

钙型糖柱—高效液相色谱—蒸发光散射检测器法 测定牛乳中的乳糖

Determination of lactose in milk by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector with RCM-monosaccharide Ca^{2+} column

朱小鹏¹ 付尚辰¹ 郝果² 牛鹏飞¹ 刘永峰¹

ZHU Xiaopeng¹ FU Shangchen¹ HAO Guo² NIU Pengfei¹ LIU Yongfeng¹

(1. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 富平县检验检测中心, 陕西 渭南 711700)

(1. College of Food Engineering and Nutrition Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China; 2. Fuping County Inspection and Testing Center, Weinan, Shaanxi 711700, China)

摘要:目的:实现牛乳中乳糖含量快速检测。方法:建立基于钙型糖柱和高效液相色谱测定牛乳中乳糖的新方法。牛乳通过0.2 g/mL三氯乙酸溶液沉淀蛋白质,所得滤液稀释100倍并过滤膜后进入高效液相色谱系统,经过钙型糖柱分离,蒸发光散射检测器进行检测。结果:乳糖在线性范围(20~100 mg/L)内,色谱峰面积和质量浓度之间具有较好的相关性, R^2 为0.999 8。乳糖加标水平为15,40,80 mg/g时,回收率为90.96%~98.23%,检出限为3.6 $\mu\text{g/g}$,定量限为12 $\mu\text{g/g}$,在6 min内实现乳糖浓度的测定。并且用该方法测定11种市售乳样品,测得结果与国标(GB 5009.8—2016)法基本一致。结论:该方法的精密度、重复性、加标回收率均符合有关规定,检测结果准确且耗时短,适用于快速检测牛乳中的乳糖含量。

关键词:牛乳;乳糖;钙型糖柱;高效液相色谱;蒸发光散射检测器

Abstract: Objective: To achieve rapid detection of lactose content in milk, a new method for the determination of lactose in milk based on RCM-monosaccharide Ca^{2+} column and high-performance liquid chromatography has been established. **Methods:** Milk was precipitated with protein in a 0.2 g/mL trichloroacetic acid solution, and the resulting filtrate was diluted 100 times and filtered with a membrane before entering a high-

performance liquid chromatography system. It was separated by an RCM-monosaccharide Ca^{2+} column and detected by an evaporative light scattering detector. **Results:** The results showed that lactose had a good correlation between peak area and concentration in the linear range (20~100 mg/L), with an R^2 of 0.999 8. When the lactose spiking levels were 15, 40, and 80 mg/g, the recovery range was between 90.96% and 98.23%, the detection limit was 3.6 $\mu\text{g/g}$, and the quantitative limit was 12 $\mu\text{g/g}$, the lactose concentration was determined within 6 minutes. 11 commercial milk samples were measured by this method, and the results were consistent with the national standard method. **Conclusion:** The precision, repeatability, and recovery rate of this method met relevant regulations, and the detection results were accurate and time-consuming. It is suitable for rapid detection of lactose content in milk.

Keywords: cow's milk; lactose; RCM-monosaccharide Ca^{2+} column; high performance liquid chromatography; evaporative light scattering detector

乳糖是牛乳中存在的主要碳水化合物^[1]。乳糖检测方法多样,主要包括酶法、生物传感器法、核磁共振法、红外光谱法、分光光度法等^[2]。传统的酶法通常先将乳糖水解为葡萄糖和半乳糖,然后用葡萄糖试剂盒或半乳糖试剂盒通过测量还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸来定量乳糖。然而在实际应用中酶法检测存在虚高现象,因为低乳糖样品中存在低聚半乳糖,其在试剂盒的初始反应中也被 β -半乳糖苷酶水解,导致葡萄糖或半乳糖的测量结果偏高,乳糖结果也相应偏高^[3]。生物传感器法快速易操作且成本低,通过增加葡萄糖浓度来分析

基金项目:陕西省科技计划项目(编号:2022KXJ-010);国家市场监督管理总局科技计划项目(编号:2021MK106);西安市科技计划项目(编号:22NYGG0012)

作者简介:朱小鹏,女,陕西师范大学在读硕士研究生。

通信作者:刘永峰(1981—),男,陕西师范大学教授,博士。

E-mail: yongfeng200@126.com

收稿日期:2023-04-27 **改回日期:**2023-07-12

监测水解过程中的乳糖水平,但是较高浓度的葡萄糖会产生干扰^[4]。核磁共振法可直接对样品进行测定,但是有研究^[5]发现,当乳糖质量浓度<100 mg/L时,与乳糖相关的质子信号与来自牛乳基质的其他信号重叠,无法可靠定量。红外光谱法需要大量样本建立预测模型,过程复杂耗时较长,水分子对红外的吸收也会干扰液体样品检测^[6]。分光光度分析方法简便、快捷,但是不适合大样本的分析^[7]。

为实现乳糖含量的准确快速检测,试验选用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)。它是分析碳水化合物最常用的技术,其检测效率高、灵敏度高、易于操作。其中检测器的选择决定检测结果的可靠性,色谱柱的选择决定分离组分的分离度以及达到的检测限^[8-9]。示差折光检测器(refractive index detector, RID)对糖类检测灵敏度较高,但是 RID 易受温度、流速、流动相等因素影响,存在基线稳定性差、灵敏度低、与梯度洗脱不相容等问题^[10]。蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)与 RID 相比具有较好的稳定性和分离能力,灵敏度高、基线稳定、无溶剂峰干扰,对糖类的测定有良好的应用前景^[11]。糖类色谱分析中常用凝胶柱、氨基柱和糖分析柱。凝胶柱常以聚合凝胶作为柱填料,但其孔径较大适用于多聚糖和高聚糖的测定。氨基柱以多孔硅胶为基质,但由于其键合的氨丙基易水解从而缩短了氨基柱的使用寿命^[12]。而糖柱分离条件简单、专一性强^[13-14]。钙型糖柱常用于检测糖和糖醇,具有较高的分离效率和分辨率、检测快、再生方法简单,已有研究^[15]将钙型糖柱用于菊芋块茎中菊粉的定量分析。

现有研究方法检测耗时较长、还存在检测结果偏高的现象^[2-7]。因此,需要一种快速准确的方法实现乳糖含量的检测。研究以钙型糖柱结合 HPLC-ELSD 建立牛乳中乳糖的测定方法,为牛乳质量控制及合理利用提供理论依据和技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

生牛乳:采集于陕西省西安市长安区奶牛养殖场的健康泌乳期奶牛,采集后放在冰盒中(4℃)带回放入-80℃冰箱备用(用于钙型糖柱法的相关试验);

11种商品液态乳(编号1~11,其中:6号样品为鲜牛乳,10号样品为无乳糖牛乳);市售;

钙型糖柱:300 mm×7.8 mm,5 μm,美国飞诺美公司;

ZORBAX 氨基柱:250 mm×4.6 mm,5 μm,美国安捷伦公司;

乳糖标准品、葡萄糖标准品、半乳糖标准品:纯度≥99%,上海源叶生物科技有限公司;

乙腈:色谱纯,湖北弗顿技术有限公司;

其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪:MultiMate3000型,美国赛默飞公司;

蒸发光散射检测器:ELSD6000型,美国赛默飞公司;

数显电子天平:BSA224S-CW型,赛多利斯科学仪器有限公司;

高速台式冷冻离心机:TGL-16gR型,上海安亭科学仪器厂;

超声清洗器:KQ3200B型,昆山市超声仪器有限公司。

1.3 钙型糖柱法测定乳糖

1.3.1 样品溶液制备 生牛乳混匀后称取5.000 g于50 mL容量瓶中,加入不同质量浓度(0.2,0.3,0.4 g/mL)三氯乙酸溶液(trichloroacetic acid, TCA)5 mL,震荡摇匀并用水定容至50 mL,随后用滤纸过滤除去沉淀。取适量滤液稀释100倍后用0.45 μm微孔滤膜过滤后进行检测。空白样品称取水5.000 g于50 mL容量瓶中,后续步骤同上。

1.3.2 乳糖标准品溶液制备 准确称取乳糖标准品20.0 mg,加入2.0 mL水溶解,得到质量浓度为10.0 mg/mL的乳糖标准储备液,将乳糖标准储备液分别稀释500,250,200,125,100倍,以此来配制质量浓度分别为20.0,40.0,50.0,80.0,100.0 mg/L的乳糖标准工作液。于4℃冰箱中贮藏备用。

1.3.3 液相色谱条件 色谱柱为钙型糖柱(300 mm×7.8 mm,5 μm);流动相为纯水;柱温60℃;进样量20 μL;蒸发光散射检测器条件:飘移管温度115℃;气流量3.2 L/min,撞击器关闭;流速:使用0.9,1.0 mL/min进行优化。

1.3.4 方法学考察

(1) 线性关系:将1.3.2配制的20.0,40.0,50.0,80.0,100.0 mg/L乳糖标准工作液按照1.3.3色谱条件进行测定,记录峰面积并按式(1)计算乳糖质量浓度,以乳糖质量浓度(X_1)为横坐标、乳糖峰面积(Y_1)为纵坐标进行线性回归分析。

$$X_1 = \frac{(C_1 - C_0) \times V_1 \times n_1}{m_1} \quad (1)$$

式中:

X_1 ——试样中乳糖的含量,mg/g;

C_1 ——样液中乳糖质量浓度,mg/L;

C_0 ——空白中乳糖质量浓度,mg/L;

V_1 ——试样定容体积,L;

n_1 ——样液稀释倍数;

m_1 ——试样质量,g。

(2) 定量限和检出限:选取信噪比(S/N)为10时的

乳糖质量浓度作为定量限,信噪比(S/N)为 3 时的乳糖质量浓度作为检出限。

(3) 精密度和重复性:精密度考察按照 1.3.1 所述前处理方法制备 1 份供试品溶液连续进样测定 6 次,然后依据 1.3.3 色谱条件进样检测;重复性考察按照 1.3.1 所述前处理方法制备 6 份供试品溶液分别进样测定,然后依据 1.3.3 色谱条件进样检测;记录峰面积并按式(1)计算乳糖含量。

(4) 加标回收率试验:精确称取生牛乳 5.000 g 再加入不同水平(15, 40, 80 mg/g)的乳糖标准品后,按照 1.3.1 优化方法制备待测样品并用 1.3.3 色谱条件进样检测,记录峰面积并按式(1)计算乳糖含量再计算乳糖回收率。

1.4 氨基柱法测定乳糖

1.4.1 样品溶液和乳糖标准品溶液的制备 参考 GB 5009.8—2016 第一法。

1.4.2 液相色谱条件 参考 GB 5009.8—2016 第一法。

1.5 市售液态乳的乳糖含量检测

采用 GB 5009.8—2016 第一法对试验所建立的方法进行验证,将购买的 11 种市售液态乳参照 1.3.1 所述前处理方法提取乳糖并用 1.3.3 所述液相色谱条件进行检测,记录峰面积并按式(1)计算乳糖含量;参照 1.4.1 所述前处理方法提取乳糖并用 1.4.2 所述液相色谱条件进行检测,记录峰面积并按式(2)计算乳糖含量。

$$X_2 = \frac{(C_2 - C'_0) \times V_2 \times n_2}{m_2}, \quad (2)$$

式中:

X_2 ——试样中乳糖的含量,mg/g;

C_2 ——样液中乳糖质量浓度,mg/mL;

C'_0 ——空白中乳糖质量浓度,mg/mL;

V_2 ——试样定容体积,mL;

n_2 ——样液稀释倍数;

m_2 ——试样质量,g。

1.6 数据分析

通过 SPSS Statistics 24.0 对数据进行显著性分析,其结果表示为“平均值±标准差”,输出数据由 Origin 2018 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 钙型糖柱法条件优化

2.1.1 样品提取优化 采用三氯乙酸溶液对样品进行前处理使蛋白质沉淀,该试剂是常用的蛋白质沉淀剂,沉淀效果好、准确度高^[6]。由表 1 可知,TCA 质量浓度不同时,所得乳糖含量无显著性差异($P > 0.05$),相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 1.48% ~ 2.17%。TCA 具有较强腐蚀性,需同时考虑样品提取操作的安全性,因此选取最低质量浓度 0.2 g/mL 进行提取。

表 1 不同浓度 TCA 处理后乳糖含量

Table 1 Lactose content after TCA treatment with different concentration ($n=3$)

TCA 质量浓度/(g·mL ⁻¹)	乳糖含量/(mg·g ⁻¹)	RSDs/%
0.2	36.55±0.79	2.17
0.3	35.22±0.63	1.80
0.4	36.34±0.54	1.48

2.1.2 流动相流速优化 钙型糖柱的典型流动相为纯水,以纯水作为流动相时色谱图基线平滑噪音小。然而流动相流速的变化会影响保留时间、柱压、分离度和基线稳定性^[17],流速过大会导致色谱图拖尾和基线不稳^[18]。图 1 中,流速为 1.0 mL/min 时乳糖保留时间为 5.008 min,流速为 0.9 mL/min 时保留时间为 5.513 min,可见流速增大保留时间前移。但流速 1.0 mL/min 时,色谱柱的压力会过高,不宜进行大量的样品分析,同时会影响色谱柱寿命。因此,0.9 mL/min 为最适宜流速。

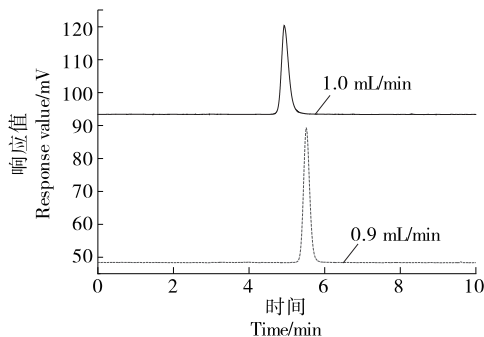


图 1 不同流速下乳糖标准品图谱

Figure 1 Chromatogram of lactose standard at different flow rates

2.2 方法学验证

2.2.1 线性关系 根据 1.3.2 所配制的乳糖标准品的检测结果,得到回归方程 $Y_1 = 0.094 8X_1 - 1.181 1$,相关系数 $R_1^2 = 0.999 8$,乳糖在 20.0~100.0 mg/L 范围线性关系良好,以 3 倍信噪比确定检出限为 3.6 μ g/g,以 10 倍信噪比确定定量限为 12 μ g/g。

2.2.2 重复性和精密性 重复性试验中所得乳糖含量分别为 35.30, 37.34, 35.67, 36.74, 37.22, 37.71 mg/g,其平均值为 (36.66±0.97) mg/g, RSDs 为 2.65%,表明该方法重复性较好。精密性试验中所得乳糖含量为 35.77, 36.41, 36.83, 36.60, 36.73, 34.53 mg/g,其平均值为 (36.16±0.89) mg/g, RSDs 为 2.45%。表明在该色谱条件下,高效液相色谱仪精密性良好。

2.2.3 乳糖加标回收率 表 2 中,牛乳样品在 3 个不同加标水平下(15, 40, 80 mg/g)的乳糖回收率为 90.96%~98.23%,结果表明,方法具有很高的准确度,适用于实际样品的测定。

表 2 乳糖加标回收率结果

Table 2 Lactose spike recovery results (n=3)

加标水平	加标值/ (mg · g ⁻¹)	乳糖含量/ (mg · g ⁻¹)	加标回 收率/%	RSDs/ %
0	0	36.83±0.53	—	—
1	15	51.57±0.60	98.23±3.98	4.05
2	40	74.62±0.79	94.48±1.98	2.10
3	80	109.60±0.41	90.96±0.51	0.56

表 3 钙型糖柱和氨基柱对乳糖的线性范围、检出限及定量限对比

Table 3 Comparison of linear range, detection limit, and quantification limit of lactose between calcium sugar column and amino column

色谱柱类型	标准曲线	线性范围/(mg · L ⁻¹)	检出限/(μg · g ⁻¹)	定量限/(μg · g ⁻¹)
钙型糖柱	$Y_1=0.0948X_1-1.1811$	20.0~100.0	3.6	12
氨基柱	$Y_2=0.3166X_2-22.3576$	200~1000	45	150

低于氨基柱法的,线性范围最低可达 20 mg/L,灵敏度高,适用于检测较低含量的乳糖。

2.3.2 检测耗时对比 图 2(a)中,氨基柱法检测的乳糖标准品保留时间为 12.577 min 并且在 3.0 min 出现未知杂峰,牛乳样品中乳糖保留时间为 12.502 min。图 2(b)中,钙型糖柱法检测的乳糖标准品的保留时间为 5.515 min,牛乳中的乳糖保留时间为 5.420 min。并且在乳糖的保留时间内,其他组分未出现杂质峰干扰,表明方法的专属性较好。图 2(a)中基线噪音较大,可能是由于漂移管的温度变化使乙腈没有完全蒸发^[19]。因此,钙型糖柱法与氨基柱法相比,极大缩短了检测时长,提高了检测效率,实现了乳糖含量的快速检测。

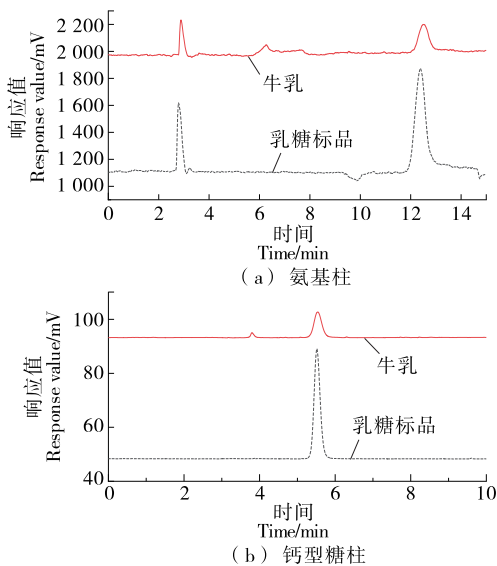


图 2 牛乳样品及乳糖标准品的保留时间图谱
Figure 2 Chromatogram of milk sample and lactose standard

2.3 钙型糖柱法和氨基柱法的比较

2.3.1 线性范围、检出限及定量限对比 根据 1.4.1 所配制的乳糖标准品溶液所测结果,以乳糖质量浓度为横坐标(X_2)和乳糖峰面积(Y_2)为纵坐标进行线性回归分析,得到回归方程 $Y_2=0.3166X_2-22.3576$,相关系数 $R_2^2=0.9993$,乳糖在 0.2~1.0 mg/mL 范围有良好的线性关系,以 3 倍信噪比确定检出限为 45 μg/g,以 10 倍信噪比确定定量限为 150 μg/g。表 3 中,钙型糖柱法检出限远

2.4 市售液态乳的检测结果对比

2.4.1 乳糖含量分析 由表 4 可知,氨基柱法的检测结果为 33.93~50.72 mg/g,钙型糖柱法的检测结果为 33.86~49.55 mg/g。为更好地比较两种方法所测乳糖含量的差异,对表 4 数据进行独立样本 t 检验。结果表明,两种方法所测 11 种市售液态乳的乳糖含量之间均无显著性差异($P>0.05$)。6 号样品(鲜牛乳)乳糖含量最高,两种方法所得结果一致。

2.4.2 色谱图分析 图 3(a)中,所有样品的色谱图峰形对称无拖尾,基线平稳噪音小,无杂峰干扰,保留时间一致。10 号样品在 5.5 min 时未出现色谱峰,表明该样品中无乳糖,随后相继出现两个色谱峰,经标准品验证分别是葡萄糖(6.518 min)和半乳糖(7.217 min),葡萄糖、半乳糖之间分离效果良好。图 3(b)中,10 号样品中未检测出乳

表 4 11 种市售液态乳的乳糖含量检测结果

Table 4 Results of lactose content detection in 11 commercially available milk (n=3)

编号	乳糖含量/(mg · g ⁻¹)	
	氨基柱法	钙型糖柱法
1	38.42±1.98	38.93±2.23
2	44.51±3.02	41.29±0.43
3	44.83±1.55	42.34±1.08
4	40.81±0.06	41.99±1.49
5	40.08±3.40	37.72±0.78
6	52.66±2.74	49.55±1.17
7	42.04±1.99	44.47±0.66
8	33.93±0.63	33.86±1.03
9	44.67±1.26	45.70±0.73
10	0.00±0.00	0.00±0.00
11	36.94±1.48	40.49±1.22

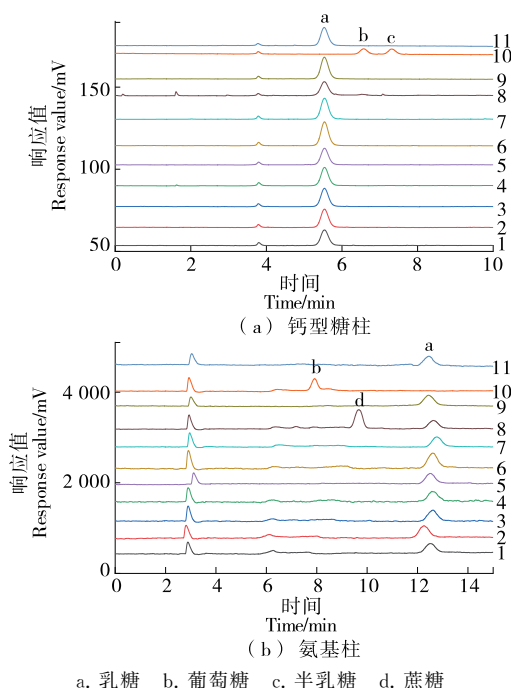


图 3 11 种市售乳制品的乳糖含量图谱

Figure 3 Chromatogram of lactose content of 11 commercially available dairy products

糖和半乳糖,7.8 min 的色谱峰为葡萄糖。图 3(b)中 8 号样品在 10.0 min 的色谱峰为蔗糖。钙型糖柱法乳糖的保留时间在 5.5 min 处呈现高度的一致性(RSDs 为 0.06%)而国标方法中保留时间在 12.5 min 处偏移程度相对较大(RSDs 为 0.84%),可能是流动相中乙腈挥发使保留时间发生了漂移^[20]。

3 结论

研究建立了以 0.2 g/mL 三氯乙酸溶液进行蛋白质沉淀,钙型糖柱法测定牛乳中乳糖含量的方法。该方法前处理简单且 6 min 内可以实现乳糖含量检测,其选择性好、灵敏度较高、检出限低(3.6 μg/g)、回收率高、精密度和准确性良好、峰面积和乳糖含量之间存在良好线性关系,测定结果具有较高准确度且与国标(GB 5009.8—2016)测量结果基本一致。该方法能够满足牛乳中定量检测乳糖的需要并为产品质量控制方面提供技术支持,还可用于牛乳中葡萄糖、半乳糖的测定,具有可行性和适用性。

参考文献

[1] OZGA A K, RAUCH G. Weighted composite time to event endpoints with recurrent events: Comparison of three analytical approaches[J]. BMC Medical Research Methodology, 2022, 22(1): 1-14.
 [2] RAO P S, SINGH P, SHARMA V, et al. Traditional analytical approaches for lactose residues determination in lactose hydrolysed

milks: A review [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 151: 112069.
 [3] 樊双喜, 刘一诺, 吉鑫, 等. 核磁共振波谱法测定牛奶中乳糖的含量[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(23): 227-232.
 FAN S X, LIU Y N, JI X, et al. Quantitative determination of lactose in milk products by nuclear magnetic resonance[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(23): 227-232.
 [4] 孙佩, 任硕, 陈柔含, 等. 核磁共振波谱法测定牛奶中乳糖的含量[J]. 分析测试学报, 2021, 40(9): 1 391-1 395.
 SUN P, REN S, CHEN R H, et al. Quantitative determination of lactulose in liquid milk by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2021, 40(9): 1 391-1 395.
 [5] SOYSEVEN M, SEZGIN B, ARLI G. A novel, rapid and robust HPLC-ELSD method for simultaneous determination of fructose, glucose and sucrose in various food samples: Method development and validation[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 107: 104400.
 [6] YANG J C, RAINVILLE P, LIU K, et al. Determination of lactose in low-lactose and lactose-free dairy products using LC-MS[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 100(9): 103824.
 [7] 焦艳翠, 赵领军, 范丽霞, 等. 奶及奶制品中乳糖检测方法的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(8): 26-29.
 JIAO Y C, ZHAO L J, FAN L X, et al. Research progress on lactose detection methods in milk and dairy products[J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25(8): 26-29.
 [8] 热孜万古力·赛买提, 陈士恩, 高丹丹, 等. 单糖高效液相色谱法检测技术研究进展[J]. 食品与机械, 2018, 34(2): 185-190.
 SAIMAITI R Z W G L, CHEN T E, GAO D D, et al. Research progress in monosaccharide detection by high-performance liquid chromatography[J]. Food & Machinery, 2018, 34(2): 185-190.
 [9] 冯鑫, 程睿, 王珮玥, 等. 电喷雾检测器、蒸发光散射检测器与示差折光检测器测定食品中 5 种糖成分的方法比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(4): 1 513-1 518.
 FENG X, CHENG R, WANG P Y, et al. Comparison of determination of 5 carbohydrates in food by charged aerosol detector, evaporative light scattering detector and refractive index detector[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(4): 1 513-1 518.
 [10] 陈梦, 张晓芳, 韩艳超, 等. HPLC-ELSD 法测定微胶囊中阿拉伯糖、果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖含量[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(5): 95-100.
 CHEN M, ZHANG X F, HAN Y C, et al. Determination of arabinose, fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose in microcapsules by HPLC-ELSD[J]. China Food Additives, 2020, 31(5): 95-100.
 [11] WEI Y, DING M Y. Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 904(1): 113-117.

- [12] 沈昱. 糖类化合物 HPLC 分析方法建立的研究[J]. 轻工科技, 2013, 29(9): 20-22.
SHEN Y. Study on the establishment of HPLC analysis method for carbohydrate compounds [J]. Light Industry Science and Technology, 2013, 29(9): 20-22.
- [13] 郭守军, 杨永利, 余建保, 等. 高效液相色谱法分析猪屎豆种子胶多糖中的单糖组成[J]. 广西植物, 2010, 30(3): 422-425.
GUO S J, YANG Y L, SHE J B, et al. Determination of carbohydrates in seed gum of *Crotalaria mucronata* by HPLC[J]. Guihaia, 2010, 30(3): 422-425.
- [14] 张兰, 程珊影, 李夏兰, 等. 高效液相色谱测定麦糟水解液中单糖和有机酸[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2010, 31(2): 187-191.
ZHANG L, CHENG S Y, LI X L, et al. Analysis of monosaccharides and organic acids in the liquors of acid hydrolysis on brewery's spent grain by HPLC[J]. Journal of Huaqiao University (Natural Science), 2010, 31(2): 187-191.
- [15] BRKLJACA J, BODROŽA-SOLAROV M, KRULJ J, et al. Quantification of inulin content in selected accessions of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) [J]. Helia, 2014, 37(60): 105-112.
- [16] 漆亚乔, 彭名军, 黄秋婷, 等. 4种蛋白质沉淀剂测定乳粉中非蛋白氮含量的效果[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(16): 5736-5741.
QI Y Q, PENG M J, HUANG Q T, et al. Determination of non-protein nitrogen in milk powder by four protein precipitants[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(16): 5736-5741.
- [17] 刘孟飞, 王美, 赵昂, 等. 超高效液相色谱—静电场轨道离子阱高分辨质谱法测定设施菜地土壤中有机磷酸二酯类化合物[J]. 色谱, 2023, 41(1): 58-65.
LIU M F, WANG M, ZHAO A, et al. Determination of organic phosphate diesters in facility vegetable soils using ultra-high performance liquid chromatography-electrostatic field orbital orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(1): 58-65.
- [18] 魏超田, 高倩妮. 高效液相色谱法测定蜂蜜中诺氟沙星残留[J]. 食品安全导刊, 2022(25): 120-125.
WEI C T, GAO Q N. Determination of norfloxacin residue in honey by HPLC[J]. China Food Safety Magazine, 2022(25): 120-125.
- [19] 李润植, 田茂章, 张虹, 等. 超高效液相色谱—蒸发光散射法测定石油采出液中十八烷基基磺基甜菜碱[J]. 分析实验室, 2022, 41(5): 583-587.
LI R Z, TIAN M Z, ZHANG H, et al. Determination of octadecyl hydroxy sulfobetaine in petroleum extraction liquid by UPLC-evaporative light scattering detector [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2022, 41(5): 583-587.
- [20] 姚媛媛, 段正康, 曾航日, 等. 正相液相色谱保留时间漂移的影响因素和解决办法研究[J]. 应用化工, 2016, 45(6): 1184-1186, 1190.
YAO Y Y, DUAN Z K, ZENG H R, et al. The influence factors and solutions research for retention time drift in the normal phase liquid chromatograph[J]. Applied Chemical Industry, 2016, 45(6): 1184-1186, 1190.
- (上接第22页)
- [7] YOON S C, LAWRENCE K C, JONES D R, et al. Improved modified pressure imaging and software for egg micro-crack detection and egg quality grading [J]. Applied Engineering in Agriculture, 2012, 28(2): 283-293.
- [8] SUN K, ZHANG W, PAN L Q, et al. Recognition of a cracked hen egg image using a sequenced wave signal extraction and identification algorithm[J]. Food Analytical Methods, 2018, 11(4): 1223-1233.
- [9] 陈羽立, 孙付春, 郭兴华, 等. 基于 EfficientNet 的鸡蛋裂纹检测研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2020, 39(4): 385-389.
CHEN Y L, SUN F C, GUO X H, et al. Research on egg crack detection based on EfficientNet[J]. Journal of Chengdu University (Natural Science Edition), 2020, 39(4): 385-389.
- [10] NASIRI A, OMID M, TAHERI-GARAVAND A. An automatic sorting system for unwashed eggs using deep learning[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 283: 110036.
- [11] TURKOGLU M. Defective egg detection based on deep features and bidirectional long-short-term-memory [J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2021, 185: 106152.
- [12] BOTTA B, GATTAM S S R, DATTA A K. Eggshell crack detection using deep convolutional neural networks[J]. Journal of Food Engineering, 2022, 315: 110798.
- [13] 赵祚喜, 罗阳帆, 黄杏彪, 等. 基于机器视觉和 YOLOv4 的破损鸡蛋在线检测研究[J]. 现代农业装备, 2022, 43(1): 8-16.
ZHAO Z X, LUO Y F, HUANG X B, et al. Research on on-line detection of damaged eggs based on machine vision and YOLOv4 [J]. Modern Agricultural Equipment, 2022, 43(1): 8-16.
- [14] TANG W Q, HU J C, WANG Q H. High-throughput online visual detection method of cracked preserved eggs based on deep learning[J]. Applied Sciences-Basel, 2022, 12(3): 952.
- [15] WONG H C, NG E Y, CHENG L H, et al. Classification of inhomogeneous eggshell-mottling patterns using a pretrained convolutional neural network[J]. Journal of Electronic Imaging, 2020, 29(1): 013013.
- [16] 姚学峰, 李超. 改进的 YOLOv5 蛋类缺陷自动检测模型[J]. 食品与机械, 2022, 38(11): 155-159, 183.
YAO X F, LI C. An improved automatic detection model for egg defection based on YOLOv5[J]. Food & Machinery, 2022, 38(11): 155-159, 183.
- [17] 孙柯. 基于计算机视觉的禽蛋裂纹识别技术研究与应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
SUN K. Study and application of the recognition technology for cracked egg based on computer vision [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.