中华人民共和国国家标准

GB ××××—××××

食品安全国家标准
食品中低聚半乳糖的测定

（征求意见稿）

××××-××-××发布　　××××-××-××实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局　发布

食品安全国家标准
食品中低聚半乳糖的测定

1 范围

本标准规定了食品中低聚半乳糖的液相色谱测定的方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品（不包括特殊医学用途婴儿配方食品）、婴幼儿辅助食品、乳制品、饮料、焙烤食品中低聚半乳糖的测定。本标准不适用于同时含有其他低聚还原性物质食品中低聚半乳糖的测定。

2 原理

试样中的低聚半乳糖（n为2~7）经水溶液提取、2-氨基苯甲酰胺衍生，用淀粉葡糖苷酶酶解去除麦芽糊精、淀粉干扰后，用高效液相色谱-荧光检测器检测。采集的色谱峰根据用相同试验条件下液相色谱串联质谱法确定的相同聚合度的低聚半乳糖的保留时间定性，采用相对应聚合度和分子量的麦芽糖类聚糖标准物质外标法定量，扣除乳糖、麦芽糖含量后，得出低聚半乳糖含量。

3 试剂和材料

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

3.1 试剂

3.1.1 二甲基亚砜（C_2H_6OS）：色谱纯。

3.1.2 2-氨基苯甲酰胺（$C_7H_8N_2O$）。

3.1.3 氰基硼氢化钠（CH_3BNNa）。

3.1.4 乙酸（CH_3COOH）。

3.1.5 乙酸铵（CH_3COONH_4）。

3.1.6 甲酸铵（$HCOONH_4$）。

3.1.7 甲酸（HCOOH）。

3.1.8 乙腈（C_2H_3N）：色谱纯。

3.1.9 淀粉葡糖苷酶（CAS：9032-08-0）：酶活力≥60 U/mg。

注：酶活力测定方法参考 GB 1886.174-2016 A.3 部分。

3.2 试剂配制

3.2.1 乙酸-二甲基亚砜溶液（3+7，体积比）：分别量取 3 mL 乙酸和 7 mL 二甲基亚砜在烧杯中混合均匀，备用。临用现配。

3.2.2 2-氨基苯甲酰胺衍生溶液（0.35 mol/L）：准确称取 476 mg 2-氨基苯甲酰胺和 630 mg 氰基硼氢化钠于烧杯中，用 10 mL 乙酸-二甲基亚砜溶液（3+7）溶解，混合均匀。临用现配。

注：氰基硼氢化钠试剂剧毒、高度易燃、对环境有危险，谨遵试剂使用说明规范。衍生溶液配制过程中应穿

戴个人防护装备，在通风柜下进行所有操作。

3.2.3 乙酸铵溶液（0.2 mol/L，pH 4.5±0.1）：称取 1.54 g 乙酸铵，用 80 mL 水溶解后，用乙酸调节 pH 至 4.5±0.1，用水稀释至 100 mL。临用现配。

3.2.4 淀粉葡糖苷酶溶液（180 U/mL）：称取活性约大于 900 U 的淀粉葡糖苷酶溶于 5 mL 乙酸铵溶液（0.2 mol/L pH 4.5±0.1）中，搅拌至完全溶解。临用现配。

3.2.5 甲酸铵溶液（50 mmol/L，pH 4.4±0.1）：称取 3.15 g 甲酸铵，用 900 mL 水溶解后，用甲酸调节 pH 至 4.4±0.1，用水稀释至 1000 mL。临用现配。

3.3 标准品

3.3.1 麦芽糖标准品（$C_{12}H_{22}O_{11}$，CAS 号：69-79-4）纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.2 麦芽三糖标准品（$C_{18}H_{32}O_{16}$，CAS 号：1109-28-0）纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.3 麦芽四糖标准品（$C_{24}H_{42}O_{21}$，CAS 号：34612-38-9）纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.4 麦芽五糖标准品（$C_{30}H_{52}O_{26}$，CAS 号：34620-76-3）纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.5 麦芽六糖标准品（$C_{36}H_{62}O_{31}$，CAS 号：34620-77-4）纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.6 麦芽七糖标准品（$C_{42}H_{72}O_{36}$，CAS 号：34620-78-5）纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.7 乳糖标准品（$C_{12}H_{22}O_{11}$，CAS 号：63-42-3）纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液（10.0 mg/mL）：分别准确称取 100 mg（精确至 0.1 mg）的乳糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖标准品，用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将各标准储备液转移至储液瓶中，于 4 ℃保存，保存期 1 个月。

3.4.2 混合标准中间液（1.0 mg/mL）：吸取各标准储备液（10.0 mg/mL）1.00 mL 于 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀。临用现配。

3.4.3 混合标准使用液（100.00 μg/mL）：吸取混合标准中间液（1.0 mg/mL）1.00 mL 于 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀。临用现配。

3.4.4 混合标准系列工作液：分别吸取混合标准中间液（1.0 mg/mL）1.00 mL、2.50 mL、5.00 mL 于 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀。分别吸取混合标准使用液（100.00 μg/mL）0.10 mL、1.00 mL、5.00 mL 于 10mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀。混合标准系列工作液的质量浓度分别为 1.00 μg/mL、10.00 μg/mL、50.00 μg/mL、100.00 μg/mL、250.00 μg/mL 和 500.00 μg/mL。临用现配。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪：配备荧光检测器。

4.2 天平：感量为 0.1 mg 和 1 mg。

4.3 pH 计：精度为 0.01。

4.4 涡旋混合器。

4.5 恒温水浴锅。

4.6 粉碎机。

4.7 离心机。

4.8 有机微孔滤膜：0.22 μm。

5 分析步骤

5.1 样品前处理

5.1.1 试样制备

取有代表性的样品至少 200 g，液态样品摇匀；基质均匀的半固态和粉状样品混匀；其他样品需匀浆或粉碎均匀。制备好的试样于 0 ℃~5 ℃保存，备用。

5.1.2 其他低聚还原性物质鉴别

试样按附录 A 方法进行其他低聚还原性物质鉴别，如无其他低聚还原性物质干扰，则本方法适用，可进行 5.1.3 试样处理。

5.1.3 试样处理

称取 1.000 g 试样于 50 mL 烧杯中用水溶解，转移至 50 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀，作为试样液，待用。吸取 20 μL 试样液于 2 mL 离心管中，加入 200 μL 2-氨基苯甲酰胺衍生溶液，涡旋混合 30 s，在 60 ℃水浴中保温 120 min，取出放至室温，加入 1 mL 乙酸铵溶液（0.2 mol/L，pH 4.5±0.1）涡旋混合 30 s。再移取 0.50 mL 混合溶液于 2 mL 离心管中，加入 200 μL 淀粉葡糖苷酶溶液（180 U/mL），在 50 ℃水浴中保温 30 min，取出放至室温，加入 0.70 mL 乙腈，混匀后 6000 r/min 离心 5 min，上清液用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤后，供高效液相色谱测定。

5.1.4 空白试验

称取与试样相同质量的水于 50 mL 容量瓶中，以下步骤按 5.1.3 与试样同时处理。

5.1.5 标准系列工作液衍生

移取 20 μL 标准系列工作溶液，加入 200 μL 2-氨基苯甲酰胺衍生溶液，涡旋混合 30 s，在 60 ℃水浴中保温 120 min，取出放至室温，加入 1 mL 乙酸铵溶液（0.2 mol/L，pH 4.5±0.1）涡旋混合 30 s。再移取 0.50 mL 混合溶液于 2 mL 离心管中，加入 200 μL 乙酸铵溶液（0.2 mol/L，pH 4.5±0.1），加入 0.70 mL 乙腈，混匀后 6000 r/min 离心 5 min，上清液用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤后，供高效液相色谱测定。

5.2 仪器参考条件

5.2.1 色谱柱：酰胺基键合的表面多孔型硅胶色谱柱（150 mm×4.6 mm（内径），粒径 2.7 μm），或等效柱。

5.2.2 流动相：流动相 A：甲酸铵溶液（50 mmol/L，pH 4.4±0.1）；流动相 B：乙腈。

5.2.3 流动相流速：1.0 mL/min，流动相梯度洗脱程序参见附录 B.1。

5.2.4 检测器：荧光检测器，激发波长 355 nm，发射波长 430 nm。

5.2.5 柱温：30 ℃。

5.2.6 进样体积：20 μL。

5.3 标准曲线的制作

将混合标准系列工作液衍生液分别注入高效液相色谱仪中，测定不同聚合度麦芽糖类标准品和乳糖衍生物色谱图峰面积，以混合标准系列工作液中的麦芽糖类标准品和乳糖标准品浓度为横坐标，以不同聚合度麦芽糖类标准品衍生物的峰面积为纵坐标，绘制不同聚合度麦芽糖类标准品和乳糖衍生物标准曲线。不同聚合度麦芽糖类标准品和乳糖衍生物溶液的色谱图参见附录C图C.1。

5.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，参见附录D确定不同聚合度糖的保留时间段，分别记录各聚合度糖衍生物的峰面积之和以及乳糖、麦芽糖衍生物峰面积，根据对应聚合度标准品衍生物的标准曲线分别计算试样溶液中不同聚合度糖的浓度，根据乳糖和麦芽糖标准品衍生物的标准曲线分别计算试样溶液中乳糖和麦芽糖的浓度。试样衍生后色谱图参见附录C图C.2。

6 分析结果的表述

试样中低聚半乳糖含量 X 按公式（1）计算：

$$X = \frac{(\sum \rho_{DPi} - \rho_0 - \rho_{乳糖} - \rho_{麦芽糖}) \times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（1）$$

式中：

X——试样中低聚半乳糖含量，单位为克每千克（g/kg）；

V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

ρ_{DPi}——由标准曲线得到的不同聚合度糖衍生物的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）（i=2~7）；

ρ_0——空白试样溶液中衍生物的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

$\rho_{乳糖}$——试样溶液中乳糖衍生物的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

$\rho_{麦芽糖}$——试样溶液中麦芽糖衍生物的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——试样质量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

计算结果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，保留 3 位有效数字。

7 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15%。

8 其他

当称样量为 1.000 g 时，检出限为 1.0 g/kg，定量限为 3.0 g/kg。

附录 A

其他低聚还原性物质鉴别方法

A.1 原理

试样溶液采用淀粉葡糖苷酶除麦芽糊精、淀粉干扰后，β-半乳糖苷酶水解样品中的乳糖和低聚半乳糖后，经 2-氨基苯甲酰胺衍生，用高效液相色谱-荧光检测器检测。将采集信号根据糖聚合度保留时间分段后分别峰加和，采用相对应聚合度麦芽糖类聚糖标准物质外标法分别定量后计算总的衍生物含量，扣除空白溶液和麦芽糖衍生物含量后计算其他低聚还原性物质总含量。若试样中其他低聚还原性物质总含量大于定量限，则标准方法不适用于该试样中低聚半乳糖的测定。

A.2 试剂

A.2.1 β-半乳糖苷酶溶液：酶活力≥4000 U/mL。

注：酶活力测定方法参考 GB/T 33409-2016。对于不同批次的 β-半乳糖苷酶溶液在使用前需进行质量验证。

A.2.2 乙腈溶液（75%，体积分数）：量取 75 mL 乙腈加水稀释至 100 mL。

其他同 3 试剂。

A.3 仪器和设备

同 4 仪器和设备。

A.4 分析步骤

A.4.1 β-半乳糖苷酶溶液验证

A.4.1.1 β-半乳糖苷酶溶液处理

吸取 700 μL 水于 2 mL 离心管中，加入 50 μLβ-半乳糖苷酶溶液（4000 U/mL），涡旋混合 30 s，在 60 ℃水浴中保温 120 min，随后水浴温度升至 100 ℃保温 5 min，取出 4℃冷却。吸取 20 μL 混合溶液于 2 mL 离心管中，加入 200 μL 2-氨基苯甲酰胺衍生溶液，涡旋混合 30 s，在 60 ℃水浴中保温 120 min，取出放至室温，加入 1 mL 乙腈溶液（75%），混匀后 6000 r/min 离心 5 min，上清液用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤后，供高效液相色谱测定。

A.4.1.2 标准系列工作液处理

移取 500 μL 标准系列工作溶液，加入 250 μL 水，涡旋混合 30 s。吸取 20 μL 混合溶液于 2 mL 离心管中，加入 200 μL 2-氨基苯甲酰胺衍生溶液，涡旋混合 30 s，在 60 ℃水浴中保温 120 min，取出放至室温，加入 1 mL 乙腈溶液（75%），混匀后 6000 r/min 离心 5 min，上清液用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤后，供高效液相色谱测定。

A.4.1.3 验证规则

按照 A.4.3 仪器参考条件、A.4.4 标准曲线的制作、A.4.5 试样溶液的测定对处理后的 β-半乳糖苷酶衍生液进行测定，计算溶液中其他低聚还原性物质含量，若含量小于检出限 1.0 g/kg，则酶溶液验证合格，可进行试样前处理步骤。

A.4.2 样品前处理

A.4.2.1 试样处理

称取 1.000 g 试样于 50 mL 烧杯中用水溶解，转移至 50 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀，作为试样液，待用。吸取 500 μL 试样液于 2 mL 离心管中，加入 200 μL 淀粉葡糖苷酶溶液（180 U/mL），50 μLβ-半乳糖苷酶溶液（4000 U/mL），涡旋混合 30 s，在 60 ℃水浴中保温 120 min，随后水浴温度升至 100 ℃保温 5 min，取出 4℃冷却。吸取 20 μL 混合溶液于 2 mL 离心管中，加入 200 μL 2-氨基苯甲酰胺衍生溶液，涡旋混合 30 s，在 60 ℃水浴中保温 120 min，取出放至室温，加入 1 mL 乙腈溶液（75%），混匀后 6000 r/min 离心 5 min，上清液用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤后，供高效液相色谱测定。

A.4.2.2 空白试验

称取与试样相同质量的水，以下步骤按 A.4.2.1 与试样同时处理。

A.4.3 仪器参考条件

同 5.2 仪器参考条件。

A.4.4 标准曲线的制作

将混合标准系列工作液衍生液分别注入高效液相色谱仪中，测定不同聚合度麦芽糖类标准品和乳糖衍生物色谱图峰面积，以混合标准系列工作液中的麦芽糖类标准品和乳糖标准品浓度为横坐标，以同聚合度麦芽糖类标准品衍生物的峰面积为纵坐标，绘制不同聚合度麦芽糖类标准品和乳糖衍生物标准曲线。

A.4.5 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，参见附录 D 确定不同聚合度糖的保留时间段，分别记录各聚合度糖衍生物的峰面积之和以及麦芽糖衍生物峰面积，根据对应聚合度标准品衍生物的标准曲线分别计算试样溶液中不同聚合度糖的浓度，根据麦芽糖标准品衍生物的标准曲线计算试样溶液中麦芽糖的浓度。

A.5 分析结果的表述

试样中其他低聚还原性物质含量 W 按公式（2）计算：

$$W = \frac{(\sum \rho_{DPi} - \rho_0 - \rho_{麦芽糖}) \times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

W——试样中其他低聚还原性物质含量，单位为克每千克（g/kg）；

V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

ρ_{DPi}——由标准曲线得到的不同聚合度糖衍生物的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）（i=2~7）；

ρ_0——空白试样溶液中衍生物的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

$\rho_{麦芽糖}$——试样溶液中麦芽糖衍生物的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——试样质量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

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，计算结果保留三位有效数字。

A.6 鉴别规则

其他低聚还原性物质含量大于定量限3.0 g/kg，则视为样品中含有其他低聚还原性物质。

附录 B

流动相洗脱程序

流动相洗脱程序见表 B.1。

表 B.1 流动相洗脱梯度程序

时间 min	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0.0	2	98
7.5	2	98
8.0	16	84
16.0	16	84
50.0	39	61
51.0	80	20
54.0	80	20
55.0	2	98
70.0	2	98

附录 C

标准溶液和试样溶液衍生物色谱图

标准溶液衍生物色谱图见图 C.1。

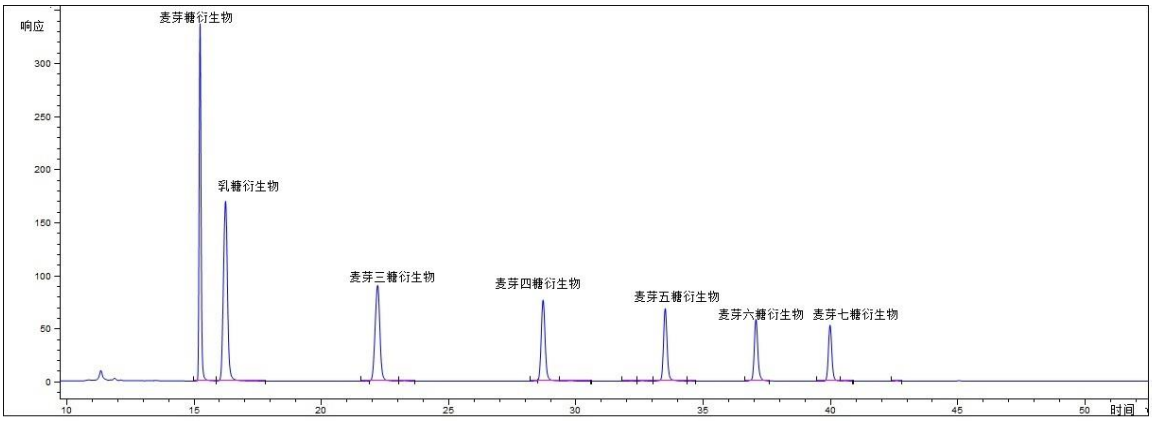

图 C.1 100 μg/mL 标准溶液衍生物色谱图

试样溶液衍生物色谱图见图 C.2。

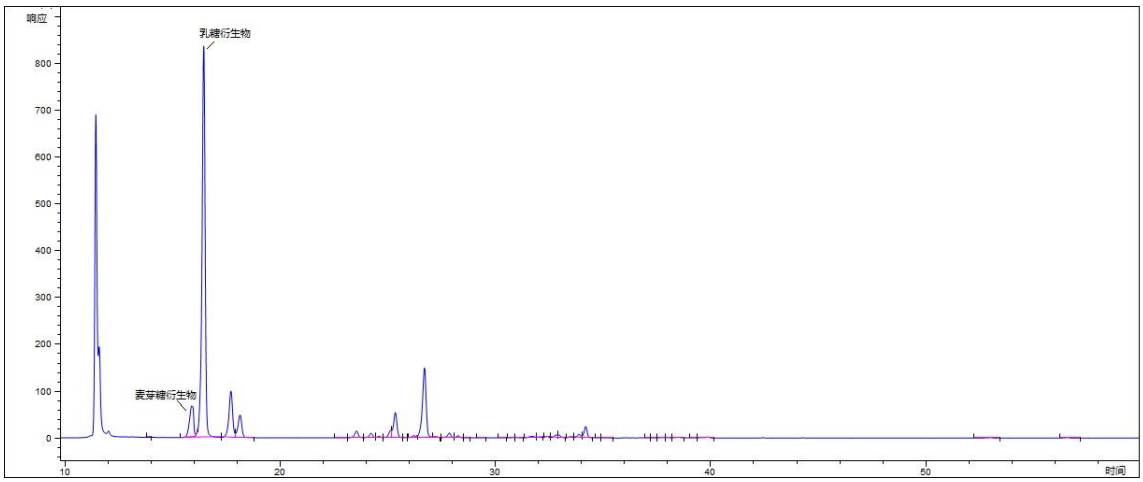

图 C.2 试样溶液衍生物色谱图

附录 D

液相色谱-质谱法确定不同聚合度糖保留时间段方法

D.1 原理

试样中的低聚半乳糖（n 为 2~7）经水溶液提取、2-氨基苯甲酰胺衍生，用淀粉葡糖苷酶酶解去除麦芽糊精、淀粉干扰后，用液相色谱串联质谱测定。提取不同聚合度糖衍生物的总离子流以确定不同聚合度糖保留时间段。

D.2 试剂和溶液

同 3 试剂。

D.3 仪器

D.3.1 液相色谱-质谱仪。

D.3.2 天平：感量为 0.1 mg 和 1 mg。

D.3.3 pH 计：精度为 0.01。

D.3.4 涡旋混合器。

D.3.5 恒温水浴锅。

D.3.6 离心机。

D.4 分析步骤

D.4.1 样品及标准溶液前处理

同 5 分析步骤。

D.4.2 仪器测定参考条件

D.4.2.1 色谱条件：与 5.2 仪器参考条件液相色谱测定的条件保持一致。其中柱后 4:1 分流。

D.4.2.2 质谱条件：推荐高分辨质谱仪。参考条件：ESI 源；负离子模式检测；全扫描模式扫描；扫描范围：100 m/z ~1700 m/z。推荐质谱参数：喷嘴电压 1000 V；毛细管电压 3500 V；碰撞电压为 130 V；锥孔电压 65 V；干燥气温度 350℃；干燥气流速 5 L/min；雾化器压力 45 psi；鞘气温度 350℃；鞘气流速 11 L/min。

D.4.3 溶液测定

将试样溶液注入液相色谱-质谱仪中，测试得到相应的不同聚合度糖衍生物的信号响应。

同时将标准溶液衍生溶液入液相色谱-质谱仪中，测试得到不同聚合度标准品衍生物的信号响应。

D.5 时间段判定方法

对不同聚合度糖衍生物的总离子流图进行分析，提取负离子模式下不同聚合度衍生物的分子离子数，数值见表 D.1，按照记录每个聚合度峰起始时间（$t_{DPi\,起始}$）到结束时间（$t_{DPi\,终止}$）的规则，确定不同聚合度的时间段（$t_{DPi\text{-}MS}$），参考图谱见图 D.1。

表 D.1 不同聚合度糖衍生物的分子离子数

聚合度	提取分子离子式	提取分子离子数 m/z
二糖	$[C_{12}H_{22}O_{11}+C_7H_8N_2\text{-}H]^-$	461.1777
三糖	$[C_{18}H_{32}O_{16}+C_7H_8N_2\text{-}H]^-$	623.2305
四糖	$[C_{24}H_{42}O_{21}+C_7H_8N_2\text{-}H]^-$	785.2833
五糖	$[C_{30}H_{52}O_{26}+C_7H_8N_2\text{-}H]^-$	947.3362
六糖	$[C_{36}H_{62}O_{31}+C_7H_8,\ N_2\text{-}H]^-$	1109.389
七糖	$[C_{42}H_{72}O_{36}+C_7H_8N_2\text{-}H]^-$	1271.442

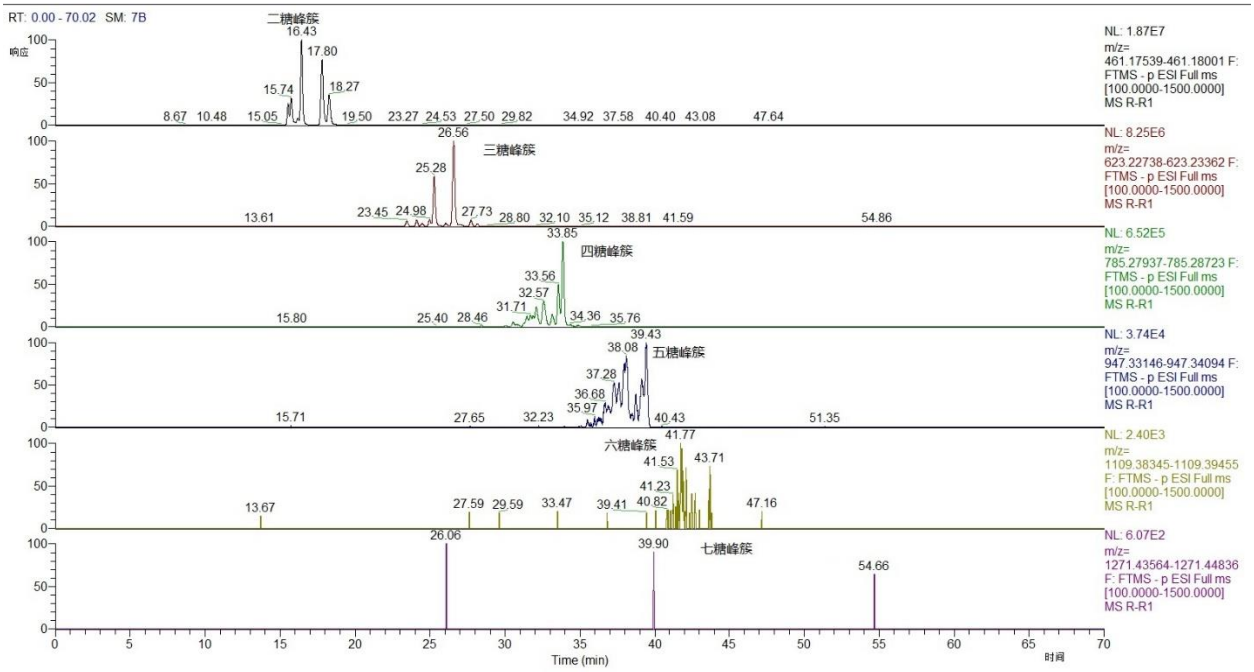

图 D.1 样品衍生溶液提取离子流图

如使用不同品牌的高效液相色谱仪，需将液相色谱-质谱法测定的麦芽糖衍生物的保留时间（$t_{麦芽糖\text{-}MS}$）与液相色谱法测定的麦芽糖衍生物的保留时间（$t_{麦芽糖\text{-}HPLC}$）进行校正，得出不同仪器间的相对死体积时间差（t_0）。该数值代入液相色谱-质谱法测定的不同聚合度糖保留时间段（$t_{DPi\text{-}MS}$）对液相色谱法测定的不同聚合度糖保留时间段（$t_{DPi\text{-}HPLC}$）进行校正，如果液相色谱-质谱法测定的麦芽糖衍生物的保留时间早于液相色谱法测定的麦芽糖衍生物的保留时间，则液相色谱-质谱法测定的不同聚合度糖保留时间段（$t_{DPi\text{-}MS}$）加上两仪器间的死体积时间差（t_0），反之则减去两仪器间的死体积时间差（t_0），可得到高效液相色谱仪测定的不同聚合度糖保留时间段（$t_{DPi\text{-}HPLC}$）。校正按公式（3）~公式（5）计算：

计算液相色谱-质谱仪和高效液相色谱仪死体积时间差：

$$t_0 = |t_{麦芽糖\text{-}MS} - t_{麦芽糖\text{-}HPLC}| \quad \cdots\cdots (3)$$

液相色谱-质谱法测定的不同聚合度糖保留时间段：

$$t_{DPi\text{-}MS}=t_{DPi\,起始}\sim t_{DPi\,终止} \quad \cdots\cdots（4）$$

液相色谱法测定的不同聚合度糖保留时间段：

$$t_{DPi\text{-}HPLC}=（t_{DPi\,起始}\pm t_0）\sim（t_{DPi\,终止}\pm t_0） \quad \cdots\cdots（5）$$

式中：

t_0——液相色谱-质谱仪和液相色谱仪死体积时间差，单位为分（min）；

$t_{麦芽糖\text{-}MS}$——液相色谱-质谱法测定的麦芽糖衍生物的保留时间，单位为分（min）；

$t_{麦芽糖\text{-}HPLC}$——液相色谱法测定的麦芽糖衍生物的保留时间，单位为分（min）；

$t_{DPi\text{-}MS}$——液相色谱-质谱法测定的不同聚合度糖保留时间段，单位为分（min）；

$t_{DPi\,起始}$——液相色谱-质谱法测定的不同聚合度糖峰起始时间，单位为分（min）；

$t_{DPi\,终止}$——液相色谱-质谱法测定的不同聚合度糖峰结束时间，单位为分（min）；

$t_{DPi\text{-}HPLC}$——液相色谱法测定的不同聚合度糖保留时间段，单位为分（min）。