

ICS 67.050

X04

团体标准

T/CIFST XXX-2023

食品中 6 种母乳低聚糖的测定 离子色谱法

Determination of six kinds of human milk oligosaccharides in foods

Ion Chromatography

（征求意见稿）

2023-XX-XX 发布

2023-XX-XX 实施

中国食品科学技术学会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：



食品中 6 种母乳低聚糖的测定 离子色谱法

1 范围

本标准规定了食品中 6 种母乳低聚糖的离子色谱测定方法。

本标准适用于婴儿配方食品、较大婴儿和幼儿配方食品 and 特殊医学用途婴儿配方食品中 2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、乳糖-*N*-四糖、乳糖-*N*-新四糖、3'-唾液酸乳糖和 6'-唾液酸乳糖含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样的成分中无低聚果糖时，试样用水稀释，过滤后，用离子色谱-脉冲安培检测法测定，外标法定量。试样的成分中有低聚果糖或成分不清楚时，试样用水稀释，酶解去除低聚果糖，过滤后，用离子色谱-脉冲安培检测法测定，外标法定量。

4 试剂与材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，实验用水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 试剂

- 4.1.1 氢氧化钠溶液：50%，w/w，色谱纯。
- 4.1.2 无水乙酸钠（ CH_3COONa ）。
- 4.1.3 果聚糖酶（Fructanase）： ≥ 2000 U/mL。

4.2 试剂配制

- 4.2.1 氢氧化钠溶液（0.5 mol/L）：称取 80 g 50% 氢氧化钠溶液，用水稀释至 2 L，混匀。通入惰性气体保护，密封保存。室温下可放置 1 个月。
- 4.2.2 乙酸钠溶液（0.3 mol/L）：称取 49.25 g 无水乙酸钠，用水溶解并稀释至 2 L，混匀，过膜。通入惰性气体保护，密封保存。室温下可放置 1 个月。
- 4.2.3 果聚糖酶溶液（2000 U/mL）：称取适量果聚糖混合酶溶解于水中（每 1 g 固态复溶试样/液态试样至少需要果聚糖酶 30 U），果聚糖酶溶液的浓度为 2000 U/mL，混匀。该溶液于 -18°C 可放置 3 个月。

4.3 标准品

4.3.1 2'-岩藻糖基乳糖 ($C_{18}H_{32}O_{15}$, CAS: 41263-94-9): 纯度 $\geq 90\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

4.3.2 3-岩藻糖基乳糖 ($C_{18}H_{32}O_{15}$, CAS: 41312-47-4): 纯度 $\geq 95\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

4.3.3 乳糖-*N*-四糖 ($C_{26}H_{45}NO_{21}$, CAS: 14116-68-8) 纯度 $\geq 90\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

4.3.4 乳糖-*N*-新四糖 ($C_{26}H_{45}NO_{21}$, CAS: 13007-32-4): 纯度 $\geq 95\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

4.3.5 3'-唾液酸乳糖钠盐 ($C_{23}H_{38}NO_{19}Na$, CAS: 35890-38-1): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

4.3.5 6'-唾液酸乳糖钠盐 ($C_{23}H_{38}NO_{19}Na$, CAS: 35890-39-2): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 标准储备溶液: 分别准确称取适量(精确至 0.1 mg)标准品, 用水配置成质量浓度为 2500 mg/L 的单标准品储备溶液。储备溶液于 $-80^{\circ}C$ 可放置 8 个月, 于 $-18^{\circ}C$ 可放置 3 个月。

4.4.2 混合标准中间溶液 1: 分别准确吸取 5.00 mL 2'-岩藻糖基乳糖标准储备溶液、2.50 mL 乳糖-*N*-新四糖标准储备溶液和 2.50 mL 3'-唾液酸乳糖标准储备溶液于 25 mL 容量瓶中, 用水定容, 混匀。混合标准中间溶液 1 中各组分的质量浓度分别为 2'-岩藻糖基乳糖 500 mg/L, 乳糖-*N*-新四糖 250 mg/L 和 3'-唾液酸乳糖 250 mg/L。临用前配制, 室温放置。

4.4.3 混合标准中间溶液 2: 分别准确吸取 5.00 mL 3-岩藻糖基乳糖标准储备溶液、2.50 mL 乳糖-*N*-四糖标准储备溶液和 2.50 mL 6'-唾液酸乳糖标准储备溶液于 25 mL 容量瓶中, 用水定容, 混匀。混合标准中间溶液 2 中各组分的质量浓度分别为 3-岩藻糖基乳糖 500 mg/L, 乳糖-*N*-四糖 250 mg/L 和 6'-唾液酸乳糖 250 mg/L。临用前配制, 室温放置。

4.4.4 混合标准系列工作溶液 1: 分别准确吸取 0.10 mL、0.20 mL、1.00 mL、2.00 mL、6.00 mL、10.00 mL 混合标准中间溶液 1 (4.4.2) 于 7 个 50 mL 容量瓶, 用水定容, 混匀, 得到 2'-岩藻糖基乳糖质量浓度为 1 mg/L、2 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、60 mg/L、100 mg/L, 乳糖-*N*-新四糖质量浓度为 0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L 和 3'-唾液酸乳糖质量浓度为 0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L 的混合标准系列工作溶液 1。混合标准系列工作溶液 1 于 $-18^{\circ}C$ 可放置 3 个月, 于 $2^{\circ}C \sim 8^{\circ}C$ 可放置 5 d。

4.4.5 混合标准系列工作溶液 2: 分别准确吸取 0.10 mL、0.20 mL、1.00 mL、2.00 mL、6.00 mL、10.00 mL 混合标准中间溶液 2 (4.4.3) 于 7 个 50 mL 容量瓶, 用水定容, 混匀, 得到 3-岩藻糖基乳糖质量浓度为 1 mg/L、2 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、60 mg/L、100 mg/L, 乳糖-*N*-四糖质量浓度为 0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L 和 6'-唾液酸乳糖质量浓度为 0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L 的混合标准系列工作溶液 2。混合标准系列工作溶液 2 于 $-18^{\circ}C$ 可放置 3 个月, 于 $2^{\circ}C \sim 8^{\circ}C$ 可放置 5 d。

5 仪器和设备

5.1 离子色谱仪: 配备脉冲安培检测器、三元及以上梯度泵。

5.2 预柱: CarboPacTM PA1 预柱或等效柱。

- 5.3 分离柱：CarboPac™ PA1 分离柱或等效柱。
- 5.4 分析天平：感量为 0.01 g、1 mg 和 0.1 mg。
- 5.5 恒温水浴锅：40 °C±2 °C。
- 5.6 磁力搅拌器。
- 5.7 涡旋振荡器。
- 5.8 氮吹仪。
- 5.9 针筒式尼龙过滤器：孔径 0.2 μm。
- 5.10 滤膜（0.2 μm）。

6 分析步骤

6.1 试样制备

6.1.1 试样中无低聚果糖

6.1.1.1 固态试样：准确称取试样 25 g (m_1 ，精确至 0.01 g)，加水 200 g (m_2 ，精确至 0.01 g)，磁力搅拌 15 min。准确称取 1 g (m_3 ，精确至 0.001 g) 上述液体于 25 mL (V) 容量瓶中，用水定容，混匀，尼龙过滤器过滤后进样分析。

6.1.1.2 液态试样：准确称取 1 g (m_3 ，精确至 0.001 g) 液体于 25 mL (V) 容量瓶中，用水定容，混匀，尼龙过滤器过滤后进样分析。

6.1.2 试样中有低聚果糖或成分不清楚

6.1.2.1 固态试样：准确称取试样 25 g (m_1 ，精确至 0.01 g)，加水 200 g (m_2 ，精确至 0.01 g)，磁力搅拌 15 min。准确称取 1 g (m_3 ，精确至 0.001 g) 上述液体于 25 mL (V) 容量瓶中，加入 15 μL 果聚糖酶溶液，用水定容，混匀并转移至 50 mL 离心管中，加盖，放置于恒温水浴锅中 40°C 酶解 30 min，酶解后取出并静置至室温，尼龙过滤器过滤后进样分析。

6.1.2.2 液态试样：准确称取 1 g (m_3 ，精确至 0.001 g) 液体于 25 mL (V) 容量瓶中，加入 15 μL 果聚糖酶溶液，用水定容，混匀并转移至 50 mL 离心管中，加盖，放置于恒温水浴锅中 40°C 酶解 30 min，酶解后取出并静置至室温，尼龙过滤器过滤后进样分析。

6.2 仪器参考条件

6.2.1 离子色谱参考条件

6.2.1.1 色谱柱：预柱（4 mm × 50 mm）；分离柱（4 mm × 250 mm）。

6.2.1.2 柱温：20±2 °C。

6.2.1.3 流速：1 mL/min。

6.2.1.4 进样量：5 μL。

6.2.1.5 柱压：1000 psi ~ 2500 psi。

6.2.1.6 流动相：A 相为水，B 相为 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液，C 相为 0.3 mol/L 乙酸钠溶液。离子色谱梯度洗脱条件见表 1。

表 1 离子色谱梯度淋洗程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%	曲线类型
0.00	82	18	0	线性

15.00	82	18	0	线性
25.00	72	18	10	线性
35.00	72	18	10	线性
39.00	50	18	32	线性
49.00	50	18	32	线性
49.01	0	20	80	线性
53.00	0	20	80	线性
53.01	82	18	0	线性
60.00	82	18	0	线性

6.2.2 脉冲安培检测器参考条件

6.2.2.1 参比电极：氯化钾饱和的银/氯化银。

6.2.2.2 工作电极：金电极。

6.2.2.3 辅助电极：钛。

6.2.2.4 电位：碳水化合物四极电位。

6.3 标准工作曲线的制备

将混合标准系列工作溶液从低到高依次注入离子色谱仪中，测定相应的峰面积，在试样溶液测定后，再次将混合标准系列工作溶液从低到高依次注入离子色谱仪中，测定相应的峰面积。以混合标准系列工作溶液中各待测组分的质量浓度为横坐标，以试样前后两套混合标准系列工作溶液中各待测组分的平均峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线。试样前后的两套混合标准工作溶液响应值（峰面积）漂移对于标准工作溶液质量浓度 $\leq 1 \text{ mg/L}$ 时，不超过15%，对于标准工作溶液质量浓度 $> 1 \text{ mg/L}$ 时，不超过10%。标准曲线积分方式可选择线性不强制过零点或二次曲线不强制过零点。标准曲线的相关系数 ≥ 0.999 。6种母乳低聚糖标准品溶液的离子色谱图见附录A中图A.1。

6.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入离子色谱仪中，根据保留时间定性（保留时间偏差 $\pm 2.5\%$ ），记录待测组分峰面积，根据标准工作曲线得到试样溶液中待测组分的质量浓度。

7 分析结果的表述

试样中6种母乳低聚糖的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{c \times V}{m_3} \times f \times C \times 10^{-1} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X ——试样中待测组分的含量，单位为毫克每百克（ $\text{mg}/100\text{g}$ ）；

c ——由标准曲线计算得到的试样溶液中待测组分的质量浓度，单位为毫克每升（ mg/L ）；

V ——定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m_3 ——试样质量，单位为克（ g ）；

f ——稀释因子。固态试样 $f = \frac{m_1 + m_2}{m_1}$ ，液态试样 $f = 1$ 。

C ——转换系数，计算2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、乳糖- N -四糖和乳糖- N -新四

糖的含量时， $C=1$ ；计算 3'-唾液酸乳糖和 6'-唾液酸乳糖的含量时，3'-唾液酸乳糖钠盐和 6'-

唾液酸乳糖钠盐转换成 3'-唾液酸乳糖和 6'-唾液酸乳糖， $C = \frac{633.55}{655.53} = 0.9665$ 。

10^{-1} ——换算系数。

计算结果保留三位有效数字。

注：唾液酸乳糖的分子量为 633.55，唾液酸乳糖钠盐的分子量为 655.53。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

9 检出限及定量限

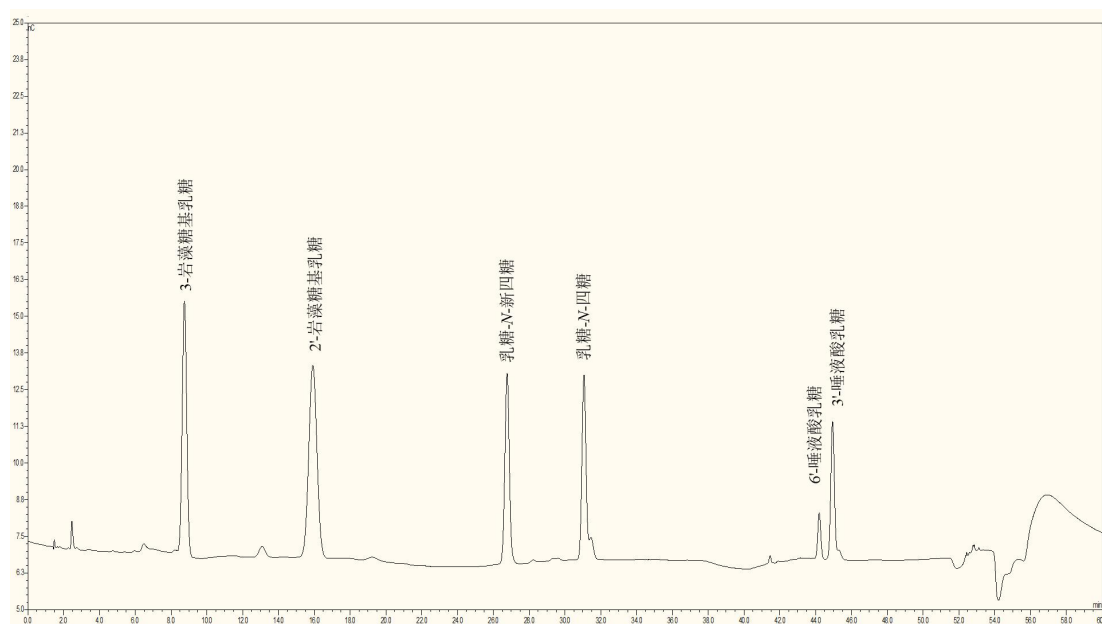
9.1 对于固态试样，本方法对 2'-岩藻糖基乳糖和 3-岩藻糖基乳糖的检出限为 9 mg/100 g，定量限为 36 mg/100 g。本方法对乳糖-*N*-四糖、乳糖-*N*-新四糖、3'-唾液酸乳糖和 6'-唾液酸乳糖的检出限为 4.5 mg/100 g，定量限为 18 mg/100 g。

9.2 对于液态试样，本方法对 2'-岩藻糖基乳糖和 3-岩藻糖基乳糖的检出限为 1 mg/100 g，定量限为 4 mg/100 g。本方法对乳糖-*N*-四糖、乳糖-*N*-新四糖、3'-唾液酸乳糖和 6'-唾液酸乳糖的检出限为 0.5 mg/100 g，定量限为 2 mg/100 g。

附录 A

(资料性)

6种母乳低聚糖标准品溶液离子色谱图示例



图A.1 6种母乳低聚糖标准品溶液离子色谱图示例