ICS XXX
CCS XXX

团 体 标 准

T/SAFC 002—2024

婴幼儿配方乳粉及调制乳粉中7种母乳低聚糖的测定

Detection of Seven Human Milk Oligosaccharides (HMOs) in Infant Formula and Formulated Milk Powder

（征求意见稿）

XXXX-××-××发布 XXXX -××-××实施

上海市食品化妆品质量安全管理协会 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。

声明：本文件的知识产权归属上海市食品化妆品质量安全管理协会，未经上海市食品化妆品质量安全管理协会同意，不得印刷、销售。

本文件由上海市食品化妆品质量安全管理协会提出、归口，并组织实施。

本文件起草单位：雅士利国际集团有限公司、上海市质量监督检验技术研究院（上海婴幼儿营养研发中心）、蓝河营养品有限公司、宜品乳业（青岛）集团有限公司、上海花冠营养乳品有限公司、美赞臣营养品（中国）有限公司、安捷伦科技（中国）有限公司。

本文件主要起草人：XXX

首批承诺执行单位：XXX

婴幼儿配方乳粉及调制乳粉中7种母乳低聚糖的测定

Detection of Seven Human Milk Oligosaccharides (HMOs) in Infant Formula and Formulated Milk Powder

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉及调制乳粉中母乳低聚糖含量的方法。

本标准适用于婴幼儿配方乳粉和调制乳粉中母乳低聚糖的测定。

2 原理

此方法可对七种母乳低聚糖进行定量（2’-FL、3-FL、3’-SL、6’-SL、LNT、LNnT、DFL）。样品经水提取后，以淀粉葡萄糖苷酶或复合添加淀粉葡萄糖苷酶和β-半乳糖苷酶进行酶解，衍生后用荧光检测器检测，内标法定量。

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 乙腈（CH_3CN）：色谱纯。
3.1.2 乙酸（CH_3COOH）。
3.1.3 甲酸铵（NH_4HCO_2）：色谱纯。
3.1.4 二甲基亚砜（C_2H_6OS）。
3.1.5 2-甲基吡啶硼烷复合物（$C_6H_{10}BN$）。
3.1.6 2-氨基苯甲酰胺（$C_7H_8N_2O$）。
3.1.7 淀粉葡萄糖苷酶溶液（3260 U/mL）：Megazyme 提供，E-AMGDF-40ML，4 ° C 保存。
3.1.8 β-半乳糖苷酶溶液（4000 U/mL）：Megazyme 提供，E-BGLAN，4 ° C 保存。

3.2 试剂配制

3.2.1 50 mM甲酸铵溶液：称取6.3 g甲酸铵，用水溶解并稀释至2000 mL。

3.3 标准品

3.3.1 2’-岩藻糖基乳糖（2’-FL）（$C_{18}H_{32}O_{15}$，CAS 号：41263-94-9）：纯度≥98%。
3.3.2 3-岩藻糖基乳糖（3-FL）（$C_{18}H_{32}O_{15}$，CAS 号：41312-47-4）：纯度≥90%。

3.3.3 3'-唾液酸乳糖钠盐（3'-SL）（$C_{23}H_{38}NO_{19}Na$，CAS 号：128596-80-5）：纯度≥98%。
3.3.4 6'-唾液酸乳糖钠盐（6'-SL）（$C_{23}H_{38}NO_{19}Na$，CAS 号：157574-76-0）：纯度≥98%。
3.3.5 乳糖-N-四糖（LNT）（$C_{26}H_{45}NO_{21}$，CAS 号：14116-68-8）：纯度≥95%。
3.3.6 乳糖-N-新四糖（LNnT）（$C_{26}H_{45}NO_{21}$，CAS 号：13007-32-4）：纯度≥98%。
3.3.7 乳糖二岩藻糖基四糖（DFL）（$C_{24}H_{42}NO_{19}$，CAS 号：20768-11-0）：纯度≥95%。
3.3.8 昆布三糖（$C_{18}H_{32}O_{16}$，CAS号：3256-04-0）：纯度≥95%。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 混合标准储备液（1000 mg/L）：准确称取 2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、3'-唾液酸乳糖钠盐、6'-唾液酸乳糖钠盐、乳糖-N-四糖、乳糖-N-新四糖、乳糖二岩藻糖基四糖各 10 mg（精确至 0.1 mg），置于 10 mL 容量瓶中，加水溶解并定容至刻度，混匀。
3.4.2 内标储备液（100 mg/L）：准确称 0.01 g（精确至 0.1 mg）昆布三糖标准品，置于 100 mL 容量瓶中，加水溶解并定容至刻度，混匀。
3.4.3 混合标准工作液：分别准确量取混合标准储备液（3.4.1）10 μL、50 μL、100 μL、200 μL、500 μL，置于 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀。混合标准工作液的浓度分别为：1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L 、25 mg/L、50 mg/L，临用现配。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪：带荧光检测器。
4.2 涡旋振荡器。
4.3 水浴锅
4.4 天平：感量为 0.1 mg 和 0.01 g。
4.5 磁力搅拌器。
4.6 离心机。
4.7 0.45 μm PTFE 滤膜。

5 分析步骤

5.1 试样制备

乳粉充分混匀后，取适量有代表性的试样。称取 25.0 g（精确至 0.01 g）试样于烧杯中，然后加水搅拌至完全溶解，转移并定容至 250 mL 容量瓶中。混匀后再取 1.0 mL 溶解后的样液，置于 50 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀。

5.2 酶解

5.2.1 添加低聚半乳糖的样品

量取 0.1 mL 稀释后的样品提取液于 2 mL 微量离心管中，加入 50 μL 淀粉葡萄糖苷酶溶液（3.1.7）和 10 μL β-半乳糖苷酶溶液（3.1.8），混匀，于 60 ° C 的水浴中酶解 60 min。同时，再量取 0.1 mL 稀释后的样品提取液于另一 2 mL 微量离心管中，加入 50 μL 淀粉葡萄糖苷酶溶液（3.1.7），混匀，于 60 ° C 的水浴中酶解 60 min。
5.2.2 不添加低聚半乳糖的样品

量取 0.1 mL 稀释后的样品提取液于 2 mL 微量离心管中，加入 50 μL 淀粉葡萄糖苷酶溶液（3.1.7），混匀，于 60 ° C 的水浴中酶解 60 min。

5.3 试液衍生化

经过酶解后的样品，加入 10 μL 内标储备液（3.4.2）和 0.1 mL 衍生试剂（3.2.2），充分混匀，在 65 ° C 水浴中恒温 60 min，取出冷却至室温。向微量离心管中加入乙腈并定容至 1 mL，涡旋混合，过 0.45 μm PTFE 滤膜后，待测。

另取0.1 mL混合标准工作液（3.4.3），与试样同步进行衍生。

5.4 仪器参考条件

5.4.1 色谱柱

5.4.1.1 分析柱：XBridge Glycan BEH Amide，2.5 μm（填料粒径）或相当者。

5.4.1.2 保护柱：XBridge Glycan BEH Amide，2.5 μm（填料粒径）或相当者。

5.4.2 柱温：60 ℃。

5.4.3 进样量：10 μL。

5.4.4 流速：0.8 mL/min。

5.4.5 流动相：A 为乙腈，B 为 50 mM 甲酸铵溶液。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 （min）	流速 （mL/min）	流动相A （%）	流动相B （%）
0.00	0.8	90	10
4.00	0.8	90	10
38.00	0.8	70	30
39.00	0.8	20	80
42.00	0.8	20	80
42.10	0.8	90	10
48.00	0.8	90	10

5.5 标准曲线的制作

将混合标准系列工作液（3.4.3）的衍生液分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的色谱峰面积，以标准工作液的浓度为横坐标，以响应因子为纵坐标，绘制标准曲线。其中响应因子定义为目标物的峰面积与内标物的峰面积的比值。

5.6 试样溶液的测定

在相同色谱条件下，将制备的试样溶液分别进样，进行高效液相色谱分析。以保留时间定性，内标法定量，根据线性回归方程计算出试样溶液中母乳低聚糖的浓度。

6 分析结果的表述

6.1 试样中母乳低聚糖单体含量的计算公式

试样中母乳低聚糖单体的含量按式（1）计算：

$$\mathrm{Xi} = \frac{C \times V \times DF}{m \times 10} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X_i——试样中母乳低聚糖单体的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g），i 代表 7 种母乳低聚糖；

C ——试样测定液中母乳低聚糖的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——初始稀释体积，单位为毫升（mL）；

DF——添加内标前任何额外稀释的稀释系数（最终体积/等分试样体积），单位为毫升每毫升（mL/mL）；

m ——试样的称样量，单位为克（g）；

10——将浓度单位从 μg/g 换算为 mg/100 g 的换算系数。

计算结果保留三位有效数字。

6.2 试样中母乳低聚糖总量的计算公式

试样中母乳低聚糖总量的含量按式（2）计算

$$X=X_{2'\text{-FL}}+X_{3\text{-FL}}+X_{3'\text{-SL}}+X_{6'\text{-SL}}+X_{\text{LNnT}}+X_{\text{LNT}}+X_{\text{DFL}} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——试样中母乳低聚糖的总量，单位为毫克每百克（mg/100 g）。

计算结果保留三位有效数字。

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数平均值的 10%。

8 其他

本方法的定量限均为 10 mg/100 g。

附录 A
高效液相色谱图

A.1 标准溶液中 7 种母乳低聚糖的色谱图

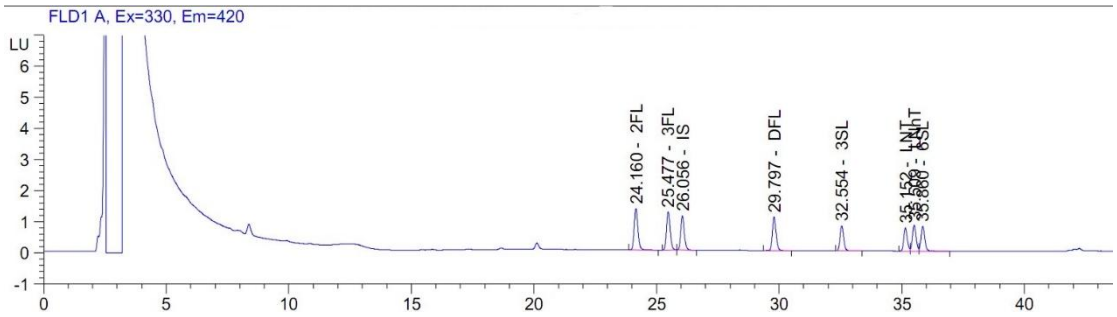

图 A.1 10 mg/L 标准溶液中 7 种母乳低聚糖色谱图

A.2 婴幼儿配方乳粉中母乳低聚糖的色谱图

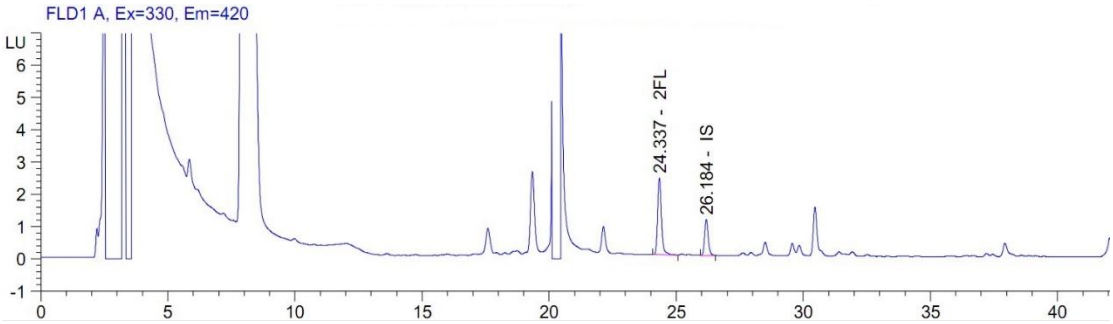

图 A.2 婴幼儿配方乳粉中母乳低聚糖色谱图