

亲水色谱-蒸发光散射 检测器-电喷雾-四级杆-飞行时间 串联质谱法测定低聚麦芽糖化学成分

赵志国^{1,2}, 张敏敏^{1,2}, 尹 郑³, 贾慧慧³, 刘 倩^{1,2}, 李克文³, 赵恒强^{1,2,*}, 王 晓^{1,2,*}

(1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)山东省分析测试中心, 山东济南 250014;

2. 齐鲁工业大学(山东省科学院)药学院, 山东济南 250014;

3. 山东保龄宝生物股份有限公司, 山东禹城 251200)

摘要:建立亲水色谱-蒸发光散射检测器-电喷雾-四级杆-飞行时间串联质谱(HILIC-ELSD-ESI-Q-TOF/MS)技术用于工业低聚麦芽糖中化学成分的快速鉴别及其含量测定的方法。以低聚麦芽糖为研究对象,采用 HILIC 法对低聚麦芽糖进行快速分离,ESI-Q-TOF/MS 法对多种化合物进行鉴别,依据其精确分子质量、MS/MS 裂解特征、色谱保留行为等信息,结合对照品信息和文献报道等对其进行验证,并采用 HILIC-ELSD 对已知成分进行定量测定。结果表明,采用亲水色谱法进行测定,低聚麦芽糖中各成分分离度较好;应用 ESI-Q-TOF/MS 鉴定出工业低聚麦芽糖中的 10 种成分;其中 7 种化合物(葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖)回归方程的相关系数均优于 0.9990,表明线性关系良好;平均回收率在 95.66%~99.00% 范围内,相对标准偏差在 1.11%~4.93% 范围内;检出限在 0.004~0.070 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,定量限在 0.013~0.233 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间。对 7 种成分定量测定表明,麦芽七糖的含量(14.31%±0.13%)最高,其次为麦芽三糖(9.34%±0.14%),麦芽六糖(7.49%±0.09%)。麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖的总含量则达到了 43.39%±0.35%。该方法分离度好、灵敏度高,可以对多种不同聚合度低聚麦芽糖成分进行定性和定量分析,为低聚麦芽糖工业化生产及应用的质量控制提供了一种分析方法支持。

关键词:超高效液相色谱,亲水色谱,电喷雾-四级杆-飞行时间质谱,低聚麦芽糖

Determination of Multiple Components in Maltooligosaccharide by HILIC-ELSD-ESI-Q-TOF/MS

ZHAO Zhiguo^{1,2}, ZHANG Minmin^{1,2}, YIN Zheng³, JIA Huihui³,
LIU Qian^{1,2}, LI Kewen³, ZHAO Hengqiang^{1,2,*}, WANG Xiao^{1,2,*}

(1. Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China;

3. Shandong Baolingbao Biotechnology Co., Ltd., Yucheng 251200, China)

Abstract: A rapid identification and determination method of chemical components in industrial maltooligosaccharide was established by HILIC-ELSD-ESI-Q-TOF/MS technology. Taking maltooligosaccharide as the research object, the rapid separation of maltooligosaccharide was carried out by HILIC method, and a variety of compounds were identified by ESI-Q-TOF/MS method. Based on the accurate molecular weight, MS/MS fragmentation characteristics, chromatographic retention behavior and other information, combined with reference material information and literature reports, the known components were quantitatively determined by HILIC-ELSD. The results showed that the separation of the components in maltooligosaccharide was good by hydrophilic chromatography. Ten components in maltooligosaccharides were identified by ESI-Q-TOF/MS, the correlation coefficients of the regression equations of the seven compounds (glucose, maltose, maltotriose, malttetrasaccharide, maltpentasaccharide, malthexose, maltohexaose) were all better than 0.9990, indicating a good linear relationship. The average recoveries were in the range from 95.66% to 99.00% with relative standards deviation between 1.11% and 4.93%. The limits of

收稿日期:2020-06-04

作者简介:赵志国(1990-),男,本科,研究实习员,研究方向:食品及天然产物分析研究,E-mail:1258627865@qq.com。

* 通信作者:赵恒强(1980-),男,博士,副研究员,研究方向:食品及天然产物分析研究,E-mail:hqzhao2007@163.com。

王晓(1971-),男,博士,研究员,研究方向:食品及天然产物质量标准,E-mail:wxjn1998@126.com。

基金项目:山东省重点研发计划(医用食品)(2018YYSP012);山东省重点研发计划(2019GSF108062,2019GSF108035);山东省泰山学者岗位资助(郭兰萍);山东省科学院先导专项(郭兰萍)。

detection ranged from 0.004 to 0.070 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and limit of quantitation between of 0.013 ~ 0.233 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The quantitative determination of seven components showed that the content of maltose was the highest (14.31% \pm 0.13%), followed by maltotrisaccharide (9.34% \pm 0.14%) and maltohexose (7.49% \pm 0.09%). The total contents of maltose, maltotrisaccharide, maltotrisaccharide, maltopentose, maltohexose and maltoheptoglycose reached 43.39% \pm 0.35%. The method had good resolution and high sensitivity, and could be used for qualitative and quantitative analysis of maltose with different degree of polymerization. It provides an analytical method support for the industrial production and application of maltooligosaccharides.

Key words: UPLC, HILIC, ESI-Q-TOF/MS, maltooligosaccharide

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)06-0265-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060030

引文格式: 赵志国, 张敏敏, 尹郑, 等. 亲水色谱-蒸发光散射检测器-电喷雾-四级杆-飞行时间串联质谱法测定低聚麦芽糖化学成分[J]. 食品工业科技, 2021, 42(6): 265-270, 309.

ZHAO Zhiguo, ZHANG Minmin, YIN Zheng, et al. Determination of Multiple Components in Maltooligosaccharide by HILIC-ELSD-ESI-Q-TOF/MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6): 265-270, 309. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

低聚麦芽糖是葡萄糖基以 α -(1 \rightarrow 4) 糖苷键连接而成, 在解枝酶如异淀粉酶、支链淀粉酶的作用下水解淀粉产生的不同链长低聚麦芽糖^[1], 这些 α -淀粉酶具有不同的反应特性, 因此可以生产出不同链长和不同低聚麦芽糖含量的糖浆。研究表明, 低聚麦芽糖具有抑制肠道内细菌和有害菌生长、改善肠道内菌群、延长人体供能、快速强化机体耐力、提高机体免疫力、降低胆固醇和血脂等功效^[2]。另外, 低聚麦芽糖具有甜度低、口感好、保湿性好等特点, 近年来已在饮料、果冻、糖果、冰淇淋、糕点、焙烤食品、婴儿奶粉等中得到广泛应用^[3]。

目前, 关于糖含量的测定方法主要有纸色谱法、薄层色谱法、液相色谱法、气相色谱法和高效凝胶渗透色谱法等^[4-9]。纸色谱法和薄层色谱法精密度差, 不能准确定量, 且分析时间长。气相色谱法需要进行衍生后再分析, 操作较繁琐, 重复性比较差。HPLC 法较其它方法简单、快速, 是当前应用较多的方法。近年来, 麦芽糖的分析测定国内外报道较少^[10-12], GB/T 20883-2017 中提供了麦芽糖的分析方法, 但仅仅对麦芽糖总量进行了分析。低聚麦芽糖的组成分布和含量, 是评判麦芽低聚糖产品质量的重要指标。同时, 不同类型食品、保健品中添加的低聚麦芽糖的分析测定亦缺乏有效的分析质控方法。因此, 开展低聚麦芽糖的分析测定方法研究, 对提高低聚麦芽糖及相关产品的质量水平具有重要意义。

近年来, 亲水色谱技术以极性分离材料为固定相, 对糖类成分的分离表现出良好的效果^[13-16], 且与质谱有很好的兼容性。电喷雾飞行时间质谱技术能够提供目标化合物的精确分子量信息和多级碎片信息, 可以在没有标准品的情况下推断化合物的分子式^[17-20]。

本研究以工业生产的低聚麦芽糖样品为研究对象, 建立亲水色谱-蒸发光检测器-电喷雾飞行时间串联质谱技术分析测定低聚麦芽糖产品中低聚糖种类和含量的方法, 以期对低聚麦芽糖工业产品及其在食品领域的应用提供分析质控方法支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

对照品: 葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、

麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖 对照品纯度均大于 98% 上海源叶生物科技有限公司; 乙腈 色谱纯, 瑞典 Oceanpak; 乙酸铵 色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 其余试剂均为分析纯; 低聚麦芽糖样品 由保龄宝生物股份有限公司提供。

Bruker Impact II ESI-TOF-MS 质谱仪 德国布鲁克公司; Waters ACQUITY H-Class 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; Milli-Q (18.2 M Ω) 超纯水处理系统 德国 Millipore 公司; 万分之一电子分析天平 德国 Sartorius 公司; SBL-10DT 型恒温超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的配制

1.2.1.1 单个对照品溶液的配制 分别精密称取葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖对照品适量, 精密称定, 各置于 10 mL 容量瓶中, 加乙腈: 水 = (80: 20, V/V) 适量, 使其溶解并定容至刻度, 作为标准储备液。

1.2.1.2 混合对照品溶液的配制 分别精密称取葡萄糖 1.2 mg、麦芽糖 1.4 mg、麦芽三糖 2.4 mg、麦芽四糖 1.3 mg、麦芽五糖 1.4 mg、麦芽六糖 2.2 mg、麦芽七糖 4.2 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加乙腈: 水 = (80: 20, V/V) 适量, 使其溶解并定容至刻度, 作为混合标准储备液。

1.2.2 样品溶液的制备 精密称取低聚麦芽糖 200 mg, 置于 100 mL 容量瓶中, 加乙腈: 水 = (80: 20, V/V) 适量, 使其溶解并定容至刻度, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得, 备用。

1.2.3 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC Amide 柱 (3.0 mm \times 100 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为 10 mmol/L 乙酸铵水溶液, 流动相 B 为乙腈流速 0.4 mL/min, 柱温 45 $^{\circ}\text{C}$ 。ELSD 检测参数: 气体源为 N_2 , 压力 40 Psi, 漂移管温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 雾化器功率 80%, 梯度洗脱程序为 T: 0~40 min, B%: 85%~50%。

1.2.4 质谱条件 高分辨飞行时间质谱电喷雾正、负离子模式; 质量扫描范围 m/z 100~4000; 毛细管电压: 2.5 kV; 喷雾气压: 2.0 Bar; 干燥气流速: 8.0 L/min; 干燥气温度: 200 $^{\circ}\text{C}$; 碰撞能量: 8.0 eV; 传输时间:

300.0 μ s。

1.3 数据处理

实验数据分别采用 Excel 2010 和 Origin 7.5 软件进行处理和绘图分析。MS/MS 方法数据的分析在 Bruker Impact II ESI-TOF-MS 质谱仪软件上进行处理。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

寡糖类成分的极性较强,在普通 C_{18} 色谱柱上难以保留。考察了三种不同类型亲水柱 MERCK ZIC-HILIC (A)、WATERS Xbridge HILIC (B)、WATERS Xbridge Amide (C) 对样品的分离效果,结果如图 1。结果表明,采用 WATERS Xbridge Amide 色谱柱,各化学成分分离较好,能够达到基线完全分离,因此选择 WATERS Xbridge Amide 色谱柱用于进一步研究。

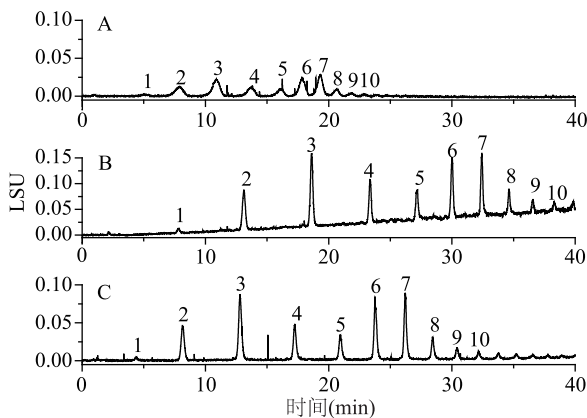


图1 不同类型色谱柱的色谱图

Fig.1 Chromatogram of different types of columns

注 A: MERCK ZIC-HILIC; B: WATERS Xbridge HILIC;

C: WATERS Xbridge Amide; 1: 葡萄糖; 2: 麦芽糖; 3: 麦芽三糖;

4: 麦芽四糖; 5: 麦芽五糖; 6: 麦芽六糖; 7: 麦芽七糖;

8: 麦芽八糖; 9: 麦芽九糖; 10: 麦芽十糖; 图2、图5同。

考察了流动相类型和缓冲盐浓度等对亲水色谱分离效果的影响,结果表明,采用乙腈-水体系,梯度洗脱,各化合物分离较好。考察了缓冲盐浓度(0、5、10、15 mmol/L)对色谱峰型的影响(见图2),结果发现,缓冲盐浓度增加,色谱峰保留时间增加,这可能是随着离子强度增加,目标物与色谱填料表面液膜层发生离子交换作用增强,目标物的保留和分离效果相应增强,同时部分色谱峰强度略有增加趋势,当选择 10 mmol/L 乙酸铵作为流动相 A 时各化合物色谱峰对称性较好,峰型尖锐。

2.2 色谱峰的质谱定性分析

首先,选择全扫描模式分别以正、负离子模式进行一级质谱扫描。通过对比,发现低聚麦芽糖在负离子模式下质谱响应较强,在正离子模式下几乎没有响应,故实验选择负离子模式对低聚麦芽糖进行质谱分析。为获得更丰富的质谱信息,增强质谱定性的可靠性,分别采用全扫描和二级离子扫描模式对各个色谱峰进行质谱鉴定分析。首先,在负离子模式(ESI⁻)下进行全扫描分析,确定出母离子。然后给予一定的碰撞能量和碰撞气体,进行二级离子

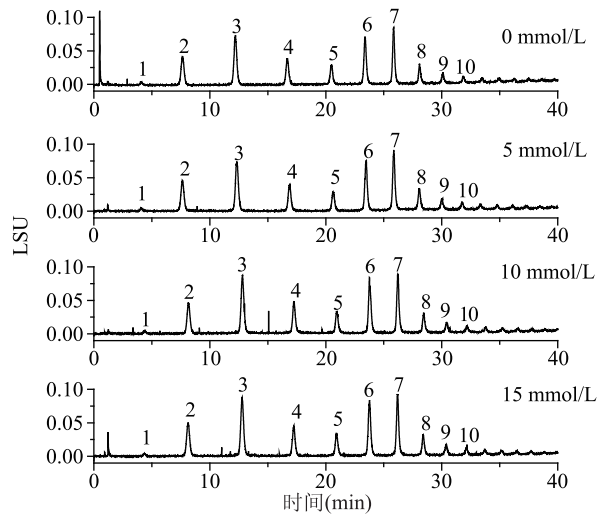


图2 缓冲盐浓度的影响

Fig.2 Effect of salt concentration

扫描。碰撞能量过高,由母离子生成的碎片过多,子离子响应过低;碰撞能量过低时,则不能生成所需的子离子。本研究通过优化裂解电压和碰撞能量,以获取丰度较强、干扰较小的子离子。对于有对照品的化合物(峰1~峰7),根据其母离子、子离子的精确分子量信息并结合对照品进行准确鉴别;对于没有对照品的化合物(峰8~峰10),根据其母离子、子离子的精确分子量信息并结合其裂解规律进行初步鉴别。结果如表1所示。

初步分析表明,低聚麦芽糖易形成稳定的 $[M-H]^-$ 离子峰,相邻寡糖之间相差一个分子质量为 162 ($C_6H_{10}O_5$) 的六碳糖。下面以峰7为列,介绍各化合物的鉴别过程(峰7的一级和二级质谱图见图3)。在负离子全扫描模式下,峰7产生准分子离子峰 m/z 1151.3745 $[M-H]^-$ 和 1187.3430 $[M+CL]^-$,推断可能分子式为 $C_{42}H_{72}O_{36}$ 。进一步通过二级离子扫描分析,发生糖苷键断裂,母离子丢失糖残基 $[M-H-(C_6H_{10}O_5)_n]^-$ (丢失 162u),形成 m/z $[M-H-(C_6H_{10}O_5)]^-$ 989.3114、 $[M-H-(C_6H_{10}O_5)_2]^-$

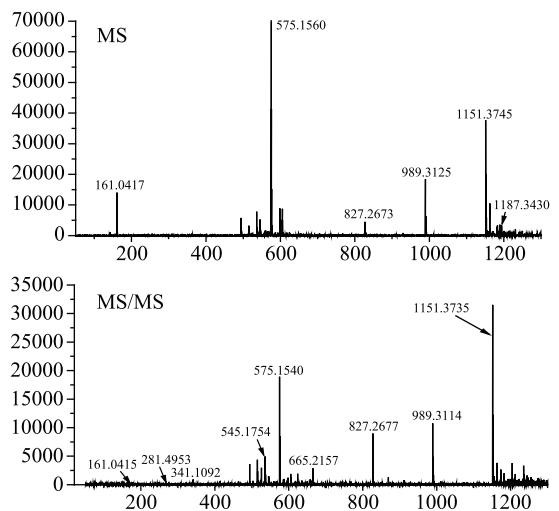


图3 峰7的MS和MS/MS质谱图

Fig.3 MS and MS/MS spectra of peak 7

表1 化合物的ESI-TOF/MS精确质量测量结果
Table 1 ESI-TOF/MS accurate mass measurements of compounds

峰号	化合物	分子式	m/z	[M-H] ⁻	[M+CL] ⁻	[2M-H] ⁻	[M-2H] ²⁻	MS/MS
1	葡萄糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.0634	179.0558	215.0333	359.1198		[M-H-60] ⁻ 119.0351
2	麦芽糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.1156	341.1092	377.0858	683.2257		[M-H-60] ⁻ 281.4931, [M-H-120] ⁻ 221.0649, [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁻ 161.0417
3	麦芽三糖	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504.1684	503.1621	539.1390	1007.3265		[M-H-60] ⁻ 443.1412, [M-H-120] ⁻ 383.1200, [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 341.1091, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₂ -H ₂ O] ⁻ 161.0435
4	麦芽四糖	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	666.2213	665.2157	701.1930	1331.4367		[M-H-60] ⁻ 605.1953, [M-H-120] ⁻ 545.1740, [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 503.1633, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₂] ⁻ 341.1096 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 665.2158,
5	麦芽五糖	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	828.2741	827.2673	863.2443	1655.5437		[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -120] ⁻ 545.1737, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₂] ⁻ 503.1629, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₃] ⁻ 341.1089 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 827.2694,
6	麦芽六糖	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁	990.3269	989.3125	1025.2980			[M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₂] ⁻ 665.2164, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₃] ⁻ 503.1625, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₄] ⁻ 341.1091 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 989.3114, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₂] ⁻ 827.2677, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₃] ⁻ 665.2157,
7	麦芽七糖	C ₄₂ H ₇₂ O ₃₆	1152.3797	1151.3745	1187.3430		[M-2H] ²⁻ 575.1560	[M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₃ -60] ⁻ 605.1913, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₃ -120] ⁻ 545.1754, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₅] ⁻ 341.1092, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₅ -60] ⁻ 281.4953, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₆ -H ₂ O] ⁻ 161.0415 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 1151.3755, [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₂] ⁻ 989.3126,
8	麦芽八糖	C ₄₈ H ₈₂ O ₄₁	1314.4326	1313.4255	1349.4001		[M-2H] ²⁻ 656.1799	[M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₃] ⁻ 827.2693, [M-2H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ²⁻ 575.1547 [M-H-(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₅] ⁻ 341.1090
9	麦芽九糖	C ₅₄ H ₉₂ O ₄₆	1476.4854	1475.4743	1511.4535		[M-2H] ²⁻ 737.2378	[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 1313.4264, [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 1151.3752
10	麦芽十糖	C ₆₀ H ₁₀₂ O ₅₁	1638.5382	1637.5341	1673.5037		[M-2H] ²⁻ 818.2637	[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ 1475.4758

827.2677、[M-H-(C₆H₁₀O₅)₃]⁻ 665.2157、[M-H-(C₆H₁₀O₅)₅]⁻ 341.1092等碎片离子;或在丢失葡萄糖残基的基础上脱水[M-H-(C₆H₁₀O₅)_n-H₂O]⁻(丢失180 u),形成碎片离子 m/z[M-H-(C₆H₁₀O₅)₆-H₂O]⁻ 161.0415,或者[M-H]⁻母离子发生开环断裂,丢失60 u,产生 m/z[M-H-(C₆H₁₀O₅)₃-60]⁻ 605.1913、[M-H-(C₆H₁₀O₅)₅-60]⁻ 281.4953;此外,[M-H]⁻母离子也发生了2,4开环断裂,丢失120 u,产生碎片离子 m/z[M-H-(C₆H₁₀O₅)₃-120]⁻ 545.1754。进一步结合标准对照品的保留时间和质谱断裂规律等信息,可准确鉴定为麦芽七糖。

在负离子全扫描模式下,峰8产生准分子离子峰 m/z[M-H]⁻ 1313.4255、[M+CL]⁻ 1349.4001和[M-2H]²⁻ 656.1799,推断可能分子式为C₄₈H₈₂O₄₁,通过二级离子扫描分析,出现以下碎片离子:[M-H-(C₆H₁₀O₅)]⁻ 1151.3755、[M-H-(C₆H₁₀O₅)₂]⁻ 989.3126、[M-H-(C₆H₁₀O₅)₃]⁻ 827.2693、[M-2H-C₆H₁₀O₅]²⁻ 575.1547、[M-H-(C₆H₁₀O₅)₆]⁻

341.1090,也符合上述裂解规律(峰8的一级和二级质谱图见图4)。进一步结合色谱峰出峰顺序,初步推断为麦芽八糖。

2.3 质谱鉴别

在优化的亲水色谱分离条件下,采用亲水色谱-电喷雾飞行时间质谱联用技术对低聚麦芽糖中各色谱峰进行分析。根据化合物在负离子模式下产生的母离子、子离子的精确分子量信息,结合对照品和参考文献,分别对其进行定性鉴别。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系的考察 各吸取一定体积的7种对照品溶液,混合于同一容量瓶中,逐级稀释,配成不同浓度的混合标准液,按“1.2.3”项下色谱条件进样分析,测定各化合物的峰面积,以各化合物浓度(μg/mL)的对数为横坐标,以峰面积的对数为纵坐标,绘制标准曲线,并求得回归方程。结果见表2。

由表2可以看出,7种化合物的回归方程的相关系数均优于0.9990,线性关系良好。将标准溶液稀释

表2 化合物分析回归方程、线性范围及检测限、定量限测定结果

Table 2 Results of compounds UPLC analysis of the regression equation, linear range and detection limit, limit of quantification

峰号	化合物	回归方程	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 (r)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
1	葡萄糖	$y = 1.6668x - 0.0438$	7.50~120.00	0.9994	0.004	0.013
2	麦芽糖	$y = 1.5434x + 0.1650$	8.75~140.00	0.9997	0.005	0.015
3	麦芽三糖	$y = 1.5969x - 0.2461$	10.00~240.00	0.9999	0.009	0.029
4	麦芽四糖	$y = 1.7666x - 0.2723$	8.13~130.00	0.9998	0.005	0.017
5	麦芽五糖	$y = 1.9274x - 0.7613$	8.75~140.00	0.9994	0.008	0.027
6	麦芽六糖	$y = 2.3344x - 1.7463$	13.75~220.00	0.9995	0.010	0.034
7	麦芽七糖	$y = 2.7032x - 3.3334$	17.50~420.00	0.9992	0.070	0.233

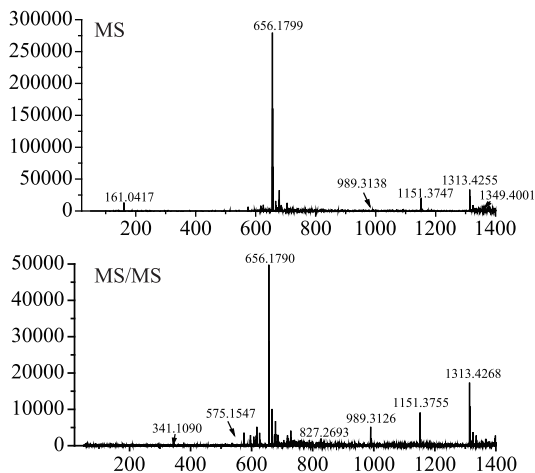


图4 峰8的MS和MS/MS质谱图

Fig.4 MS and MS/MS spectra of peak 8

至低浓度进样,以3倍信噪比计算各成分的检测限(0.004~0.079 $\mu\text{g/mL}$),以10倍信噪比计算各成分的定量限(0.013~0.233 $\mu\text{g/mL}$),7种化合物的检测限在0.004~0.070 $\mu\text{g/mL}$ 之间,说明该方法灵敏度较高。在优化的色谱条件下,混合对照品及样品色谱图如图5所示。

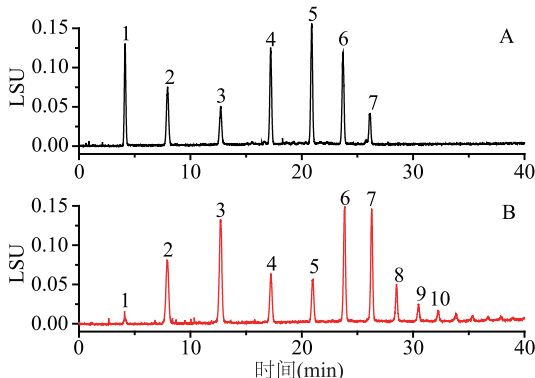


图5 混合对照品(A)和样品(B)的HILIC-ELSD色谱图

Fig.5 HILIC-ELSD chromatogram of mixed standards(A) and sample(B)

2.4.2 精密度试验 按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液,连续进样6次,分别计算化合物的保留时间和峰面积的RSD,结果葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖7个化合物保留时间的RSD分别为0.40%、0.50%、0.45%、0.43%、0.30%、0.29%、0.30%,峰面积的RSD分别为2.91%、

3.56%、0.83%、3.25%、3.29%、3.08%、3.20%。结果表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液6份,依法测定,并计算样品中7个化合物的保留时间和峰面积的RSD,结果葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖7个化合物保留时间的RSD分别为0.35%、0.40%、0.49%、0.24%、0.20%、0.18%、0.14%,峰面积的RSD分别为3.98%、3.18%、3.93%、1.97%、1.57%、3.32%、2.13%。结果表明方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 按“1.2.2”项下方法制备样品溶液,于0、2、4、8、16、24 h分别进样,依法测定,分别记录保留时间和峰面积,计算RSD,结果葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖保留时间的RSD分别为0.74%、0.87%、0.78%、0.79%、0.32%、0.33%、0.36%,峰面积的RSD分别为3.71%、2.63%、2.45%、2.28%、2.73%、2.72%、2.44%,表明供试品溶液中的7个成分在24 h内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 取同一批已知含量的低聚麦芽糖样品适量,精密称定,分别以低、中、高3个浓度水平,准确加入一定量的7种化合物对照品,进样测定,计算回收率,结果见表3。平均回收率在95.66%~99.00%之间,相对标准偏差在1.11%~4.93%之间,显示本方法准确度良好。

2.5 样品测定

在本研究建立的色谱条件下,采用“1.2.2”项下供试品溶液制备方法制备样品溶液,采用“1.2.3”项下色谱条件进样分析,获得7个化合物的色谱峰面积,将测得结果带入表2线性回归方程,计算样品中各化合物的含量,结果如表4所示。

从表4中可以看出,低聚麦芽糖中麦芽七糖的含量最高,为 $14.31\% \pm 0.13\%$,其次为麦芽三糖 $9.34\% \pm 0.14\%$,麦芽六糖 $7.49\% \pm 0.09\%$,麦芽糖、麦芽五糖和麦芽四糖的含量接近,而葡萄糖的含量最低,仅为 $0.80\% \pm 0.02\%$ 。麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖的总含量则达到了 $43.39\% \pm 0.35\%$ 。

3 结论

本研究建立的HILIC-ELSD-ESI-Q-TOF/MS分析测定低聚麦芽糖工业产品的方法,分离度好、灵敏度高,根据高分辨飞行时间质谱技术给出的母离

表3 加样回收率试验
Table 3 Results of recovery test

化合物	原始量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加入量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
葡萄糖	8.11	6.00	13.71	97.17	98.23	3.13
	8.11	8.40	15.82	95.82		
	8.11	9.60	18.01	101.69		
麦芽糖	44.45	35.00	78.22	98.46	97.85	1.11
	44.45	44.80	87.90	98.49		
	44.45	53.20	94.32	96.59		
麦芽三糖	93.14	73.60	160.23	96.10	99.00	3.30
	93.14	92.80	182.91	98.37		
	93.14	112.00	210.33	102.53		
麦芽四糖	36.17	28.60	61.38	94.77	96.04	1.16
	36.17	36.40	70.27	96.83		
	36.17	42.90	76.32	96.53		
麦芽五糖	43.42	33.60	74.24	96.39	98.36	4.93
	43.42	43.40	82.31	94.80		
	43.42	53.20	100.37	103.88		
麦芽六糖	75.04	60.50	129.18	95.31	97.85	4.91
	75.04	77.00	144.21	94.85		
	75.04	93.50	174.25	103.39		
麦芽七糖	143.73	113.40	243.22	94.59	95.66	1.15
	143.73	142.80	277.31	96.78		
	143.73	170.80	300.73	95.61		

表4 7个化合物含量测定结果(%) (n=6)
Table 4 Contents of 7 compounds(%) (n=6)

化合物	1	2	3	4	5	6	含量(%)
葡萄糖	0.81	0.81	0.80	0.82	0.77	0.78	0.80 \pm 0.02
麦芽糖	4.44	4.45	4.36	4.52	4.33	4.49	4.43 \pm 0.08
麦芽三糖	9.31	9.54	9.21	9.26	9.19	9.45	9.34 \pm 0.14
麦芽四糖	3.62	3.55	3.68	3.59	3.56	3.60	3.60 \pm 0.05
麦芽五糖	4.34	4.19	4.25	4.18	4.20	4.24	4.23 \pm 0.06
麦芽六糖	7.50	7.63	7.43	7.54	7.41	7.43	7.49 \pm 0.09
麦芽七糖	14.37	14.50	14.36	14.26	14.14	14.23	14.31 \pm 0.13
麦芽糖总含量	43.59	43.87	43.29	43.35	42.83	43.45	43.39 \pm 0.35

子和子离子的精确分子量信息,结合标准对照品对各种低聚麦芽糖类成分进行了准确的定性分析,并且可以对没有标准品的成分进行初步定性鉴别。研究结果为低聚麦芽糖生产企业质量控制和质检部门进行市场监管提供了分析方法支持。同时也为相关食品、保健品等中添加营养麦芽低聚糖的质量检测提供了分析方法参考。

参考文献

- [1] 杨洋,王卫国.功能性低聚糖在饲料工业中的应用[J].广东饲料,2002,11(3):29-31.
[2] 杨海军,李发财,袁伟涛.低聚麦芽糖在固体饮料中的应用[J].食品安全导刊,2011(12):50.
[3] 马莺,王明丽.低聚糖的生产及应用[J].中国食品工业,2001(3):30-31.
[4] 杨彬君,易骏,龚业滔,等.GC-MS分析牛樟芝多糖的单糖

- 组成及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2019,40(12):85-89.
[5] 何连军,干雅平,吕伟德,等.高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定多花黄精多糖的单糖组成[J].中草药,2017,48(8):1671-1676.
[6] Yan J, Shi S S, Wang H W, et al. Neutral monosaccharide composition analysis of plant-derived oligo- and polysaccharides by high performance liquid chromatography [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 1273-1280.
[7] Liu J, Zhou J, Zhang Q Q, et al. Monosaccharide analysis and fingerprinting identification of polysaccharides from *Poria cocos* and *Polyporus umbellatus* by HPLC combined with chemometrics methods [J]. Chinese Herbal Medicines, 2019, 11(4): 406-411.
[8] 赵宏,柴桂芳,王秋红,等.一种车前子多糖的分离纯化及单糖组成分析[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(19):

(下转第309页)

- [5] 吴娜, 孙智达. 艾蒿黄酮体外抗氧化活性及对 DNA 氧化损伤的保护研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 47-50.
- [6] 熊子文. 野艾蒿的化学组成及抗氧化、抑菌活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2011.
- [7] 尹彬彬. 艾叶有效成分的提取及生物活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2015.
- [8] 胡厚才, 谢建光, 丘丽凤, 等. 蒿属植物在胃肠道疾病防治中的药理作用及其机制研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(3): 304-308.
- [9] Yun C Y, Jung Y, Chun W, et al. Anti-inflammatory effects of *Artemisia* leaf extract in mice with contact dermatitis *in vitro* and *in vivo*[J]. *Mediators of Inflammation*, 2016, 2016: 8027537.
- [10] Li Y Y, Wu H, Dong Y G, et al. Application of eupatilin in the treatment of osteosarcoma[J]. *Oncology Letters*, 2015, 10(4): 2505-2510.
- [11] 杨宇. 艾蒿抑菌成分的分离提取及其功效研究[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2013.
- [12] 侯迎迎. 艾叶乙酸乙酯部位抗乙肝病毒活性研究及成分分析[D]. 郑州: 郑州大学, 2013.
- [13] 吴芳. 艾叶 EA 部位抗 HBV 活性成分分析[D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [14] 袁燕, 崔雪惠, 张立夏, 等. 乌榄叶黄酮类化合物体内外抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(7): 46-54.
- [15] 包麒麟, 王丹, 陆葵青, 等. 桂花黄酮类化合物体内外抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(21): 14-20.
- [16] 金司仪, 张凡, 曹艳. 3 种常用防腐剂对秀丽隐杆线虫毒性作用的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 905-909.
- [17] Wang Q Q, Yang F, Guo W, et al. *Caenorhabditis elegans* in Chinese medicinal studies; making the case for aging and neurodegeneration [J]. *Rejuvenation Research*, 2014, 17(2): 205-208.
- [18] Jin S Y, Li D Q, Lu S, et al. Ethanol extracts of *Panax notoginseng* increase lifespan and protect against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* via the insulin/IGF-1 signaling pathway[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 58: 218-226.
- [19] 蔡敏. 响应曲面法优化超声波辅助提取艾叶中总黄酮的工艺研究[J]. 山西化工, 2018, 38(6): 7-10, 22.
- [20] 孙艳, 崔旭盛, 刘静, 等. 酸枣叶黄酮的提取工艺优化及其抗秀丽隐杆线虫氧化损伤活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(8): 143-150.
- [21] 吴娜. 艾蒿黄酮的提取分离纯化、结构鉴定及其抗氧化性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [22] 周宁, 赵晓璐, 屈潇毅, 等. 超声辅助提取甘蔗叶总黄酮与还原力的测定[J]. 应用化工, 2016, 45(10): 1883-1886, 1890.
- [23] 郑丽杰, 缪晓冬, 韩威, 等. 铜藻主要化学成分分析及抗氧化活性评价[J/OL]. 食品工业科技: 1-10 [2020-07-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200520.1704.008.html>.
- [24] Xiao S, Zhang Y Q, Xie J B, et al. Ultrasonic-assisted extraction of squalene and vitamin E based oil from *Zizyphi Spinosae Semen* and evaluation of its antioxidant activity [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2018, 12(4): 2844-2854.
- [25] Chen W, Lin H R, Wei C M, et al. Echinacoside, a phenylethanoid glycoside from *Cistanche deserticola*, extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* and protects from A β -induced toxicity[J]. *Biogerontology*, 2018, 19(1): 47-65.
- [26] 黄显章, 康利平, 高丽, 等. 基于古代本草记载的不同产地艾叶中棕矢车菊素和异泽兰黄素的含量研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3504-3508.
- [27] Zhao P, Li X, Wang Y, et al. Characterisation and saccharide mapping of polysaccharides from four common *Polygonatum* spp [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 233: 115836.
- [28] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 20883-2017 麦芽糖[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [29] 吴红京, 唐根源, 李志达, 等. 高效液相色谱测定麦芽低聚糖的组分[J]. 色谱, 1994, 12(4): 289-290.
- [30] 林家永. 异麦芽低聚糖含量测定方法的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(6): 351-353, 387.
- [31] 阳曦, 刘玮. 亲水作用色谱-串联质谱法测定婴幼儿乳粉中的牛磺酸[J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 225-228, 259.
- [32] Cao C Y, Wang L L, Wang L L, et al. A strategy to identify mixed polysaccharides through analyzing the monosaccharide composition of disaccharides released by graded acid hydrolysis [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 223: 115046.
- [33] 梁图, 傅青, 辛华夏, 等. 基于部分酸水解-亲水作用色谱-质谱的黄芪多糖结构表征[J]. 色谱, 2014, 32(12): 1306-1312.
- [34] Gao Y Y, Jiang Y, Chen G C, et al. A sensitive and rapid UPLC-MS/MS method for determination of monosaccharides and anti-allergic effect of the polysaccharides extracted from *saposhnikovia Radix*[J]. *Molecules*, 2018, 23(8): 1924.
- [35] Allison C L, Lutzke A, Reynolds M M. Identification of low molecular weight degradation products from chitin and chitosan by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Carbohydrate Research*, 2020, 493: 108046.
- [36] Li C T, Seeram N P. Ultra-fast liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid phenolic profiling of red maple (*Acer rubrum*) leaves[J]. *Journal of Separation Science*, 2018, 41(11): 2331-2346.
- [37] Xi X J, Xiao S Z, Tang F, et al. Monosaccharide analysis of dendrobium moniliforme polysaccharides by High Performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2016, 4(6): 2331-2346.
- [38] Liang Y T, Zhou J H, Nan T G, et al. Analysis of monosaccharide composition of twelve polysaccharides by pre-column derivatization procedure UPLC-MS/MS [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2018, 43(22): 4469-4473.

(上接第 270 页)
97-100.