment method for determination of sucrose and lactose in infant formula by high performance liquid chromatography

CHEN Xing-Rong*, WANG Yu-Ling, LI Sang, LIN Teng-Yi, LU Ting Ting, LIANG Pei-Rong

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the pretreatment steps in GB 5413.5-2010 *National food safety standard-Determination of lactose and sucrose in foods for infants and young children*, (method 1). **Methods** The sample was first dissolved in 15 mL of hot water, then 2 mL zinc acetate and 2 mL potassium ferrocyanide solutions were added, vortexed and sonicated, after adding water to 50 mL, the solution was centrifuged, and finally detected by high-performance liquid chromatography. **Results** For samples with low lactose content, the result of national standard method was similar to that of this method, with a relative standard deviation of 0.22%. The recovery rate of spiked samples was 99.0% in national standard and 99.7% in this method. This method was repeated for 6 times with the relative standard deviation of sucrose reproducibility of 0.593% and lactose of 1.24%. When the national standard method was used to determine samples with high lactose content, the problem of sugar precipitation would occur, and the measured lactose content was far lower than that of this method. **Conclusion** The problems of turbidity and sugar precipitation in the pretreatment process in the national standard are solved. The results show that this method has high precision, high accuracy, good linear range and simple operation, which is an effective method for the determination of sucrose and lactose in infant formula milk powder.

*通讯作者: 陈星蓉, 助理工程师, 主要研究方向为食品理化检验与食品安全。E-mail: 395685470@qq.com

*Corresponding author: CHEN Xing-Rong, Assistant Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: 395685470@qq.com

KEY WORDS: infant formula; lactose; sucrose; high performance liquid chromatography; refractive index detector

1 引言

糖类是奶粉中比较重要的成分之一,特别是乳糖经人体内乳糖酶作用后能形成有机酸,可以促进钙离子的吸收,促进有益菌的成长,有利于肠道健康^[1]。乳糖的化学名称为 1,4-半乳糖苷葡萄糖,属还原糖双糖,分子中有醛基,由葡萄糖和半乳糖形成。乳糖被水解后,生成易被人体吸收的半乳糖和葡萄糖,其中部分葡萄糖又会转化成果糖^[2-4]。

目前,测定糖含量的方法主要有高效液相色谱法^[5-8]、化学法^[9,10]、离子色谱法^[11-13]等,其中离子色谱法样品处理和仪器操作较为繁琐,化学法操作繁琐费时,都不利于实验室推广应用。而高效液相色谱法操作简单,应用最为广泛。

在日常检验过程中我们发现按照国标方法 GB 5413.5-2010《食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定》^[14]来测定婴儿配方奶粉中蔗糖和乳糖含量时,第二法茚三酮-埃农氏法和第一法高效液相色谱-示差折光检测法相比,第一法测定乳糖和蔗糖含量的准确度更高^[15]。但是第一法用乙腈定容时溶液常出现混浊,查阅文献发现有机溶剂的存在降低了水分活度,并抑制了乳糖与水分子之间的结合^[16]。由于有机溶剂极性的不同,其对水分活度及乳糖溶解度的抑制作用也有所不同。其中乙腈对乳糖的析出能力最强,当有机溶剂比例为 60%时,乳糖析出量高达 90.27%^[17]。为了解决这一问题,本研究对样品的前处理过程进行改进,旨在选择更为快速、准确的检验方法,简化实验步骤,降低实验成本,提高效率,保护环境。

2 材料与方法

2.1 试剂与材料

乙腈(色谱纯,德国默克股份公司);乙酸、乙酸锌、亚铁氰化钾(分析纯,广州化学试剂厂);水杨酸(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);乳糖标准品、蔗糖标准品(纯度为 99.9%,美国 Stanford Analysis Chemicals 公司);实验所用水均为超纯水。

多个品牌的婴儿配方奶粉(均为市售商品)。

2.2 仪器与设备

LC-20A 岛津高效液相色谱仪(配 RID-20A 示差折光检测器,岛津企业管理有限公司);MS105DU 万分之一天平、PL602E 电子天平(瑞士梅特勒公司);KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Thermo Stratos 冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技公司);Milli-Q Reference 超纯水仪(美国密理博公司);氨基色谱柱(4.6 mm×

250 mm, 5 μ m, 美国 Waters 公司);0.45 μ m 针孔滤膜(德国波尔公司)。

2.3 溶液制备

蔗糖、乳糖标准储备液:分别称取蔗糖标准品 0.5 g、乳糖标准品 1.0 g(精确到 0.0001 g)至 50 mL 于容量瓶中,用水溶解并定容至刻度,蔗糖浓度为 10 mg/mL,乳糖浓度为 20 mg/mL。放入 2~8 °C 冰箱中储存备用,保质期 6 个月。

蔗糖、乳糖混合标准溶液:分别吸取蔗糖储备液 1、2、3、4、5 mL 和乳糖储备液 1、2、3、4、5 mL 于 10 mL 容量瓶中,再吸取用流动相定容至刻度。配成混合标准系列工作液,浓度分别为蔗糖 1、2、3、4、5 mg/mL,乳糖 2、4、6、8、10 mg/mL。

乙酸锌溶液:准确称取 22.0 g 乙酸锌溶于水中,加水定容至 100 mL。

亚铁氰化钾溶液:准确称取 10.6 g 亚铁氰化钾溶于水中,加水定容至 100 mL。

2.4 色谱条件

检测器:示差检测器;色谱柱:氨基柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m, 美国 Waters 公司);流动相:乙腈-水=70:30(V:V);柱温:35 °C;运行时间:15 min;示差折光检测器温度:35 °C;进样量:10 μ L;流速:1.0 mL/min,洗脱程序:等度洗脱。

2.5 样品前处理

准确称取奶粉 1.0 g(精确到 0.1 mg)于 50 mL 容量瓶中,加入 50~60 °C 的热水 15 mL,涡旋振荡 1 min,超声振荡 10 min,再加入乙酸锌溶液和亚铁氰化钾溶液各 2 mL,摇匀,用水定容,离心机以 7000 r/min 的转速离心 5 min,0.45 μ m 滤膜过滤,供高效液相色谱仪分析。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的确定

蔗糖作为乳粉的添加组分,可能会对色谱图中乳糖的分离造成干扰^[18]。在 2.4 给定的色谱条件下,蔗糖和乳糖的出峰时间分别为 7.651、8.969 min。在给定的色谱条件,2 个标准品的色谱峰分离完全,峰型正常,无拖尾现象,分离效果理想,色谱图如图 1 所示。

3.2 样品前处理方法的确定

本研究共试验了 4 种沉淀蛋白质的前处理方法:

(a) 国标方法:称取样品,加 15 mL、热水溶解,用乙腈定容至 50 mL^[18];

(b) 水杨酸:称取样品,加 15 mL 热水溶解,加入 0.3 g 水杨酸,用水定容至 50 mL;

(c)3%乙酸溶液:称取样品,加 15 mL 热水溶解,加 1 mL 3%乙酸,用水定容至 50 mL;

(d)乙酸锌和亚铁氰化钾溶液:称取样品,加 15 mL 热水溶解,分别加入 2 mL 乙酸锌溶液和亚铁氰化钾溶液,用水定容至 50 mL。即本文 2.5 所用方法。

从结果的准确性、提取液的澄清度、前处理的复杂性和环境环保等方面来考察 4 种前处理方法的优劣。表 1 为 4 种方法处理 4 个样品前处理得到乳糖的含量。结果表明,通过 *t*-检验 4 种方法存在显著性差异($P < 0.05$)。当样品中乳糖含量较高时,方法(a)测得的乳糖含量比另外 3 种方法小,这是由于乙腈的含量过高而引起糖析出问题。而且还会出现浑浊,过滤困难的现象,通过超声和静置均不能得到改善。方法(b)对样品的沉淀效果不大,也会出现浑浊和过滤困难的情况。方法(c)和方法(d)都能够很好的沉淀奶粉中的杂质,获得澄清的提取液。

表 2 为方法(c)和方法(d)处理 10 个样品得到乳糖的含量。结果表明通过 *t*-检验 2 种方法不存在显著性差异($P > 0.05$)。其中方法(d)前处理测得乳糖含量 10 个样品中有 8 个比方法(c)的高,且得到色谱图的峰型好和基线平稳,故采取方法(d)。方法(d)处理得到的样品光谱图如图 2 所示。

表 1 4 种方法处理 4 个样品得到乳糖的含量
Table 1 Results of four samples by four methods

样品编号	方法(a) 含量 /(mg/g)	方法(b) 含量 /(mg/g)	方法(c) 含量 /(mg/g)	方法(d) 含量 /(mg/g)
3#	648.394	627.363	628.923	619.643
6#	537.026	926.644	924.251	923.357
8#	561.095	927.426	918.808	922.267
10#	699.453	855.519	839.501	838.725

表 2 10 个样品用 2 种前处理方法得到的乳糖含量
Table 2 Results of 10 samples by 2 methods

样品编号	(c) 方法含量 /(mg/g)	(d) 方法含量 /(mg/g)	平均值/(mg/g)
1#	921.764	897.868	909.816
2#	693.312	724.784	709.048
3#	631.844	637.478	634.661
4#	986.041	988.548	987.295
5#	911.967	924.738	918.353
6#	914.155	956.828	914.155
7#	912.817	934.444	923.631
8#	929.732	934.779	932.256
9#	860.721	856.059	858.390
10#	851.810	846.786	849.298

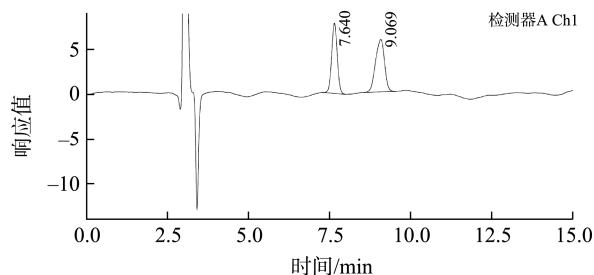


图 1 蔗糖、乳糖标准品色谱图

Fig.1 Chromatogram of sucrose and lactose in standards

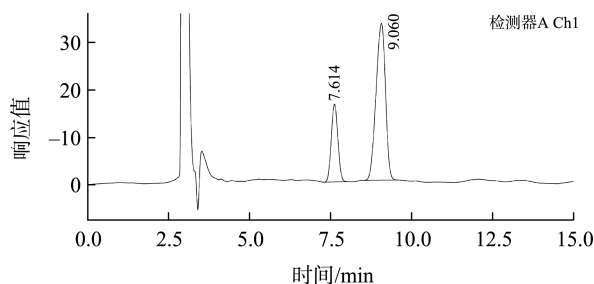


图 2 样品中蔗糖、乳糖色谱图

Fig.2 Chromatogram of sucrose and lactose in samples

3.3 线性结果

在 2.4 的色谱条件下测定蔗糖和乳糖标准工作曲线,用保留时间定性。以峰面积 Y 为纵坐标,相应的浓度 X 为横坐标,进行线性回归定量,线性方程为蔗糖 $Y=53595X+3328.09$,乳糖 $Y=52424.8X+7340.20$ 。蔗糖和乳糖的标准工作曲线相关系数 r 为 0.9997 和 0.9996,线性范围分别为:蔗糖 1 ~ 5 mg/mL、乳糖 1 ~ 10 mg/mL。

3.4 重复性试验

按 2.5 重复制备 6 个样品,准确吸取 10 μ L 试样溶液,在 2.4 的色谱条件下,测定峰面积,计算相对标准偏差。结果表明试样溶液蔗糖和乳糖峰含量相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.593%和 1.24%。说明方法重复性良好。

按 2.3 制成蔗糖和乳糖标准溶液,准确吸取 10 μ L 某一浓度,在 2.4 的色谱条件下,连续进样 6 次,测定峰面积和保留时间,计算相对标准偏差。结果表明蔗糖和乳糖的峰面积的 RSD 为 0.69%和 3.7%,保留时间的 RSD 为 0.017%和 0.020%,结果见表 3。说明仪器精密性良好。

3.5 检出限

以目标化合物 3 倍信噪比(S/N)确定方法检出限,根据 2.4 的色谱条件测得样品中乳糖的方法检出限为 0.3 g/100 g,蔗糖的方法检出限均为 0.12 g/100 g,优于国标方法蔗糖和乳糖检出限为 0.3 g/100 g。

表 3 蔗糖、乳糖的含量、峰面积和保留时间重复性结果($n=6$)
Table 3 The repeatability of sucrose, lactose content, area and retention time($n=6$)

组分	含量/(mg/g)	RSD/%	峰面积测定值	RSD/%	保留时间测定值/min	RSD/%
蔗糖	127.825	0.593	285314	0.69	7.648	0.017
乳糖	655.047	1.24	315472	3.65	8.952	0.020

3.6 样品加标回收率

进行乳糖含量加标回收试验, 由于样品中乳糖含量过高, 需要的加标量过多, 所以降低称样量来降低乳糖含量。称取样品 0.1000 g, 准确加入标准品, 按照国标和本文方法制备样品溶液, 测定样品中乳糖计算的回收率, 结果详见表 4。结果表明国标方法的回收率为 98.7%、98.7%和 99.6%, 本方法的回收率为 99.6%、99.9%和 99.6%。国标方法的样品加标回收率为 99.0%, 本方法为 99.7%。该方法回收率较高。

表 4 加标回收试验($n=4$)
Table 4 Results of recovery for the method($n=4$)

方法	加标浓度/(mg/mL)	平均值/(mg/g)	加标回收率/%	RSD/%
国标方法	0	595.665	/	0.4
	200	792.996	98.7	0.5
	400	990.299	98.7	0.5
	600	1193.060	99.6	0.1
本文方法	0	596.521	/	0.7
	200	795.779	99.6	0.2
	400	996.280	99.9	0.2
	600	1194.202	99.6	0.3

3.7 本文方法与国标方法的差异比较

本文方法在国标的基础上改进了样品的前处理, 选择用乙酸锌和亚铁氰化钾代替乙腈沉淀样品中蛋白质等杂质, 避免了前处理过程的浑浊现象。2 种方法重复 8 次测定同一个奶粉中蔗糖、乳糖含量, 结果见表 5。结果表明, 测定乳糖含量较低的样品时, 国标测定的结果与本方法相近, 2 种方法的相对标准偏差为 0.22%。2 种方法测得蔗糖和乳糖含量通过 t -检验不存在显著性差异($P > 0.05$), 说明此方法可行性高, 可以用来测定乳制品中蔗糖和乳糖的含量, 达到分析要求。

表 5 2 种方法测定乳制品中蔗糖和乳糖含量的比较($n=8$)
Table 5 Determination results of sucrose and lactose content by 2 methods($n=8$)

组分名称	方法	平均值/(mg/g)	RSD/%
蔗糖	本方法	128.285	2.4
	国标	129.569	3.3
乳糖	本方法	718.265	2.3
	国标	696.144	1.0

4 结论与讨论

本方法通过对国标方法前处理进行改进, 用乙酸锌和亚铁氰化钾溶液代替乙腈作为沉淀剂, 解决了国标方法中前处理出现的混浊现象。此方法精密度高, 同一样品的 6 次重复相对标准偏差为蔗糖 0.593%和乳糖 1.24%; 线性关系良好, 相关系数 r 为蔗糖 0.9996 和乳糖 0.9997; 回收率高, 本方法对样品进行低中高 3 个水平的加标, 回收率分别为 99.6%、99.9%和 99.6%。当检测乳糖含量较低的样品, 测定结果与国标相近, 2 个方法测定结果通过 t -检验不存在显著性差异($P > 0.05$)。当检测乳糖样品含量较高的样品, 国标方法由于前处理使用的乙腈过高, 导致样品出现糖析出现象, 国标测定结果远低于本方法。

本方法更加适用于婴儿配方奶粉, 因为大部分婴儿配方奶粉中乳糖的含量较高, 国标方法的前处理会由于乙腈含量过高而导致糖析出, 测定结果不准确。本方法测定结果更加准确, 适用于婴儿配方奶粉中蔗糖和乳糖含量的测定。

本方法前处理过程中避免了使用有机溶剂乙腈, 减小了对实验人员身体健康的伤害, 保护环境, 前处理过程简单, 适用于大批量样品。此研究为提高完善 GB5413.5-2010《食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定》(第一法)提供了一定的试验基础和依据, 对实际检验工作具有指导意义。

参考文献

- [1] 赵丹霞, 王力清, 黄秋研, 等. 国内市售婴幼儿配方乳粉中葡萄糖、果糖、乳糖及蔗糖含量的检测与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(3): 942-947.
- [2] 杨笑, 杨毅华. 婴幼儿乳粉中乳糖测定过程中常见问题的探讨[J]. 食品工程, 2013, (3): 39-40.
- [3] Yang X, Yang YH. Study of lactose determination in Infant milk powder [J]. J Food Eng, 2013, (3): 39-40.
- [4] Yang Y, He M, Cui H, et al. The prevalence of lactase deficiency and lactose intolerance in Chinese children of different ages [J]. Chin Med J, 2000, 113(12): 1129-1132.
- [5] 陶兆林, 张世满, 司友琳. 利用分光光度法测定乳制品中的乳糖[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(1): 50-51.
- [6] Tao ZL, Zhang SM, Si YL. Determination of lactose in dairy products by using spectrophotometric method [J]. Chin J Health Lab Technol, 2001,

- 11(1): 50-51.
- [5] Paul BF, Benjamin E, Dawson A. Characterization of sugars from modelandenzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquidchromatography coupled to evaporative light scattering detection [J]. *Biores Technol*, 2009, 100(24): 6661-6664.
- [6] Salim O, Paul S, Mostapha BB, *et al.* HPLC sugar profiles of algerianhoneys [J]. *Food Chem*, 2010, 121(2): 561-568.
- [7] 樊祥, 王敏, 韩丽, 等. 乳制品中乳糖的高效液相色谱-脉冲式安培电化学检测[J]. *分析实验室*, 2010, 29(增刊 1): 30-32.
Fan X, Wang M, Han L, *et al.* High performance liquid chromatography - pulsed amperometric electrochemical detection of lactose in dairy products [J]. *Chin J Anal Lab*, 2010, 29(S1): 30-32.
- [8] 杨勇, 吴琳琳, 罗奕, 等. HPLC-CAD 法测定乳制品中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖和麦芽糖含量的不确定度评定[J]. *中国食品添加剂*, 2015, (9): 172-180.
Yang Y, Wu LL, Luo Y, *et al.* Uncertainty evaluation of determination of fructose, glucose, sucrose, lactose, galactose and maltose in dairy products by HPLC-CAD [J]. *China Food Addit*, 2015, (9): 172-180.
- [9] 王欢, 卢红梅, 张义明, 等. 固态发酵食醋中还原糖、总糖含量测定[J]. *中国酿造*, 2011, 234(9): 172-175.
Wang H, Lu HM, Zhang YM, *et al.* Determination of reducing sugar and total sugar in solid fermentation vinegar [J]. *Chin Brew*, 2011, 234(9): 172-175.
- [10] 李加友, 毛怡俊, 徐赛男, 等. 金樱子酒中还原糖的分光光度法测定 [J]. *现代食品科技*, 2011, 36(10): 244-246.
Li JY, Mao YJ, Xu SN, *et al.* Spectrophotometric determination of reducing sugar in cherokee rose wine [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2011, 36(10): 244-246.
- [11] 余娜, 周光明, 朱娟, 等. 离子色谱法检测蜂蜜和葡萄酒中的蔗糖、葡萄糖和果糖[J]. *食品科学*, 2010, 31(16): 188-191.
Yu N, Zhou GM, Zhu J, *et al.* Determination of sucrose, glucose and fructose in honey and wine by ion chromatography [J]. *Food Sci*, 2010, 31(16): 188-191.
- [12] Qian WL, Khan Z, Watson DG, *et al.* Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry [J]. *J Food Compos Anal*, 2008, 21(1): 78-83.
- [13] 刘晓玲, 李东刚, 史娟, 等. 离子色谱-脉冲安培检测器分析饮料中单糖和二糖[J]. *光谱实验室*, 2010, 27(2): 441-444.
Liu XL, Li DG, Shi J, *et al.* Analysis of monosaccharides and disaccharides in beverages by ion chromatography - pulsed amperometric detector [J]. *Chin J Spectr Lab*, 2010, 27(2): 441-444.
- [14] GB 5413.5-2010 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中乳糖、蔗糖的测定[S].
GB 5413.5-2010 National food safety standard-Determination of lactose and sucrose in infant food for infant and young children, milk and milk products [S].
- [15] 郭秀春, 郭小白, 张苗苗, 等. 莱茵-埃农氏法和高效液相色谱-示差折光法检测奶粉中乳糖和蔗糖的比较研究[J]. *食品科学*, 2016, 37(12): 139-143.
Guo XC, Guo XB, Zhang MM, *et al.* Comparative detection of lactose and sucrose in milk powder by Lane-Eynon's method and high performance liquid chromatography with refractive index detector [J]. *Food Sci*, 2016, 37(12): 139-143.
- [16] 董艺凝, 孙艳辉, 陈玉萍, 等. 水/有机溶剂双相体系中乳糖溶解度的测定[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(4): 262-267.
Dong YN, Sun YH, Chen YP, *et al.* Lactose solubility in water/organicsolvent two-phase system of measurement [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2015, 15(4): 262-267.
- [17] 熊建飞, 周光明, 许丽, 等. 离子色谱法测定奶粉中的葡萄糖、蔗糖和乳糖[J]. *食品科学*, 2012, 33(8): 176-179.
Xiong JF, Zhou GM, Xu L, *et al.* Determination of glucose, sucrose and lactose by ion chromatography in milk powder [J]. *Food Sci*, 2012, 33(8): 176-179.
- [18] 游正琴, 杨勇, 许乾丽, 等. HPLC-CAD 法同时测定乳制品中糖类[J]. *中国乳品工业*, 2015, 43(6): 55-57.
Yu ZQ, Yang Y, Xu QL, *et al.* Simultaneous determination of carbohydrate in dairy products by HPLC-CAD [J]. *Chin Dairy Ind*, 2015, 43(6): 55-57.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



陈星蓉, 助理工程师, 主要研究方向为食品理化检验与食品安全。
E-mail: 395685470@qq.com