

使用 ACQUITY UPLC H-Class系统和ACQUITY QDa检测器 分析牛奶和婴儿配方奶粉中的单糖和双糖

Mark E. Benvenuti, Dimple Shah和Jennifer A. Burgess
沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德）

应用优势

- ACQUITY® QDa® 检测器通过将保留时间和质谱分析相结合，为化合物鉴定提供了更优的分析选择性。
- 从食品中存在的不同糖类和糖醇类获取信息量丰富的数据。
- ACQUITY QDa检测器为常用于碳水化合物分析的折射率 (RI) 或蒸发光散射 (ELS) 检测器提供了互补检测。

沃特世解决方案

[ACQUITY UPLC® H-Class系统](#)

[ACQUITY QDa检测器](#)

[ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱](#)

[Sep-Pak® C₁₈小柱](#)

关键词

QDa, 牛奶, 婴儿配方奶粉, 糖类, 碳水化合物, 麦芽糖, 乳糖, 果糖, 葡萄糖, 蔗糖, 肌醇, 单糖

简介

糖类和糖醇类均为碳水化合物，是食品中的天然成分，具有重要的营养价值。为了增加香味或模仿新鲜食品，加工后的食品中会添加一些糖类。近年来，随着发达国家人口肥胖症和糖尿病患病率日益增高，糖类摄入量的进一步监控需求也不断增加。因此，为满足日益严苛的法规要求，食品标签上需提供准确的糖含量信息。

糖类和糖醇类的分析极具挑战性，因为它们的化合物结构中缺乏发色团，并且各种分子间十分相似，其中许多互为异构体。凭借良好的分离能力、准确度和分析速度，HPLC已经成为糖类分析的不二之选^{1,2}。HPLC技术采用了RI或ELS检测。RI检测要求对流动相进行谨慎控制，以避免在分析中发生任何变化，因此需要等度洗脱。采用RI检测时，难以在一次分析到下一次分析之间改变流动相组分，这是因为在使用不同的流动相组分时，RI检测器可能需要数小时才能达到平衡，甚至当使用一批新的相同流动相时，RI仍能检测到细小的变化而导致基线变化。在流动相组分发生变化的情况下，ELS检测相对而言更加可靠，但是ELS常常无法实现复杂食品基质中糖类检测所需的灵敏度和选择性。

另一种方法是采用带有电喷雾离子源 (ESI) 的质谱检测器。Waters® ACQUITY QDa检测器可降低检测限，并能够获取样品中组分的相关质谱信息。色谱保留时间和质量数信息的这一组合为糖类和糖醇类的分析提供了改善的选择性。ACQUITY QDa检测器是唯一一款专为与LC系统结合使用而设计的质谱检测器。它可配置在LC仪器组合之中，所需空间与PDA检测器相同。已经熟悉HPLC的用户无需过多的培训，就能快速地利用质谱检测实现更佳的选择性和灵敏度。在本应用纪要中，介绍了将ACQUITY QDa检测器与ACQUITY UPLC H-Class系统相结合，用于分析牛奶和婴儿配方奶粉中的糖类。

实验

UPLC条件

系统:	ACQUITY UPLC H-Class
运行时间:	17.0 min
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μ m 2.1 \times 150 mm
柱温:	35 $^{\circ}$ C
流动相:	75:25乙腈/水 10 mM NH_4HCO_3 溶液, 0.1% NH_4OH 溶液
流速:	0.13 mL/min
进样体积:	0.7 μ L

质谱条件

MS系统:	ACQUITY QDa检测器
电离模式:	ESI-
毛细管电压:	0.8 V
锥孔电压:	4.0 V
探头温度:	600 $^{\circ}$ C
采集速率:	1 Hz
全扫描:	50-450 m/z
SIR质量数:	见表1

化合物	SIR (<i>m/z</i>)
果糖	215.1 [$\text{M}+\text{Cl}^-$]
葡萄糖	215.1 [$\text{M}+\text{Cl}^-$]
肌醇	179.2 [$\text{M}-\text{H}^+$]
乳糖	377.2 [$\text{M}+\text{Cl}^-$]
麦芽糖	377.2 [$\text{M}+\text{Cl}^-$]
蔗糖	341.3 [$\text{M}-\text{H}^+$]

表1. 用于单糖、双糖和肌醇的SIR *m/z*。

标准品制备

用水配制五种食用糖（果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖）和肌醇的1000 mg/L储液。再利用这些储液，用50:50水/乙腈溶液配制50 mg/L的混合储液。根据需要，用50:50水/乙腈溶液进一步稀释此储液，以测定分析物的保留时间。

样品制备

按照Chavez-Servin等人描述的方法，制备了全脂牛奶、乳制婴儿配方奶粉和大豆蛋白婴儿配方奶粉的样品³。将所得一部分上清液使用Sep-Pak C₁₈小柱进行通过式纯化处理³。第二部分上清液不经过纯化直接进行分析，所得结果相同（数据未示出）。进样前，用50:50水/乙腈溶液配制所有萃取物的稀释液（1:500和1:20）。

结果与讨论

图1显示了五种常见食用糖的分离结果，包括两种单糖（葡萄糖和果糖）、三种双糖（蔗糖、乳糖和麦芽糖）和一种糖醇（肌醇）。为了分离双糖（乳糖和麦芽糖），采用了等度方法。对每种碳水化合物进行了多个质量数监测。果糖、葡萄糖和肌醇均具有180的分子质量数。通过使用ESI，肌醇形成了去质子化的分子离子， m/z 为179。果糖和葡萄糖中丰度最高的离子是氯加合物 $[M+Cl]^-$ ， m/z 为215。据报道，这类氯加合物已被用于一些糖类的MS分析，因为氯加合物的强度可以超过这些分析物的 $[M-H]^-$ ⁴。本研究中的氯加合物来自环境中普遍存在的背景氯化物。肌醇的分析中同样也存在氯加合物，但比 m/z 179的响应弱。分析结果显示蔗糖具有两种丰富离子： m/z 341处的去质子化分子离子和 m/z 377处的氯加合物。乳糖和麦芽糖在 m/z 377处产生主要的氯加合物离子。图1中的叠加图显示了浓度为20 ppm的SIR谱图，具有 $[M-H]^-$ 和 $[M+Cl]^-$ 的化合物明显出现多个响应。

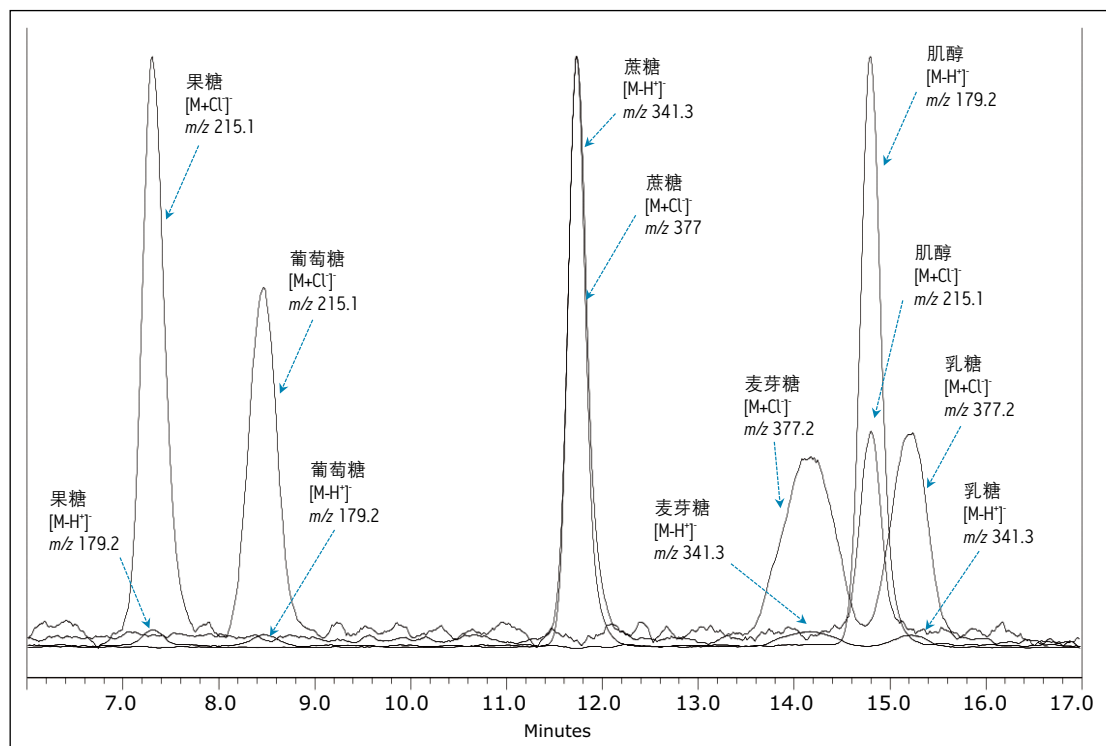


图1. 使用等度分离分析单糖、双糖和糖醇的20 ppm混合标准品的多SIR通道 (m/z 179、215、341和377) 叠加色谱图。

肌醇是一种重要的糖醇，在人类母乳中含量高。在婴儿配方奶粉中补充肌醇，可确保婴儿能从配方奶粉中获取与人类母乳等量的肌醇⁵。使用上述等度方法，肌醇在约15分钟处与乳糖发生部分共洗脱。对于RI或ELS检测而言，这将会影响乳糖和肌醇检测的准确性。然而借助质谱检测，该问题便能迎刃而解，因为利用乳糖和肌醇的不同分子量可分别对其进行评估。图2中的结果证实了这一点，其中显示了肌醇和乳糖各自的SIR通道。

为乳糖不耐症患者或乳制品过敏消费者生产的一些不含乳糖的替代食品中，麦芽糖和乳糖的分离十分重要。麦芽糖也是大豆中的主要碳水化合物⁶，通常被用作无乳糖食品中的乳制品替代物。为了测定乳糖存在与否，必须将其从具有相同分子质量数的麦芽糖中分离出来。因此，只有结合LC和MS的互补选择性才能实现化合物的鉴定。图3显示了两种不同的婴儿配方奶粉以及一种含有乳糖和麦芽糖的标准品的分析结果。正如色谱图所示，乳制婴儿配方奶粉中存在乳糖，但不含可检出水平的麦芽糖。大豆蛋白婴儿配方奶粉则恰好相反，不含可检出水平的乳糖。

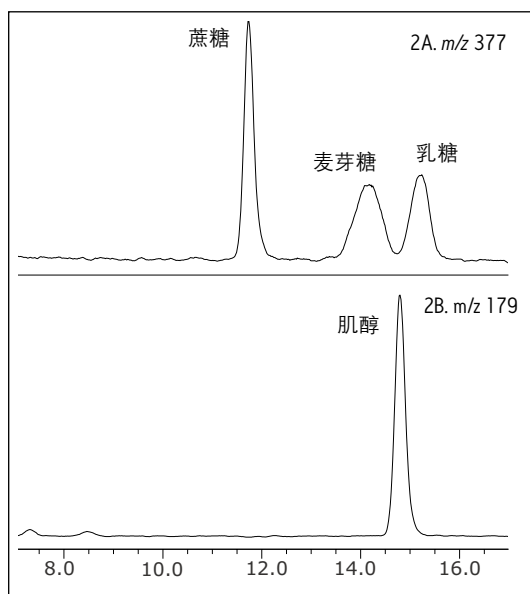


图2A. m/z 377的SIR色谱图，图中显示了蔗糖、麦芽糖和乳糖的洗脱。2B. m/z 179的SIR色谱图，显示了肌醇的洗脱。由于肌醇的质量数不同，尽管它与乳糖发生了部分共洗脱，仍可使用质谱检测器进行选择分析。

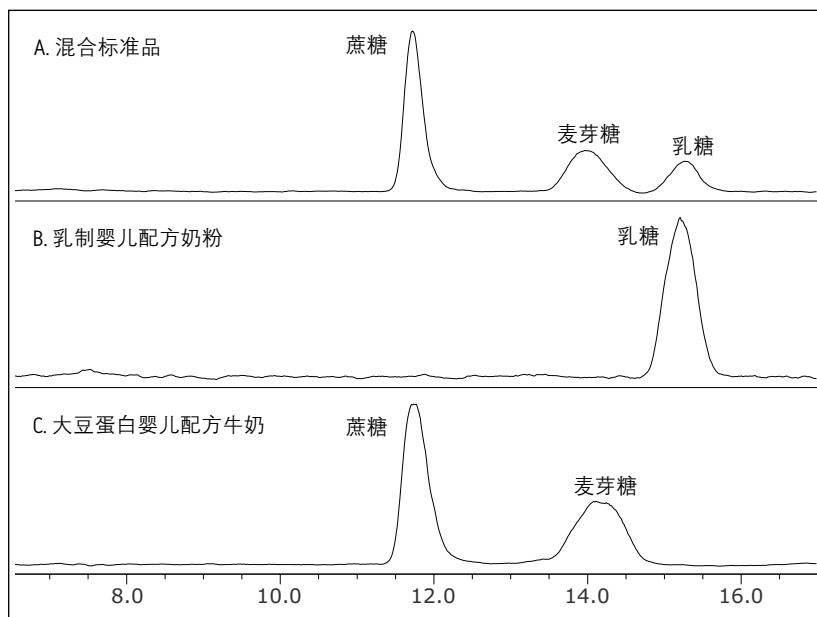


图3. m/z 377的SIR色谱图：A. 20 ppm的糖类标准品、B. 乳制婴儿配方奶粉和C. 大豆蛋白婴儿配方奶粉。

结论

食品样品混合了紫外吸收相似度很高的化合物，这对碳水化合物化合物的分析极具挑战性。将ACQUITY UPLC H-Class系统和ACQUITY QDa检测器联用的UPLC®分离方法为科研人员带来了高分离度、灵敏度和高通量，并且为RI和ELS提供了补充性质谱检测器，实现了更多优势：

- 通过将保留时间和质量分析相结合，改善化合物鉴定的分析选择性。
- 利用灵敏且选择性佳的检测器对有紫外吸收的分子进行检测。
- 能够通过荷质比区分共洗脱组分。
- 无需对全部组分进行基线分离，为方法开发减轻了负担。
- 能够在单一系统上采用多种方法，并在不同的方法条件之间快速转换。

参考文献

1. L C Nogueiraa, F Silvab, I M P L V O Ferreirab, L C Trugoa. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chrom A*. 1065 (2): 207-210, February 2005.
2. I M P L V O Ferreira, A M P Gomes, M A Ferreira. Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydr Polym*. 37 (3): 225-229, 1998.
3. J L Chávez-Servín, A I Castellote, M C López-Sabater. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J Chrom A*. 1043 (2): 211-215, 2004.
4. E Rogatsky, H Jayatilake, G Goswami, V Tomuta, D Stein. Sensitive LC-MS Quantitative Analysis of Carbohydrates by Cs+ Attachment. *JASMS*. 16 (11): 1805-1811, 2005.
5. H E Indyk, D C Woollard. Determination of free myo-inositol in milk and infant formula by high-performance liquid chromatography. *Analyst*. 119: 397-402, 1994.
6. M Kizito, E Iheanacho. Comparative Studies of the Nutritional Composition of Soy Bean (glycine max) and Lima Bean (phaseolus lunatus). *Scientia Africana*. 9 (2): 29-35, 2010.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, ACQUITY, QDa, UPLC, Sep-Pak和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014 年沃特世公司。印制于中国。2014年4月 720005035ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com