食品中乳酮糖之檢驗方法
Method of Test for Lactulose in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於特殊營養食品及益生菌粉產品中乳酮糖(lactulose)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)分析之方法。
   2.1. 裝置：
      2.1.1. 高效液相層析儀：
         2.1.1.1. 檢出器：折射率檢出器(refractive index detector)。
         2.1.1.2. 層析管：ACQUITY UPLC BEH Amide，1.7 μm，內徑2.1 mm × 10 cm，或同級品。
      2.1.2. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
      2.1.3. 旋渦混合器 (Vortex mixer)。
      2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達5000 ×g以上者。
   2.2. 試藥：乙腈採用液相層析級；乙醇、三乙胺(triethylamine)、亞鐵氰化鉀(potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$)及硫酸鋅(zinc sulfate heptahydrate, $ZnSO_4.7H_2O$)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上)；乳酮糖對照用標準品。
   2.3. 器具及材料：
      2.3.1. 容量瓶：25 mL。
      2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。
      2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm，PVDF材質。
   2.4. 試劑之調製：
      2.4.1. 80%乙腈溶液：
         取乙腈800 mL，加入去離子水使成1000 mL。
      2.4.2. 50%乙醇溶液：
         取乙醇500 mL，加入去離子水使成1000 mL。
      2.4.3. Carrez I試劑：
         稱取亞鐵氰化鉀0.72 g，以去離子水溶解使成10 mL。
      2.4.4. Carrez II試劑：

稱取硫酸鋅1.44 g，以去離子水溶解使成10 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

取三乙胺2 mL，加80%乙腈溶液使成1000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

取乳酮糖對照用標準品約0.5 g，精確稱定，以50%乙醇溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷藏儲存。臨用時取適量標準原液，以50%乙醇溶液稀釋至0.1～5 mg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將檢體混勻，取約1 g，精確稱定，加入50%乙醇溶液8 mL，超音波振盪25分鐘，加入Carrez I試劑0.125 mL，旋渦混合1分鐘，再加入Carrez II試劑0.125 mL，旋渦混合1分鐘，加入乙腈2.5 mL，旋渦混合1分鐘，以5000 ×g離心15分鐘，收集上清液。殘渣加入50%乙醇溶液8 mL，重複上述萃取步驟1次，合併上清液，以50%乙醇溶液定容至25 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各3 μL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中乳酮糖之含量(g/100 g)：

$$\text{檢體中乳酮糖之含量(g/100 g)} = \frac{C \times V}{M \times 10}$$

C：由標準曲線求得檢液中乳酮糖之濃度(mg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

高效液相層析測定條件[註]：

檢出器：折射率檢出器。

層析管：ACQUITY UPLC BEH Amide，1.7 μm，內徑2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：50°C。

檢出器溫度：40°C。

注入量：3 μL。

移動相溶液：依2.5.節調製之溶液。

移動相流速：0.25 mL/min。

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.25 g/100 g。

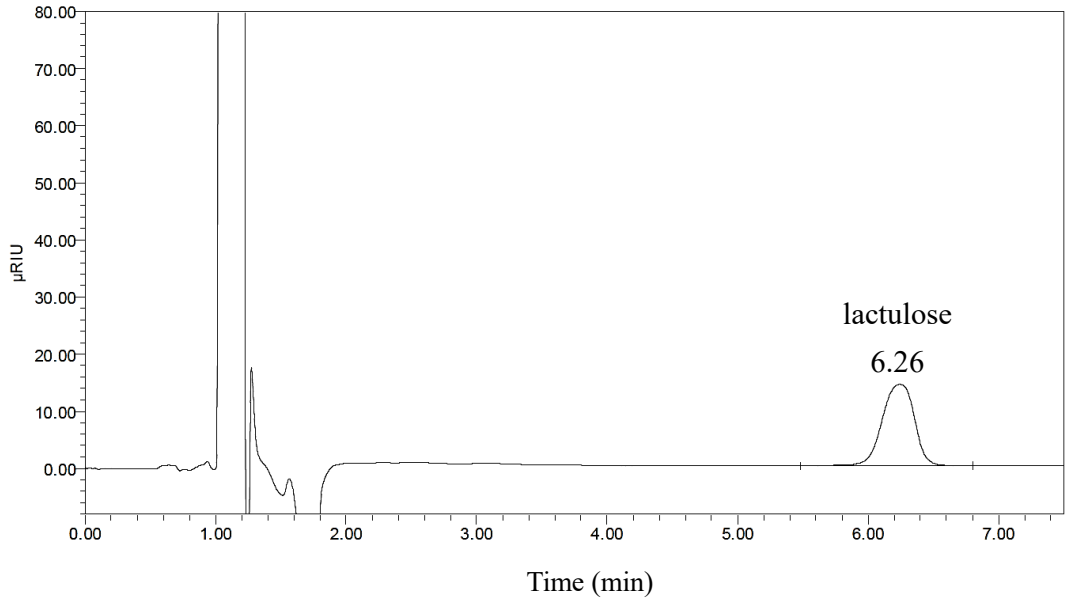
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Benvenuti, M. E., Cleland, G. E. and Burgess, J. A. 2016. Profiling mono and disaccharides in milk and infant formula using the ACQUITY Arc system and ACQUITY QDa detector. Waters Application Note 720005767EN.

2. Oliveira Neves, L. N., Carvalho, R. G., Aguiar, J. A. K. and Silva, P. H. F. 2017. Alternative method for lactulose quantification in the presence of lactose in milk using HILIC with refractive index detection. Anal. Methods 9: 4567-4662.

參考層析圖譜



圖、乳酮糖標準品之HPLC圖譜