

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241114002

引用格式: 邓思怡, 黄伟乾, 吴俊发, 等. 液相色谱-荧光法测定乳粉中4种母乳低聚糖[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(5): 32-37.

DENG SY, HUANG WQ, WU JF, *et al.* Determination of 4 kinds of breast milk oligosaccharides in milk powder by liquid chromatography-fluorescence method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(5): 32-37. (in Chinese with English abstract).

液相色谱-荧光法测定乳粉中4种母乳低聚糖

邓思怡*, 黄伟乾, 吴俊发, 覃天福, 陈祖健, 余梓恒, 李镇杰

(广州检验检测认证集团有限公司, 广州 511447)

摘要: **目的** 建立液相色谱-荧光法同时测定乳粉中4种母乳低聚糖[2'-岩藻糖基乳糖(2'-fucosyllactose, 2'-FL)、3'-唾液酸乳糖(3'-sialyllactose, 3'-SL)、6'-唾液酸乳糖(6'-sialyllactose, 6'-SL)和乳糖-N-新四糖(lacto-N-neo-tetraose, LNnT)]的含量分析方法。**方法** 样品加水溶解后, 使用淀粉葡萄糖苷酶或 β -半乳糖苷酶酶解, 用2-氨基苯甲酰胺(2-aminobenzamide, 2-AB)和2-甲基吡啶硼烷(2-methylpyridine borane, 2-PB)衍生后, 采用酰胺键合色谱柱分离, 荧光检测器检测和内标法定量。**结果** 4种母乳低聚糖在10~600 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围均有良好的线性关系, 相关系数均为 $r^2 > 0.999$; 4种母乳低聚糖的检出限和定量限分别为0.94~2.31 mg/100 g、3.12~7.69 mg/100 g; 4种母乳低聚糖加标回收率为97.7%~101.5%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) ($n=7$)为0.53%~3.09%。**结论** 该方法对测定乳粉中的4种母乳低聚糖含量的检测人员、设备和环境要求不高、前处理操作简单, 且具有良好的准确度和精密度, 可为乳粉中母乳低聚糖质量控制提供方法参考。

关键词: 2'-岩藻糖基乳糖; 3'-唾液酸乳糖; 6'-唾液酸乳糖; 乳糖-N-新四糖; 液相色谱-荧光法; 乳粉

Determination of 4 kinds of breast milk oligosaccharides in milk powder by liquid chromatography-fluorescence method

DENG Si-Yi*, HUANG Wei-Qian, WU Jun-Fa, QIN Tian-Fu,
CHEN Zu-Jian, YU Zi-Heng, LI Zhen-Jie

(Guangzhou Inspection Testing and Certification Group Co., Ltd., Guangzhou 511447, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination the content of 4 kinds of human milk oligosaccharides [2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialic acid (3'-SL), 6'-sialic acid (6'-SL) and lactose-N-neotetraose (LNnT)] in milk powder by liquid chromatography-fluorescence method. **Methods** The samples were dissolved in water, enzymolized with amyloglucosidase or β -galactosidase, derived with 2-aminobenzamide (2-AB) and 2-methylpyridine borane (2-PB), and separated by amide bonding column, detected by fluorescence detector, and quantitated by internal standard methods. **Results** The 4 kinds of milk oligosaccharides had a good linear relationship in the concentration range of 10~600 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficients (r^2) were more than 0.999. The limits of detection and quantification of 4 kinds of milk oligosaccharides were 0.94~2.31 mg/100 g and 3.12~7.69 mg/100 g, respectively; the recovery rates of 4 kinds of milk

收稿日期: 2024-11-14

第一作者/*通信作者: 邓思怡(1995—), 女, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全质量检验检测。E-mail: 1228912589@qq.com

oligosaccharides were 97.7%–101.5%, and the relative standard deviations (RSD) ($n=7$) were 0.53%–3.09%.

Conclusion This method does not have high requirements for people, equipments and environment for determining the content of 4 kinds of milk oligosaccharides in milk powder. The pre-treatment operation is simple, and it has good accuracy and precision. It can provide a reference for the quality control method of human milk oligosaccharides in milk powder.

KEY WORDS: 2'-fucosyllactose; 3'-sialic acid; 6'-sialic acid; lactose-N-neotetraose; liquid chromatography-fluorescence method; milk powder

0 引言

母乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs), 也称人乳低聚糖, 是存在于母乳中一类复杂混合低聚糖, 是母乳中含量第三的固体成分。HMOs 一般是由 3~10 个单糖单元通过糖苷链连接而成的碳水化合物, 具有抑制病原体对机体感染、促进双歧杆菌定植、激发机体免疫力、促进大脑发育等优点^[1-4]。HMOs 主要有 3 种类型: (1)岩藻糖基化的中性 HMO, 占总量的 35%~50%, 代表物质为 2'-岩藻糖基乳糖(2'-fucosyllactose, 2'-FL), 2'-FL 是所有 HMOs 中含量最高的, 占近 30%; (2)非岩藻糖基化的中性 HMO, 占总量的 42%~55%, 代表物质为乳糖-N-新四糖(lacto-N-neotetraose, LNnT); (3)唾液酸化的酸性唾液酸, 占总量的 12%~14%, 代表物质为 3'-唾液酸乳糖(3'-sialyllactose, 3'-SL)和 6'-唾液酸乳糖(6'-sialyllactose, 6'-SL)^[5-8]。

近年来, 越来越多的研究致力于高效生产 HMOs, 并将其应用于婴幼儿配方食品中以改善婴幼儿等人群营养健康状况。目前, 经过安全性评估, HMOs 已在多个国家、地区被批准使用, 其中 2'-FL、3'-SL、6'-SL 和 LNnT 已在欧盟和美国得到批准^[9-14]。中国卫生健康委在 2023 年审查并通过的《关于桃胶等 15 种“三新食品”的公告》(2023 年第 8 号)^[15]中宣布, 2'-FL 和 LNnT 正式获批成为允许使用的食品添加剂新品种, 其用量及适用范围均有明确的规定。

截至今日, 我国对乳粉中的 2'-FL、3'-SL、6'-SL 和 LNnT 的标准检测方法仍没有确切规定。目前, 对 HMOs 的检测方法主要有液相色谱-串联质谱法^[16-18]、离子色谱-脉冲安培法^[19-20]和液相色谱-荧光法^[21-23]。其中, 液相色谱-串联质谱法检测低聚糖, 有快速测定、高灵敏度以及通过特征碎片进行准确性的优点, 但低聚糖在质谱离子源脱溶剂和离子传输过程中容易受热裂解, 导致响应和重复性较差。离子色谱-脉冲安培法分析糖含量有较高的灵敏度和较好的分离效果, 但乳粉中含有的乳糖、低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)和低聚果糖(fructooligosaccharides, FOS)等低聚糖会干扰 HMOs 检测, 此外其强碱环境的流动相不能与质谱连用, 限制了其使用范围^[20]。而液相色谱-荧光法是将 HMOs 衍生化后辅以荧光检测器检测, 特异性高、灵敏度高, 常被用作测定低聚糖的方法手段。目前, 国

内对母乳低聚糖检测方面的文献较少。

本研究通过酶解样液除去干扰物质、衍生从而标记荧光信号, 采用酰胺键合色谱柱分离, 荧光检测器检测和内标法定量测定乳粉中 2'-FL、3'-SL、6'-SL 和 LNnT 含量, 为乳粉中母乳低聚糖质控方法提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

乳粉样品(广州市某商店), 分别为: 调制乳粉(A)、婴幼儿配方乳粉(B)、特殊医学用途婴儿配方乳粉(C)。

二甲亚砜(分析纯)、2'-FL 对照品(纯度 96%)、3'-SL 对照品(纯度 92%)、6'-SL 对照品(纯度 92%)、LNnT 对照品(纯度 94.67%)(上海安谱实验科技股份有限公司); 2-氨基苯甲酰胺(2-aminobenzamide, 2-AB)(分析纯)、2-甲基吡啶硼烷(2-methylpyridine borane, 2-PB)(分析纯)、甲酸(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、 β -半乳糖苷酶(酶活力 4000 U/mL)、淀粉葡萄糖苷酶(酶活力 350 U/mL)(德国默克集团); 乙酸(色谱纯)、甲酸铵(色谱纯)、昆布三糖(纯度 95%)(上海麦克林生化科技股份有限公司); 氢氧化钠溶液(色谱纯, 美国赛默飞世尔科技公司); 婴幼儿配方奶粉阴性基底粉(广州某乳粉企业提供, 不含 4 种母乳低聚糖)。

1.2 仪器与设备

U3000 超高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司); Aquaplore 2S 纯水系统(重庆艾科浦颐洋企业发展有限公司); MS204T 万分之一分析天平[梅特勒托利多测量设备(上海)有限公司]; Sigma 3-30KS 高速冷冻离心机[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; MS3 涡旋振荡器[艾卡(广州)仪器设备有限公司]; XBridge BEH Amide Column 色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 2.7 μ m, 美国 Waters 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液的配制

标准溶液的配制: 称取 10 mg 2'-FL、3'-SL、6'-SL、LNnT 标准品(按纯度折算, 精确至 0.1 mg)于 10 mL 容量瓶中, 用超纯水溶解并定容, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 储备液。分别移取标准储备液 0、0.05、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00 mL 于 5 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 最

终配制质量浓度为 0、10、50、100、200、400、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。

衍生化溶液: 称取 286 mg 2-AB 和 625 mg 2-PB 于 10 mL 试剂瓶中, 加入 6 mL 二甲亚砜-醋酸溶液(3:7, *V:V*) 后混匀。

酶混合溶液: 称取酶活力约 350 U 淀粉葡萄糖苷酶溶于 5 mL 醋酸钠缓冲液(0.2 mol/L)中, 配成 70 U/mL 淀粉葡萄糖苷酶溶液。再将淀粉葡萄糖苷酶溶液(70 U/mL)和 β -半乳糖苷酶溶液(4000 U/mL)按体积比例 4:1 混匀。

甲酸铵溶液[50 mmol/L, pH (4.4 \pm 0.1)]: 称取 3.15 g 甲酸铵于 1000 mL 容量瓶中, 用 900 mL 水溶解后用甲酸调节至 pH (4.4 \pm 0.1), 用超纯水定容至刻度。

内标溶液: 称取 20 mg 昆布三糖于 50 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度。

1.3.2 试样前处理

奶粉溶液制备: 准确称取均匀的奶粉样品 1~5 g 于锥形瓶中, 用 20 mL 温水(约 40~50 $^{\circ}\text{C}$)溶解后, 于(70 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 20~25 min, 冷却到室温后转移至 50 mL 容量瓶中定容至刻度, 混匀后备用。

移取 200 μL 的奶粉溶液到离心管中, 再加入 100 μL 的淀粉葡萄糖苷酶和 β -半乳糖苷酶的混合溶液, 振荡混匀后将离心管置于(60 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中 1 h。取出冷却后加入 100 μL 内标溶液, 振荡混匀后, 于-4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10000 r/min 离心 10 min。上清液作为 2'-FL、3'-SL、6'-SL 的试样衍生前样液。

移取 200 μL 的奶粉溶液到离心管中, 再加入 100 μL 的淀粉葡萄糖苷酶溶液, 振荡混匀后将离心管置于(60 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中 1 h。取出冷却后加入 100 μL 内标溶液, 振荡混匀后, 于-4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10000 r/min 离心 10 min。上清液作为 LNnT 的试样衍生前样液。

1.3.3 试样衍生反应

分别移取 100 μL 的上述两种离心上清液到 2 mL 的离心管中, 接着加入 100 μL 的衍生试剂溶液。振荡器上混合数秒后, 将离心管置于(65 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中 1 h。取出离心管, 振荡混匀后放置于冰箱冷藏处理 5 min。取出离心管, 在通风橱中开盖后, 加入 1000 μL 水:乙腈(25:75, *V:V*)溶剂。振荡混匀后, 于-4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10000 r/min 离心 10 min, 取上层适量溶液上机分析, 作为样品溶液测定。

移取 200 μL 超纯水到离心管中, 与试样同步进行酶解、衍生, 离心后取上层适量溶液上机分析, 作为试剂空白溶液测定。

移取 200 μL 标准溶液到离心管中, 与试样同步进行酶解、衍生, 离心后取上层适量溶液上机分析, 作为标准溶液测定。

1.3.4 液相色谱条件

检测器: 荧光检测器; 检测器波长: 激发波长为 330 nm, 发射波长为 420 nm; 酰胺键合色谱柱(XBridge BEH Amide

Column, 2.1 mm \times 150 mm, 2.7 μm), 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL ; 流速为 0.5 mL/min; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为甲酸铵缓冲溶液(pH 4.4)。洗脱条件如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Conditions of gradient elution

时间/min	流速/(mL/min)	淋洗液/%		曲线
		A	B	
0.0	0.5	92	8	线性
28.0	0.5	80	20	线性
29.0	0.5	80	20	线性
30.0	0.5	60	40	线性
34.5	0.5	60	40	线性
35.0	0.5	20	80	线性
39.5	0.5	20	80	线性
40.0	0.5	92	8	线性
48.0	0.5	92	8	线性

1.4 数据处理

实验重复 3 次测定, 数据采用仪器配套的变色龙软件对物质进行定性、定量分析, 采用内标法定量。回收率、相对标准偏差和标准曲线线性方程采用 Excel 2010 进行处理, 并分别使用 Word 2010 和 Excel 2010 进行表格和图的绘制。

2 结果与分析

2.1 酶解条件的选择

配方奶粉中或许添加淀粉或者麦芽糊精, 一方面作为能量来源或维生素和矿物质的载体, 另一方面以提高其黏稠性和速溶性, 但大量存在时会干扰 HMOs 的测定。此外, 许多配方奶粉中也经常添加低聚半乳糖, 同样会干扰 3'-SL 和 6'-SL 的测定, 因此有必要添加不同酶分别进行特异性消除^[23]。

GB 5009.245—2016《食品安全国家标准 食品中聚葡萄糖的测定》中添加淀粉葡萄糖苷酶对提取液进行酶解, 特异性消除淀粉干扰物以测定聚葡萄糖; GB 1903.27—2022《食品安全国家标准 食品营养强化剂 低聚半乳糖》中添加 β -半乳糖苷酶酶解低聚半乳糖含量。但是乳糖-N-三糖 II (lacto-N-triose II, LNT II) 是合成 LNnT 的常见前体, β -半乳糖苷酶可以催化半乳糖基从乳糖转移至 LNT II 从而合成 LNnT^[24-25]。

因此, 采用淀粉葡萄糖苷酶和 β -半乳糖苷酶对提取液进行酶解处理, 测定 3'-SL 和 6'-SL; 采用淀粉葡萄糖苷酶酶解, 即在没有添加 β -半乳糖苷酶处理的情况下测定 LNnT。2'-FL 的测定不受低聚半乳糖、 β -半乳糖苷酶的影响, 因此可使用任何一种前处理酶解方法测定 2'-FL。

2.2 衍生试剂的选择

HMOs 本身无发色基团, 在检测器上的灵敏度低, 需

进行衍生反应, 如发色活性标记物标记。发色活性标记物标记在糖链后, 通过荧光检测技术进行检测与分析, 对糖链进行定性定量分析。据文献记载, 常用到的荧光衍生剂有氨基吡啶类如 2-氨基吡啶、苯胺类如 2-氨基苯甲酸 (anthranilic acid, 2-AA) 和 2-AB、酰肼类如 N,N-二甲基氨基萘-5-磺酸肼和 4-N,N-二甲基氨基-4-偶氮苯磺酸肼等^[26-29]。氨基吡啶类衍生试剂的氨基团有位阻现象和电子钝化现象, 与糖类物质结合时会导致去糖基化反应, 从而干扰糖的分析。糖与酰肼类试剂反应后通常会生成两个峰, 使分离复杂化, 故相关的研究进行并不深入。茚甲氧基羰基肼克服了以往酰肼类试剂的缺点, 但其只能与还原糖反应, 限制了其使用范围。董文峰等^[30]对 HMOs 分别进行 2-AA、2-AB 与 2-氨基吡啶酮(2-aminoacridone, AMAC) 衍生, 比较后选取 2-AA 作为最优衍生剂,

2-AA 是一种荧光分子, 2-AA 标记与糖链上氨基基团连接, 标记在糖链后, 通过荧光检测技术进行检测与分析, 对糖链进行定性定量分析。糖链需要经过还原胺化反应生成氨基基团, 而 2-PB 作为糖类标记的还原胺化试剂有反应充分和低毒性等优点。因此, 选择 2-AB 和 2-PB 作为实验衍生剂。

2.3 校正方法的选择

对高效液相色谱仪系统校正的方法主要有外标法和内标法。外标法是用待测组分的纯品作对照物质, 以对照物质和样品中待测组分的响应信号相比较进行定量的方法。内标法是一种间接或相对的校准方法。在分析测定样品中某组分含量时, 加入一种内标物质以校准和消除由于操作条件的波动而对分析结果产生的影响, 以提高分析结果的准确度。由于 2'-FL、3'-SL、6'-SL、LNnT 标准品难以购获, 目前可使用内标法, 通过使用结构和性质类似糖类物质对此进行定量校准。而昆布三糖一般不存在于奶粉中, 在色谱图中不会受其他杂峰干扰影响, 相关研究^[31]亦发现昆布三糖与低聚糖被 2-AB 荧光标记时具有相近的荧光摩尔灵敏度, 常被选择作为内标物质。因此本研究中选取昆布三糖作内标物质校准曲线以测定目标糖的含量。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线和方法灵敏度

用水配制 2'-FL、3'-SL、6'-SL、LNnT 对照品储备液 (1 mg/mL), 再精密移取对照品储备液, 分别用水定容、配制成质量浓度为 0、10、50、100、200、400、600 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品工作液。按照 1.3.4 液相色谱条件进行液相色谱-荧光法分析, 测定方法的线性范围。4 种母乳低聚糖的标准谱图和空白溶液色谱图见图 1~2。以工作液浓度为横坐标, 以内标浓度 \times 工作液峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标, 绘制对照品工作液曲线, 结果详见表 2。结果显示, 2'-FL、3'-SL、6'-SL、LNnT 在 10~600 mg/L 范围内线性

关系良好, 相关系数(r^2)均为 0.9999, 满足实际样品检测的灵敏度要求。以 4 种母乳低聚糖的仪器响应信噪比(S/N)的 3 倍和 10 倍计算仪器检出限和仪器定量限, 结合样品前处理过程的稀释倍数(以 50 倍计), 计算得到的方法检出限(method detection limit, MLOD)和方法定量限(method quantitation limit, MLOQ)。由表 2 可知, 方法检出限为 0.94~2.31 mg/100 g, 定量限为 3.12~7.69 mg/100 g, 满足实验要求。

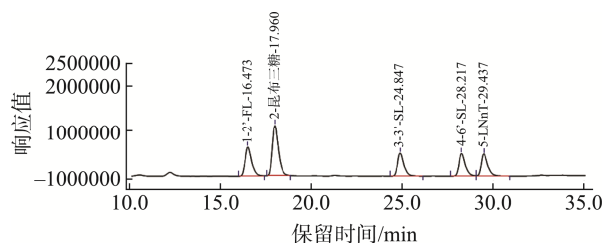


图1 4种母乳低聚糖标准溶液色谱图

Fig.1 Chromatograms of 4 kinds of standard solutions of human milk oligosaccharides

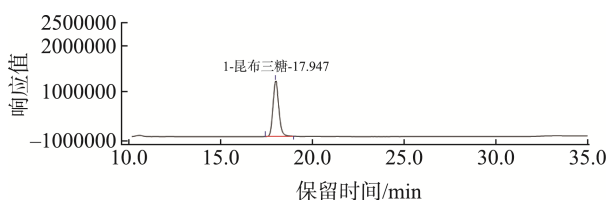


图2 空白样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of blank sample

表 2 4 种母乳低聚糖的线性方程、相关系数、MLODs 和 MLOQs
Table 2 Linear equations, correlation coefficients and MLODs and MLOQs of 4 kinds of human milk oligosaccharides

化合物名称	线性方程	相关系数 (r^2)	MLODs / (mg/100 g)	MLOQs / (mg/100 g)
2'-FL	$Y=2.3935X-5.9771$	0.9999	1.84	6.12
3'-SL	$Y=1.8276X-3.4217$	0.9999	2.31	7.69
6'-SL	$Y=1.8031X-3.4795$	0.9999	1.87	6.25
LNnT	$Y=1.8218X-4.1695$	0.9999	0.94	3.12

2.4.2 精密度与准确性

选取婴幼儿配方奶粉阴性基底粉进行 3 水平加标, 水平浓度如表 3 所示, 每个加标水平做 7 平行试验, 以验证方法的精密度与准确性。第一个加标水平色谱图见图 3~4。由表 3 可知, 4 种母乳低聚糖加标回收率为 97.7%~101.5%, 精密度的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) ($n=7$) 为 0.53%~3.09%, 验证结果能符合 GB/T 27417—2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》的要求, 表明方法精密度、正确度好。

表3 4种母乳低聚糖的回收率和精密度测试结果
Table 3 Recovery and precision test results of 4 kinds of human milk oligosaccharides

序号	简称	添加水平 (mg/100 g)	回收率 /%	RSDs /%
1	2'-FL	10、700、2700	98.0、97.7、101.5	1.77、0.63、0.58
2	3'-SL	10、100、2700	97.7、100.9、100.1	0.53、3.09、1.10
3	6'-SL	10、70、2700	100.0、101.3、100.4	1.00、1.38、1.37
4	LNnT	10、70、2700	98.0、99.3、100.5	1.02、2.91、1.84

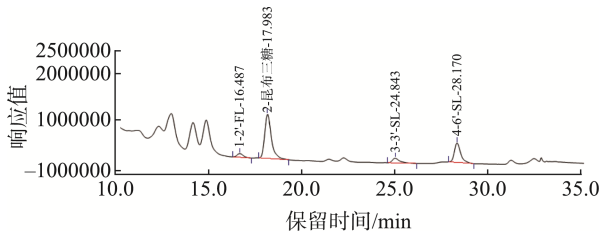


图3 阴性基底粉加标(2'-FL、3'-SL、6'-SL)色谱图
Fig.3 Negative matrix adding standard solution (2'-FL, 3'-SL, 6'-SL) chromatogram

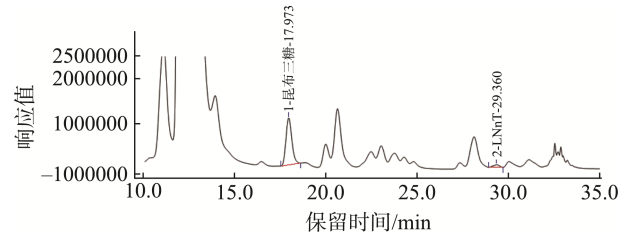


图4 阴性基底粉加标(LNnT)色谱图
Fig.4 Chromatogram of negative matrix adding standard solution (LNnT)

2.5 实际样品检测

为了验证不同方法间的结果一致性,本研究使用本方法与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》对国内3种不同类型的乳粉进行6平行测试,并与明示质量指标比较,测试结果见表4。由表4可知,3种样品的测定结果均大于80%的明示值;通过 t 检验评价两种方法的差异性,可知 t 值均 $<2.228(t_{0.05,10})$,表明同一样品两组结果间的差异无统计学意义,两种方法测定结果无显著性差异。

表4 本方法与其他方法测定结果的比较

Table 4 Comparison between the results of this method and other methods

样品	检测方法	2'-FL/(mg/100 g)	t 值	3'-SL/(mg/100 g)	t 值	6'-SL/(mg/100 g)	t 值	LNnT/(mg/100 g)	t 值	$t_{0.05,10}$
A	本方法	458	1.246	52	1.414	18	1.000	126	1.928	
	T/SAFC 002—2024	460		52		19		128		
		标示值: 450	无标示值	无标示值	标示值: 120					
B	本方法	15	1.472	16	1.249	71	1.917	377	1.917	2.228
	T/SAFC 002—2024	16		17		72		379		
		无标示值	无标示值	无标示值	标示值: 370					
C	本方法	11	2.080	14	1.000	20	1.746	8	0.808	
	T/SAFC 002—2024	12		15		21		8		
		无标示值	无标示值	无标示值	无标示值					

注: t 值 $<t_{0.05,10}$,表示两组结果间的差异不具有统计学意义(无显著性差异); t 值 $>t_{0.05,10}$,表示两组结果间的差异具有统计学意义(显著性差异)。

3 结论

本研究通过探讨酶解条件、衍生试剂、校正方法的选择和利用液相色谱-荧光检测器,建立了液相色谱-荧光法同时测定乳粉中4种母乳低聚糖(2'-FL、3'-SL、6'-SL和LNnT)含量的检测方法。本方法能实现4种母乳低聚糖的分离与定量,对检测人员、设备和环境要求不高、前处理过程简单。方法学验证表明本方法回收率高、精密度和正确度好,适用于批量样品的测定,可为乳粉母乳低聚糖质控方法提供参考。

参考文献

- HENNA M, ARTHUR C. Infant nutrition: The importance of human milk oligosaccharides and the opportunity for probiotics [J]. Agriculture Food Industry High-Technology, 2021, 32(3): 19–20.
- SPRENGER N, ODENWALD H, KUKKONEN AK, et al. FUT2-dependent breast milk oligosaccharides and allergy at 2 and 5 years

- of age in infants with high hereditary allergy risk [J]. European Journal of Nutrition, 2017, 56(3): 1293–1301.
- SEPPÖ AE, AUTRAN CA, BODE L, et al. Human milk oligosaccharides and development of cow's milk allergy in infants [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2017, 139(2): 708–711.
- NEAU E, DELANNOY J, MARION C, et al. Three novel candidate probiotic strains with prophylactic properties in a murine model of cow's milk allergy [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(6): 1722–1733.
- DAWOD B, MARSHALL JS, AZAD MB. Breastfeeding and the developmental origins of mucosal immunity: How human milk shapes the innate and adaptive mucosal immune systems [J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2021, 37(6): 547–556.
- 陈新新. 牛乳与母乳中低聚糖的测定方法及其不同泌乳时期变化规律的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.
- CHEN XX. Determination methods of oligosaccharides in cow's milk and breast milk and their changes at different lactation stages [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2017.
- 杨铁涵, 乔为仓, 张明辉, 等. 母乳低聚糖检测方法的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2022(9): 50.

- YANG YH, QIAO WC, ZHANG MH, *et al.* Research progress on the detection of human milk oligosaccharides [J]. *China Dairy Industry*, 2022(9): 50.
- [8] 刘筠, 胡家强, 刘爽, 等. 母乳低聚糖与婴幼儿代谢性疾病的相关性研究进展[J]. *中国妇幼保健*, 2023, 38(12): 2318–2322.
- LIU J, HU JQ, LIU S, *et al.* Research progress on the correlation between breast milk oligosaccharides and metabolic diseases in infants and young children [J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2023, 38(12): 2318–2322.
- [9] MCARTHUR JB, YU H, CHEN X. A bacterial β 1-3-galactosyltransferase enables multigram-scale synthesis of human milk lacto-N-tetraose (LNT) and its fucosides [J]. *Acs Catalysis*, 2019, 9(12): 10721–10726.
- [10] 中国食品科学技术学会. 母乳低聚糖(HMOs)的科学共识[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(6): 452–457.
- Chinese Institute of Food Science and Technology. Scientific consensus on human milk oligosaccharides (HMOs) [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(6): 452–457.
- [11] 梁宸, 齐悦, 陈龙, 等. 母乳低聚糖对人体保护作用的研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2023(28): 185–188.
- LIANG C, QI Y, CHEN L, *et al.* Research progress on the protective effect of human milk oligosaccharides [J]. *China Food Safety Magazine*, 2023(28): 185–188.
- [12] PEREZ-ESCALANTE E, ALATORRE-SANTAMARIA S, CASTANEDA-OVANDO A, *et al.* Human milk oligosaccharides as bioactive compounds in infant formula: Recent advances and trends in synthetic methods [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(1): 181–214.
- [13] BYCH K, MARTA HM, JOHANSON T, *et al.* Production of HMOs using microbial hosts—from cell engineering to large scale production [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 56: 130–137.
- [14] 王司琪, 张宇, 彭小雨, 等. 母乳中的活性成分——HMOs 对机体的益处及应用现状 [J/OL]. *食品研究与开发*, 1–10. [2024-11-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1231.TS.20240616.1244.002.html>
- WANG SQ, ZHANG Y, PENG XY, *et al.* Benefits and application status of HMOs, the active ingredient in human milk [J/OL]. *Food Research and Development*, 1–10. [2024-11-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1231.TS.20240616.1244.002.html>
- [15] 国家卫生健康委员会. 关于桃胶等15种“三新食品”的公告(2023年第8号) [EB/L]. (2023-09-22). [2024-10-05]. <http://www.nhc.gov.cn/sp/s7892/202310/db51a70c84ce46f684ffe7be226dcdf1.shtml>
- National Health and Wellness Commission. Announcement on 15 kinds of “three new foods” such as peach gum (No.8 in 2023) [EB/OL]. (2023-09-22). [2024-10-05]. <http://www.nhc.gov.cn/sp/s7892/202310/db51a70c84ce46f684ffe7be226dcdf1.shtml>
- [16] 陈新新, 芦晶, 刘鹭, 等. 超高效液相色谱-质谱法测定母乳中12种低聚糖[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 6.
- CHEN XX, LU J, LIU L, *et al.* Determination of 12 kinds of oligosaccharides in human milk by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Science*, 2018, 39(4): 6.
- [17] 魏京华, 陈历俊, 赵军英, 等. 液相色谱-质谱法快速检测4种乳源低聚糖[J]. *食品科学*, 2016, 37(14): 86–91.
- WEI JH, CHEN LJ, ZHAO JY, *et al.* Rapid detection of four types of milk derived oligosaccharides by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Science*, 2016, 37(14): 86–91.
- [18] HONG O, RUHAAK LR, TOTTEN SM. Label-free absolute quantitation of oligosaccharides using multiple reaction monitoring [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(5): 2640–2647.
- [19] 陈磊, Philip Haselberger, 田芳, 等. 离子色谱法测定母乳中的寡聚糖与游离唾液酸[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(10): 227–234.
- CHEN L, PHILIP HB, TIAN F, *et al.* Determination of oligosaccharides and free sialic acid in breast milk by ion chromatography [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(10): 227–234.
- [20] 詹胜群, 葛城, 周荣杰, 等. 婴配乳粉中2'-岩藻糖基乳糖和乳糖-N-新四糖含量离子色谱法检测[J]. *应用化学*, 2024, 41(3): 405–414.
- ZHAN SQ, GE C, ZHOU RJ, *et al.* Determination of the contents of 2'-fucosyllactose and lactose-N-neotetraose in infant formula milk powder by ion chromatography [J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2024, 41(3): 405–414.
- [21] 李绮淇, 黄嘉乐, 穆妹夷, 等. 柱前衍生—高效液相色谱荧光检测法测定乳制品中6种母乳寡糖[J]. *食品与机械*, 2024, 40(4): 54–58.
- LI QQ, HUANG JL, MU SY, *et al.* Determination of 6 types of breast milk oligosaccharides in dairy products by pre column derivatization high performance liquid chromatography fluorescence detection method [J]. *Food and Machinery*, 2024, 40(4): 54–58.
- [22] 高芳, 汪龙飞, 卜汉萍, 等. 高效液相荧光光谱法检测婴幼儿配方食品中7种母乳低聚糖[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(24): 72–79.
- GAO F, WANG LF, BU HP, *et al.* Determination of 7 kinds of human milk oligosaccharides by high performance liquid chromatography with fluorescence detector [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(24): 72–79.
- [23] 朱婧, 石羽杰, 吴立芳, 等. 不同阶段母乳中10种游离低聚糖的检测及含量分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(4): 417–422.
- ZHU J, SHI YJ, WU LF, *et al.* Detection and content analysis of 10 free oligosaccharides in breast milk at different stages [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2017, 29(4): 417–422.
- [24] 孟佳伟, 朱莺莺, 罗国聪, 等. 乳糖-N-新四糖的生理功能、生物合成及其衍生化研究进展[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(3): 320–328.
- MENG JW, ZHU YY, LUO GC, *et al.* Research progress on the physiological function, biosynthesis and derivatization of lacto-N-neotetraose [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(3): 320–328.
- [25] MURATA T, INUKAI T, SUZUKI M, *et al.* Facile enzymatic conversion of lactose into lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose [J]. *Glycoconjugate Journal*, 1999, 16(3): 189–195.
- [26] 董文烽. 母乳中低聚糖定量检测方法的建立及其应用的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- TONG WF. Establishment of quantitative detection method of oligosaccharides in breast milk and its application [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [27] 徐瑾, 张庆合, 张维冰, 等. 液相色谱荧光衍生法在糖类物质分析中的应用[J]. *色谱*, 2003, 21(2): 6.
- XU J, ZHANG QH, ZHANG WB, *et al.* Application of liquid chromatography fluorescence derivatization in the analysis of carbohydrates [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2003, 21(2): 6.
- [28] RUHAAK LR, LEBRILLA CB. Analysis and role of oligosaccharides in milk [J]. *BMB Reports*, 2012, 45(8): 442–451.
- [29] VOLPI N. High-performance liquid chromatography and on-line mass spectrometry detection for the analysis of chondroitin sulfates/hyaluronan disaccharides derivatized with 2-aminoacridone [J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 397(1): 12–23.
- [30] 董文烽, 杨国良, 叶文慧, 等. 基于衍生化反应的母乳低聚糖质谱检测方法的建立[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(7): 283–290.
- TONG WF, YANG GL, YE WH, *et al.* Establishment of a mass spectrometry method for the detection of human milk oligosaccharides based on derivatization reaction [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(7): 283–290.
- [31] 邱志超, 黄伟乾, 邓伟恒, 等. 荧光标记-酶识别-高效液相色谱法测定婴儿配方乳粉中反式低聚半乳糖[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(23):131–137.
- QIU ZC, HUANG WQ, DENG WH, *et al.* Determination of trans-galacto-oligosaccharides in infant formula milk powder by fluorescent labeling-enzyme identification-high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2018, 9(23): 131–137.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)