

ICS 67.050
X04

团体标准

T/CIFST XXX-2021

食品中 2'-岩藻糖基乳糖的测定 离子色谱法

Determination of 2'-fucosyllactose in foods
using ion chromatography

(征求意见稿)

2021-XX-XX 发布

2021-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 2'-岩藻糖基乳糖的测定 离子色谱法

1 范围

本标准规定了食品中 2'-岩藻糖基乳糖（包括游离及物理结合态；参与化学反应的 2'-岩藻糖基乳糖除外）的离子色谱测定方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品、调制乳粉和特殊医学用途配方食品中 2'-岩藻糖基乳糖含量的测定。

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

试样经酶解去除低聚糖、麦芽糊精等干扰组分后，离子色谱法分离，脉冲安培检测器检测，外标法定量。

4 试剂与材料

注：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（NaOH）溶液，50% w/w：色谱纯。
- 4.1.2 乙酸钠（CH₃COONa）：纯度≥99%。
- 4.1.3 淀粉转葡萄糖苷酶（Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*）：≥70 U/mg。
- 4.1.4 β-半乳糖苷酶（β-Galactosidase from *Aspergillus niger*）：≥4000 U/mL。
- 4.1.5 冰乙酸（CH₃COOH）：纯度≥99.7%。
- 4.1.6 2'-岩藻糖基乳糖（C₁₈H₃₂O₁₅，CAS 号：41263-94-9）：纯度≥90%。

4.2 试剂配制

- 4.2.1 氢氧化钠溶液（0.5 mol/L, 2 L）：称取 80.0 g 质量分数为 50%的 NaOH 溶液，用水稀释至 2 L，混匀后持续通入氮气 10 分钟。该溶液在室温下 1 个月内稳定。
- 4.2.2 乙酸钠溶液（0.3 mol/L, 2 L）：称取 49.25 g 乙酸钠，用水溶解并稀释至 2 L，混匀后持续通入氮气 10 分钟。该溶液在室温下 1 个月内稳定。

4.2.3 氢氧化钠溶液 (0.1 mol/L, 0.5 L): 称取 4.0 g 质量分数为 50% 的 NaOH 溶液, 用水稀释至 0.5 L, 混匀。室温下可保存 1 个月。

4.2.4 乙酸钠缓冲液 (pH 4.5): 称取 6.0 g 冰乙酸, 用水稀释至 400 mL, 混匀。用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 (4.2.3) 调节溶液 pH 至 4.5 ± 0.1 。贮存于 2℃~8℃ 冰箱中, 可保存 1 个月。

4.2.5 淀粉转葡萄糖苷酶溶液 (70 U/mL): 称取适量淀粉转葡萄糖苷酶 (每个试样需 2.8 U 淀粉转葡萄糖苷酶) 于离心管中, 加入乙酸钠缓冲液 (4.2.4) 调节浓度 70 U/mL, 混匀。该溶液在使用当天制备, 并贮存于 4℃ 冰箱中直至使用。

4.2.6 酶混合溶液: 将淀粉转葡萄糖苷酶溶液 (4.2.5) 和 β -半乳糖苷酶 (4000 U/mL) 按 4:1 的比例混合 (每个试样需 2.8 U 淀粉转葡萄糖苷酶和 40 U β -半乳糖苷酶), 该溶液在使用当天制备, 并贮存于 4℃ 冰箱中直至使用。

4.3 标准溶液配制

4.3.1 2'-岩藻糖基乳糖标准储备液 (5000 mg/L): 准确称取 100 mg (精确到 0.1 mg) 2'-岩藻糖基乳糖标准品于 20 mL 容量瓶中, 加水溶解并定容至刻度, 混匀。标准储备液于 -80℃ 冰箱可保存 1 年, 于 -18℃ 冰箱可保存 3 个月。

4.3.2 2'-岩藻糖基乳糖标准中间液 (500 mg/L): 准确吸取 2'-岩藻糖基乳糖标准储备液 (4.3.1) 5.00 mL 于 50 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度。临用前配制。

4.3.3 2'-岩藻糖基乳糖标准系列工作液: 从 2'-岩藻糖基乳糖标准中间液 (4.3.2) 中准确吸取 0.10 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.50 mL、5.00 mL、10.00 mL、12.00 mL 溶液至 7 个 50 mL 容量瓶, 加水定容至刻度, 得到 2'-岩藻糖基乳糖浓度为 1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、120 mg/L 的系列标准工作液。标准工作液于 -18℃ 冰箱可保存 3 个月, 于 -4℃ 冰箱可保存 5 天。

5 仪器和设备

5.1 离子色谱: 高效阴离子交换色谱仪, 带脉冲安培检测器。

5.2 混合腔: Dionex gradient mixer GM3 或等效柱。

5.3 预柱: CarboPac™ PA-1 Guard Column 或等效柱。

5.4 分离柱: CarboPac™ PA-1 Analytical Column 或等效柱。

5.5 分析天平: 感量为 0.1 mg 和 0.01 g。

5.6 恒温水浴锅: $60^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 。

5.7 pH 计: 精度为 ± 0.01 。

5.8 磁力搅拌器。

5.9 涡旋混合器。

5.10 氮吹仪。

5.11 超纯水仪。

5.12 0.22 μm 尼龙滤膜。

5.13 离心管: 15 mL。

5.14 容量瓶: 20 mL、50 mL 和 500 mL。

6 分析步骤

6.1 样品前处理

6.1.1 样品中 2'-岩藻糖基乳糖含量在 ≤ 180 mg/100 g 乳粉或 20 mg/100 mL 液态乳

6.1.1.1 固态试样：准确称取 25 g 试样(m_1 ，精确到 0.01 g)，加水 200 g (m_2 ，精确到 0.01 g)，磁力搅拌 15 min。准确吸取 200 μ L (V_1) 上述液体于 15 mL 离心管中，加入 50 μ L 酶混合溶液 (4.2.6)，加水至 2 mL (V_2)。拧紧离心管盖，涡旋混匀，放置于 60 $^{\circ}$ C 水浴锅中酶解 2 h，酶解完成后静置待样品恢复至室温，0.2 μ m 尼龙滤膜过滤后进样分析。

6.1.1.2 液态试样：准确吸取 200 μ L (V_1) 液体试样于 15 mL 离心管中，加入 50 μ L 酶混合溶液 (4.2.6)，加水至 2 mL (V_2)。拧紧离心管盖，涡旋混匀，放置于 60 $^{\circ}$ C 水浴锅中酶解 2 h，酶解完成后静置待样品恢复至室温，0.2 μ m 尼龙滤膜过滤后进样分析。

6.1.2 样品中 2'-岩藻糖基乳糖含量在 >180 mg/100 g 乳粉或 20 mg/100 mL 液态乳

6.1.2.1 固态试样：准确称取 25 g 试样(m_1 ，精确到 0.01 g)，加水 200 g (m_2 ，精确到 0.01 g)，磁力搅拌 15 min。准确吸取 200 μ L (V_1) 上述液体于 15 mL 离心管中，加入 50 μ L 酶混合溶液 (4.2.6)，加水至 2 mL。拧紧离心管盖，涡旋混匀，放置于 60 $^{\circ}$ C 水浴锅中酶解 2 h，酶解完成后静置待样品恢复至室温，加水至 10 mL (V_2)，混匀，0.2 μ m 尼龙滤膜过滤后进样分析。

6.1.2.2 液态试样：准确吸取 200 μ L (V_1) 液体试样于 15 mL 离心管中，加入 50 μ L 酶混合溶液 (4.2.6)，加水至 2 mL。拧紧离心管盖，涡旋混匀，放置于 60 $^{\circ}$ C 水浴锅中酶解 2 h，酶解完成后静置待样品恢复至室温，加水至 10 mL (V_2)，混匀，0.2 μ m 尼龙滤膜过滤后进样分析。

6.2 仪器参考条件

6.2.1 离子色谱参考条件

- 色谱柱：CarboPacTM PA1 保护柱 (4 mm $\times$ 50 mm) 和 CarboPacTM PA1 色谱柱 (4 mm $\times$ 250 mm)，或具同等性能的色谱柱。
- 柱温：25 $^{\circ}$ C。
- 流速：1 mL/min。
- 进样量：5 μ L。
- 柱压：1000~2500 psi。
- 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。液相色谱梯度洗脱条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间 (min)	A%	B%	C%	曲线(Curve)
0.00	92	8	0	5
17.00	92	8	0	5
17.01	88	12	0	5
33.00	88	12	0	5
33.01	0	20	80	5
38.00	0	20	80	5
38.01	92	8	0	5
48.00	92	8	0	5

6.2.2 安培检测器参考条件

- a) 参比电极：氯化钾饱和的银/氯化银（Ag/AgCl）
- b) 工作电极：金电极（Au）
- c) 辅助电极：钛（Ti）
- d) 电位：碳水化合物四极电位（carbohydrate tetrad potential）

6.3 样品溶液的测定

将待测样品溶液注入离子色谱中，得到 2'-岩藻糖基乳糖的响应值，根据标准曲线得到待测液中 2'-岩藻糖基乳糖的浓度。

7 标准曲线绘制和结果计算

7.1 绘制标准曲线

将标准系列工作液分别注入离子色谱中，测定 2'-岩藻糖基乳糖标准工作液的峰面积，以标准系列工作液中 2'-岩藻糖基乳糖的浓度为横坐标，以待测样品前后两套标准系列工作液中 2'-岩藻糖基乳糖的平均峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。标准曲线拟合方式可选择线性或二次曲线拟合不强制过零点，曲线方程的相关系数不小于 0.999。

7.2 结果计算

在标准曲线中代入待测样品溶液的响应值，求得待测样品溶液中 2'-岩藻糖基乳糖的浓度。按照式（1）求得待测样品中 2'-岩藻糖基乳糖的含量。

$$X = \frac{C \times V_2}{V_1} \times f \times 10^{-1} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X ——待测样品中 2'-岩藻糖基乳糖的含量，固态试样单位为毫克每百克（mg/100 g），液态试样单位为毫克每百毫升（mg/100 mL）；

C ——由标准曲线得到的待测样品溶液中 2'-岩藻糖基乳糖的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V_1 ——取样体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——定容体积，单位为毫升（mL）；

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

10^{-1} ——换算系数。

注：1. 以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留小数点后两位有效数字。

2. 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%。

8 检出限及定量限

对于固态试样，本方法对 2'-岩藻糖基乳糖的检出限为 4.70 mg/100 g，定量限为 32.78 mg/100 g；对于液态试样，本方法对 2'-岩藻糖基乳糖的检出限为 0.52 mg/100 mL，定量限为 3.64 mg/100 mL。

9 质量控制

9.1 平衡系统

- a) 清洗自动器进样针至少三遍，检查注射器中是否有气泡，清除注射器上的气泡。
- b) 更换流动相后，使用新制备的洗脱液以 6 mL/min 的流速冲洗管路至少 5 分钟。
- c) 在开始运行序列前，以初始洗脱条件平衡系统至少 5 分钟。
- d) 在开始进标准品前，连续进六针质控样以确保仪器精密度。

9.2 进样顺序

- a) 在冲洗管路并以初始洗脱条件平衡系统 5 min 后，应采用以下进样顺序：连续六针质控样—2'-岩藻糖基乳糖标准系列工作液—试样（推荐 10 个~18 个，可根据实际情况调整，上下两套标准工作液相应峰面积漂移： $\leq 1 \text{ mg/L}$ 时，不超过 15%； $> 1 \text{ mg/L}$ 时，不超过 10%）—2'-岩藻糖基乳糖标准系列工作液。
- b) 在没有破坏标准系列工作液和试样的重复模式情况下，序列可按标准系列工作液和试样的顺序交替进行，无需重新注入连续六针质控样。

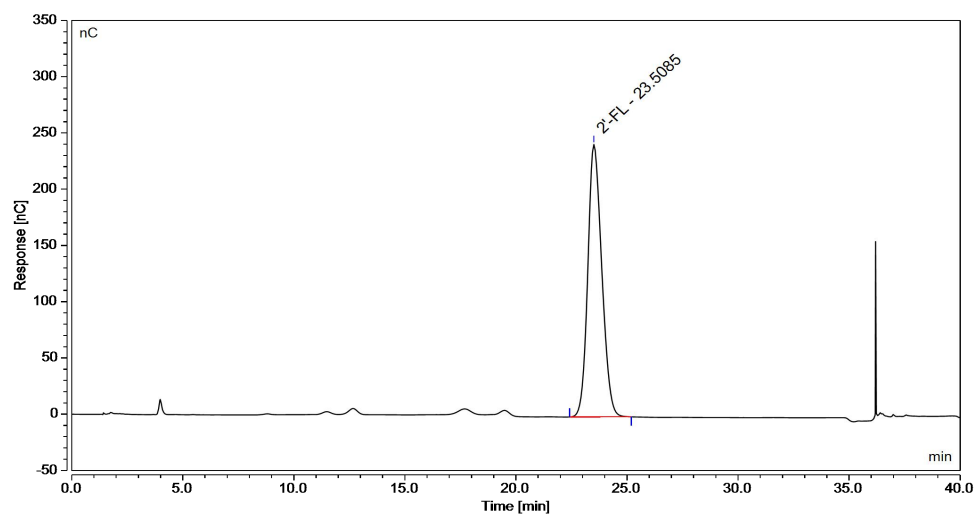
9.3 积分及线性

- a) 线性不强制过零点（LOff）和二次曲线拟合不强制过零点（QOff）。
- b) 可以接受在标准系列工作液中 7 个水平上减去 1 个水平进行标准曲线计算，线性 ≥ 0.999 。

附 录 A
(规范性)
谱图示例

A. 1 2'-岩藻糖基乳糖标准溶液典型谱图

2'-岩藻糖基乳糖标准溶液典型谱图示例见A.1。



图A. 1 2'-岩藻糖基乳糖标准溶液典型谱图示例

A. 2 婴幼儿配方食品中2'-岩藻糖基乳糖的典型谱图

婴幼儿配方食品中2'-岩藻糖基乳糖的典型谱图示例见A.2。

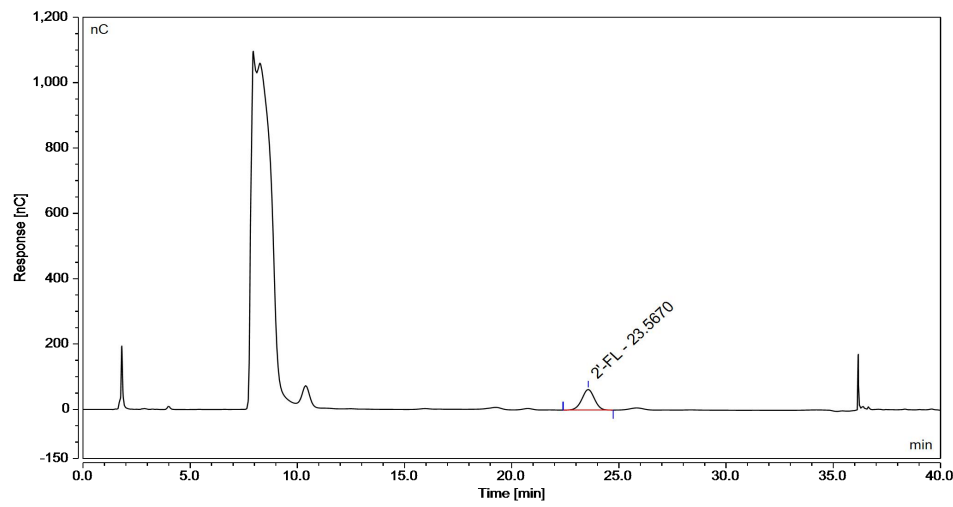


图 A. 2 婴幼儿配方食品中 2'-岩藻糖基乳糖的典型谱图示例