

团 体 标 准

T/CIFST 025—2024

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

2024-08-20 发布

2024-08-20 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》的规定起草。

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：南开大学、虹摹生物科技(上海)有限公司、内蒙古伊利实业集团股份有限公司、菲仕兰乳制品(上海)有限公司、北京三元食品股份有限公司、科汉森(北京)贸易有限公司、内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司、深圳市中科朗健生物技术有限公司、苏州一兮生物技术有限公司、山东恒鲁生物科技有限公司。

本文件主要起草人：王硕、王津、姚斐、张影、刘丽君、陈静、王文华、陈瑾萱、陈历俊、杨宝雨、马磊、赵静波、赵艳荣、田芳、卢诗瑶、葛绍勇、刘振云、化宿南、方诩、刘奉鑫、刘爽。

食品中 6 种母乳低聚糖的测定

离子色谱法

1 范围

本文件规定了食品中 6 种母乳低聚糖的离子色谱测定方法。

本文件适用于婴儿配方食品、较大婴儿配方食品、幼儿配方食品和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。试样标签中成分无低聚果糖时，试样用水稀释，无需酶解，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，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%(质量分数)]:色谱纯。

4.1.2 无水乙酸钠(CH_3COONa)。

4.1.3 氮气(N_2):纯度 $\geq 99.9\%$ 。

4.1.4 果聚糖酶(fructanase): $\geq 2\ 000\ \text{U/mL}$ 。

4.2 试剂配制

4.2.1 氢氧化钠溶液(0.5 mol/L):称取 50%氢氧化钠溶液(见 4.1.1)80 g(精确至 0.01 g),用水稀释至 2 L,混匀。通入氮气保护,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):称取无水乙酸钠(见 4.1.2)49.25 g(精确至 0.01 g),用水溶解并稀释至 2 L,混匀,过 0.45 μm 膜。通入氮气保护,密封保存。室温下可放置 1 个月。

4.2.3 果聚糖酶溶液(2 000 U/mL):称取适量果聚糖酶溶解于水中,混匀,配制成 2 000 U/mL 果聚糖酶溶液。该溶液于 $-18\ ^\circ\text{C}$ 可放置 3 个月。

4.3 标准品

- 4.3.1 2'-岩藻糖基乳糖($C_{18}H_{32}O_{15}$):纯度 $\geq 90\%$,CAS:41263-94-9。
- 4.3.2 3-岩藻糖基乳糖($C_{18}H_{32}O_{15}$):纯度 $\geq 95\%$,CAS:41312-47-4。
- 4.3.3 乳糖-N-四糖($C_{26}H_{45}NO_{21}$)纯度 $\geq 90\%$,CAS:14116-68-8。
- 4.3.4 乳糖-N-新四糖($C_{26}H_{45}NO_{21}$):纯度 $\geq 95\%$,CAS:13007-32-4。
- 4.3.5 3'-唾液酸乳糖钠盐($C_{23}H_{38}NO_{19}Na$):纯度 $\geq 98\%$,CAS:35890-38-1。
- 4.3.6 6'-唾液酸乳糖钠盐($C_{23}H_{38}NO_{19}Na$):纯度 $\geq 98\%$,CAS:35890-39-2。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 标准储备溶液:按纯度折算后分别准确称取适量(精确至 0.1 mg)标准品(见 4.3),用水配制成浓度为 2 500 mg/L 的单标准品储备溶液。标准储备溶液于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可放置 8 个月,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可放置 3 个月。

4.4.2 混合标准中间溶液:分别准确吸取 2'-岩藻糖基乳糖标准储备溶液 5.00 mL、3-岩藻糖基乳糖标准储备溶液 5.00 mL、乳糖-N-四糖标准储备溶液 2.50 mL、乳糖-N-新四糖标准储备溶液 2.50 mL、3'-唾液酸乳糖标准储备溶液 2.50 mL 和 6'-唾液酸乳糖标准储备溶液 2.50 mL 于 25 mL 容量瓶中,用水定容,混匀。混合标准中间溶液中目标分析物的浓度分别为 2'-岩藻糖基乳糖 500 mg/L、3-岩藻糖基乳糖 500 mg/L、乳糖-N-四糖 250 mg/L、乳糖-N-新四糖 250 mg/L、3'-唾液酸乳糖 250 mg/L 和 6'-唾液酸乳糖 250 mg/L。临用前配制,室温放置。

4.4.3 混合标准系列工作溶液:分别准确吸取混合标准中间溶液(见 4.4.2)0.10 mL、0.20 mL、1.00 mL、2.00 mL、6.00 mL、10.00 mL 于 6 个 50 mL 容量瓶,用水定容,混匀,得到 2'-岩藻糖基乳糖浓度为 1 mg/L、2 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、60 mg/L、100 mg/L,3-岩藻糖基乳糖浓度为 1 mg/L、2 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、60 mg/L、100 mg/L,乳糖-N-四糖浓度为 0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L,乳糖-N-新四糖浓度为 0.5 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L,3'-唾液酸乳糖浓度为 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。混合标准系列工作溶液于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可放置 3 个月,于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可放置 5 d。

注:如果目标分析物的标准品中含有其他目标分析物,则该目标分析物的标准中间溶液和标准系列工作溶液应单独配制。

4.5 材料

- 4.5.1 滤膜:0.45 μm 。
- 4.5.2 烧杯:10 mL、500 mL 和 2 L。
- 4.5.3 离心管:50 mL。
- 4.5.4 容量瓶:10 mL、25 mL、50 mL 和 2 L。
- 4.5.5 注射型过滤器:尼龙,0.2 μm 。

5 仪器和设备

- 5.1 离子色谱:配有三元及以上梯度泵、脉冲安培检测器。
- 5.2 分析天平:感量 0.01 g、0.001 g 和 0.1 mg。
- 5.3 恒温水浴锅: $40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.4 磁力搅拌器。

- 5.5 涡旋混合器。
5.6 氮吹仪。
5.7 超纯水仪。

6 分析步骤

6.1 试样制备

6.1.1 标签中标注添加低聚果糖或未知成分的试样

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。准确称取上述液体 1 g(m_3 ,精确至 0.001 g)于 25 mL(V)容量瓶中,加入果聚糖酶溶液 15 μ L(每 1 g 固态复溶试样至少需要果聚糖酶 30 U),用水定容,混匀并转移至 50 mL 离心管中,加盖,置于恒温水浴锅中 40 $^{\circ}$ C 酶解 30 min,酶解后取出并静置至室温,注射型过滤器过滤后进样分析。

6.1.1.2 液态试样:准确称取试样 1 g(m_3 ,精确至 0.001 g)于 25 mL(V)容量瓶中,加入果聚糖酶溶液 15 μ L(每 1 g 液态试样至少需要果聚糖酶 30 U),用水定容,混匀并转移至 50 mL 离心管中,加盖,置于恒温水浴锅中 40 $^{\circ}$ C 酶解 30 min,酶解后取出并静置至室温,注射型过滤器过滤后进样分析。

6.1.2 标签中标注无低聚果糖的试样

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。准确称取上述液体 1 g(m_3 ,精确至 0.001 g)于 25 mL(V)容量瓶中,用水定容,混匀,注射型过滤器过滤后进样分析。

6.1.2.2 液态试样:准确称取试样 1 g(m_3 ,精确至 0.001 g)于 25 mL(V)容量瓶中,用水定容,混匀,注射型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:CarboPacTM PA1 预柱或等效柱(4 mm \times 50 mm,粒径 10.0 μ m)、CarboPacTM PA1 分离柱或等效柱(4 mm \times 250 mm,粒径 10.0 μ m)。

6.2.1.2 柱温:20 $^{\circ}$ C。

6.2.1.3 流速:1 mL/min。

6.2.1.4 进样量:5 μ L。

6.2.1.5 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 离子色谱梯度洗脱条件

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

表 1 离子色谱梯度洗脱条件(续)

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%	曲线类型
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 波形：碳水化合物检测四电位波形。

6.3 标准曲线的制作

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的质量浓度为横坐标，以混合标准系列工作溶液的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。6种母乳低聚糖标准品溶液的离子色谱图示例见图 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±2.5%），记录目标分析物的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中目标分析物的质量浓度。

7 分析结果的表述

按公式（1）计算试样中6种母乳低聚糖的含量：

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

式中：

X_i —— 试样中目标分析物的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

c —— 由标准曲线得到的试样溶液中目标分析物的浓度，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'-唾液酸乳糖钠盐应转换成 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：唾液酸乳糖的相对分子质量为 633.55，唾液酸乳糖钠盐的相对分子质量为 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应超过算术平均值的 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，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，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

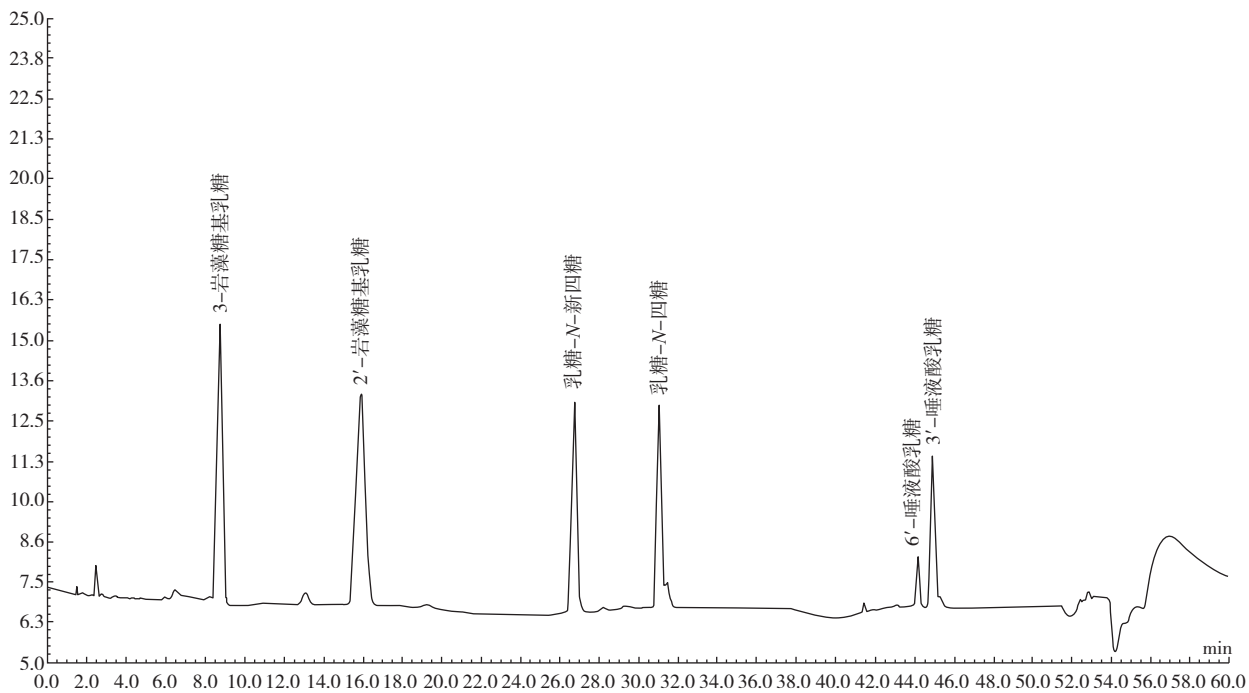


图 A.1 6 种母乳低聚糖标准品溶液离子色谱图示例