

# 亲水作用色谱-串联质谱法测定婴儿配方乳粉中14种母乳低聚糖

叶梦薇, 黄 芊, 冯丽凤, 黄 媛, 蔡小明, 高 宇, 王天西, 潘 城\*  
(国家加工食品质量检验检测中心, 福建省产品质量检验研究院, 福建 福州 350002)

**摘 要:** 本研究建立了亲水作用色谱-串联质谱同时测定婴儿配方乳粉中14种母乳低聚糖的分析方法。样品经乙醇沉淀蛋白、冷冻脱脂, 以亲水作用色谱柱分离, 采用超高效液相色谱-质谱多反应监测模式进行检测, 外标法定量。在优化的条件下, 14种母乳低聚糖在各自的线性范围内线性关系良好, 决定系数均大于0.994, 在两种乳基试样的3个不同加标水平下平均回收率为90.3%~109.2%、相对标准偏差为0.7%~9.7% ( $n=6$ ), 方法检出限为0.002~0.048  $\mu\text{g/mL}$ 。此方法具有分析速度快、稳定性好、灵敏度高的特点, 能够满足婴儿配方乳粉中14种母乳低聚糖的快速检测需求。

**关键词:** 婴儿配方乳粉; 母乳低聚糖; 亲水作用色谱-串联质谱法

## Determination of 14 Human Milk Oligosaccharides in Infant Formula Milk Powder by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

YE Mengwei, HUANG Qian, FENG Lifeng, HUANG Yuan, CAI Xiaoming, GAO Yu, WANG Tianxi, PAN Cheng\*  
(National Quality Supervision and Testing Center for Processed Food,  
Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** A method for the determination of 14 human milk oligosaccharides (HMOs) in infant formula milk powder was established by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS). The sample was deproteinized by ethanol precipitation and degreased by freezing prior to separation by HILIC. The analytes were detected by multiple reaction monitoring (MRM) and quantified by an external standard method. Under optimized conditions, all HMOs showed good linear relationships within their respective concentration ranges, with determination coefficients ( $R^2$ ) greater than 0.994. The average recovery rates from blank goat's and cow's milk powders at three spiked levels ranged from 90.3% to 109.2%, with relative standard deviation (RSD) in the range of 0.7%~9.7% ( $n=6$ ), and the limit of detection (LOD) between 0.002 and 0.048  $\mu\text{g/mL}$ . The developed method is characterized by fast analysis speed, high sensitivity and good accuracy, and meets the requirements for the rapid detection of the 14 HMOs in infant formula milk powder.

**Keywords:** infant formula milk powder; human milk oligosaccharides; hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240409-072

中图分类号: O629.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2025) 03-0230-08

引文格式:

叶梦薇, 黄芊, 冯丽凤, 等. 亲水作用色谱-串联质谱法测定婴儿配方乳粉中14种母乳低聚糖[J]. 食品科学, 2025, 46(3): 230-237. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240409-072. <http://www.spkx.net.cn>

YE Mengwei, HUANG Qian, FENG Lifeng, et al. Determination of 14 human milk oligosaccharides in infant formula milk powder by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2025, 46(3): 230-237. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240409-072. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2024-04-09

基金项目: 福建省市场监督管理局科技项目 (FJMS2023015); 福建省产品质量检验研究院科技项目 (KY202202A)

第一作者简介: 叶梦薇 (1991—) (ORCID: 0009-0007-3292-4784), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为食品质量安全。

E-mail: 676757173@qq.com

\*通信作者简介: 潘城 (1983—) (ORCID: 0009-0009-0962-2758), 男, 高级工程师, 硕士, 研究方向为食品安全。

E-mail: pw8877@163.com

母乳可提供新生儿自出生至6个月所需的全部营养物质,是婴幼儿最佳的天然食物,人乳中低聚糖种类多样性和含量远高于其他哺乳动物乳汁,其低聚糖含量约为牛乳的1 000倍,对婴幼儿的生长发育起着重要作用<sup>[1]</sup>。母乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs)是人类特有且天然存在的一类低聚糖,其在母乳中的含量仅次于乳糖和脂肪,且具有丰富的生物学功能,包括维持肠道微生物平衡、发挥免疫调节作用、参与脑神经节苷脂和糖蛋白构成、减少婴幼儿受病原体感染等<sup>[2-5]</sup>。当不能实现母乳喂养时,婴儿配方乳粉作为替代品也是婴幼儿获取低聚糖的一个重要来源,此前国内婴儿配方食品允许添加的低聚糖为非动物源性低聚糖,如低聚果糖、低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)、聚葡萄糖等<sup>[6]</sup>,这些低聚糖的结构与HMOs不同,无法完全实现HMOs的生物学功能,因此相较于母乳喂养的婴儿,采用配方乳粉喂养的婴儿更易患上传染性疾病及免疫介导性疾病<sup>[7-9]</sup>。为了更好地满足婴幼儿对营养的需求,目前已有100余个国家和地区批准在婴幼儿配方食品、特殊医学用途食品等食品中添加HMOs<sup>[10]</sup>,我国也于2023年10月将2'-岩藻糖基乳糖(fucosyllactose, FL)和乳糖-*N*-新四糖(lacto-*N*-neotetraose, LNnT)两种HMOs正式纳入婴儿配方食品可添加的营养强化剂范围内<sup>[11]</sup>,未来将有更多乳制品企业将HMOs运用到产品中,但目前国内针对婴儿配方乳粉中HMOs含量测定的研究较少,且尚未出台相关食品安全国家标准,考虑到市场对婴儿配方乳粉中HMOs的检验需求和标准上的不足,构建一种具有一定前瞻性且覆盖面较全的婴儿配方乳粉中多种HMOs快速检测方法具有重要的意义。

HMOs是由5个基本单糖构成的复杂低聚糖,分别为葡萄糖(glucose, Glc)、半乳糖(galactose, Gal)、岩藻糖(fucose, Fuc)、*N*-乙酰氨基葡萄糖(*N*-acetylglucosamine, GlcNAc)和*N*-乙酰神经酰胺酸(*N*-acetylneuraminic, NeuAc)。这些单糖通过不同的糖苷键与乳糖进行连接,根据其结构可分为酸性母乳低聚糖(sialylated human milk oligosaccharides, SHMOs)和中性母乳低聚糖(neutral human milk oligosaccharides, NHMOs)两大类,其中SHMOs即唾液酸化低聚糖,如3'-唾液酸乳糖(sialyllactose, SL)、6'-SL等;NHMOs又分为岩藻糖化低聚糖(如2'-FL、3'-FL)和非岩藻糖化低聚糖(如LNnT)<sup>[12-15]</sup>。由于HMOs结构复杂且存在大量同分异构体,其分离和检测具有一定的难度。根据低聚糖极性、挥发性差、无生色基团等特点,目

前常用的低聚糖分析方法主要分为两类,一类是直接分析法,包括核磁共振法<sup>[16]</sup>、高效阴离子交换色谱(配备脉冲电流检测器)(high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detector, HPAEC-PAD)法<sup>[17-18]</sup>、亲水作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)法<sup>[19]</sup>和高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)法等<sup>[20-23]</sup>,核磁共振法常用于低聚糖结构的表征<sup>[24]</sup>,但不适用于样品量大且基质相对复杂的乳粉样品检测;离子色谱法和HILIC法是糖类检测的常用方法,但存在分析时间长、前处理操作复杂等缺点,同时奶粉基质中存在的麦芽糖糊精和GOS会对HMOs的检测造成干扰<sup>[25]</sup>;HPLC-MS/MS法具有抗干扰能力强、分析快速、灵敏度高等优点,近年来已大量运用于低聚糖的分析和检测;另一种是经过衍生后由配备荧光检测器(fluorescence detector, FLD)的HPLC<sup>[26-27]</sup>或HPLC-MS/MS<sup>[28]</sup>进行分析,但衍生步骤繁琐,衍生副产物对检测存在一定干扰。因此,本研究拟采用HILIC-MS/MS同时测定婴儿配方乳粉中14种HMOs。通过对婴儿配方乳粉进行除脂、除蛋白的前处理操作,优化LC和MS的条件,以期实现对14种HMOs的有效分离及定量分析,构建准确度高、复现性好、前处理相对简便的检测方法,并为实际运用于市售婴儿配方乳粉样品的检测、满足市场对商品化乳制品的检测需求提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

乙醇、乙腈(均为色谱纯) 德国Merck公司;水为纯水机制备(电阻率>18.2 MΩ·cm);甲酸铵(色谱纯) 美国Thermo Fisher Scientific公司。

14种HMOs标准品:2'-FL、3'-FL、3'-SL、6'-SL、LNnT、乳糖-双岩藻四糖(lactodifucotetraose, DF-L)、乳糖-*N*-二糖(lacto-*N*-biose, LNB)、乳糖-*N*-岩藻五糖I(lacto-*N*-fucopentaose I, LNFP-I)、乳糖-*N*-岩藻五糖II(lacto-*N*-fucopentaose II, LNFP-II)、乳糖-*N*-岩藻五糖V(lacto-*N*-fucopentaose V, LNFP-V)、乳糖-*N*-新六糖(lacto-*N*-neohexaose, LNnH)、唾液酸乳糖-*N*-四糖a(sialyllacto-*N*-tetraose a, LSTa)、唾液酸乳糖-*N*-四糖b(sialyllacto-*N*-tetraose b, LSTb)、唾液酸乳糖-*N*-四糖c(sialyllacto-*N*-tetraose c, LSTc)(纯度均不小于95%) 天津阿尔塔科技有限公司。14种HMOs的结构信息如表1所示。

表 1 14 种HMOs分类及结构信息  
Table 1 Classification and structural information of 14 HMOs

HMOs	CAS号	相对分子质量	结构	
非岩藻糖基化低聚糖	LNB	489-52-1	383.35	Gal(β1-3)GlcNAc
	LNnT	13007-32-4	707.63	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
	LNnH	64003-52-7	1 072.96	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)[Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)]Gal(β1-4)Glc
	2'-FL	41263-94-9	488.44	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Glc
岩藻糖基化低聚糖	3'-FL	41312-47-4	488.44	Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]Glc
	DF-L	20768-11-0	634.58	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]Glc
	LNFP-I	7578-25-8	853.77	Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
	LNFP-II	21973-23-9	853.77	Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
	LNFP-V	60254-64-0	853.77	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]Glc
	3'-SL	128596-80-5	632.54	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc
	6'-SL	157574-76-0	632.54	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc
唾液酸化低聚糖	LSTa	64003-58-5	998.88	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
	LSTb	64003-54-9	998.88	NeuAc(α2-6)[Gal(β1-3)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
	LSTc	64003-55-0	998.88	NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc

1.2 仪器与设备

Triple Quad 5500三重四极杆质谱仪（配置电喷雾电离源（electro-spray ionization, ESI）及MultiQuant 3.0数据处理系统） 美国SCIEX公司；1290 Infinity超高效液相色谱仪 美国Agilent公司；Milli-Q超纯水机 美国Millipore公司；涡旋混合器、高速冷冻离心机、聚四氟乙烯（polytetrafluoroethylene, PTFE）微孔滤膜（0.22 μm） 美国Thermo Fisher Scientific公司；超声波振荡器 上海生析超声仪器有限公司；ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）、ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）、ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱（2.1 mm×150 mm，1.7 μm） 美国Waters公司；CAPCELL PAK ST色谱柱（2.0 mm×150 mm） 日本OSAKA SODA公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

分别称取14种HMOs标准品各5 mg于5 mL容量瓶中，用纯水溶解并定容至5 mL，配制成质量浓度为1 mg/mL的标准储备溶液。分别取14种HMOs标准储备液500 μL于10 mL容量瓶中，用纯水定容至刻度，配制成质量浓度为50 μg/mL的混合标准溶液。混合标准溶液用纯水稀释成1 μg/mL混合标准使用液，用于仪器方法的优化。用超纯水稀释混合标准溶液，配制成质量浓度分别为0.05、0.1、0.2、0.5、1 μg/mL的混合标准系列工作液。14种HMOs标准储备液及混合标准溶液均于一20℃避光保存。

1.3.2 样品前处理

准确称取1 g（精确至0.001 g）乳粉样品于100 mL容量瓶中，加入40℃温水40 mL，涡旋振荡30 s，放置于40℃水浴锅中保持10 min，待样品充分溶解后取出，冷

却至室温，加水定容至100 mL，摇匀。取1 mL样品溶液于10 mL容量瓶中，以乙醇定容至刻度摇匀，全部样液转移至离心管，放入-18℃冰箱中冷冻静置1 h，取出后放入冷冻高速离心机以12 000 r/min离心5 min，取上清液1 mL，加水稀释至10 mL摇匀，经0.22 μm PTFE微孔滤膜过滤后，上机测试。

1.3.3 基质效应（matrix effect, ME）测定

ME是影响质谱测定准确度的一个非常重要因素，分别称取与待测乳粉样品等质量的空白羊乳粉、牛乳粉样品，按照1.3.2节样品前处理方法，与待测乳粉样品同批同法处理，制得空白基质溶液，用于ME分析。分别以空白基质溶液和超纯水为溶剂，配制混合标准系列工作液，获得两者的斜率并按照下式计算ME，当ME在85%~115%时，可认为ME不明显<sup>[29]</sup>。

$$ME/\% = \frac{\text{基质曲线斜率}}{\text{纯溶剂曲线斜率}} \times 100$$

1.3.4 色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱（2.1 mm×150 mm，1.7 μm）；柱温：35℃；进样体积：2 μL；流速：0.3 mL/min；流动相A为20 mmol/mL甲酸铵溶液，流动相B为乙腈；梯度洗脱程序：0.00~3.00 min，15.0%~40.0% A、85.0%~60.0% B；3.00~6.00 min，40.0% A、60.0% B；6.00~6.50 min，40.0%~15.0% A、60.0%~85.0% B；6.50~9.00 min，15.0% A、85.0% B。

1.3.5 质谱条件

离子源：ESI；扫描方式：正离子扫描模式；检测模式：多反应离子监测；电喷雾电压：5 500 V；离子源温度：600℃；气帘气压力：30 psi；碰撞气压力：8.0 psi；雾化气压力：55 psi；辅助气压力：55 psi。其他质谱参数如表2所示。

表 2 14 种HMOs的质谱参数  
Table 2 Mass spectral parameters used for the analysis of 14 HMOs

目标化合物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞电压/eV
LNB	4.14/4.30	406.0	243.8*/202.9	180	36/34
2'-FL	4.96	511.2	365.2*/203.2	130	46/50
3'-FL	5.09/5.19	511.2	365.2*/203.2	130	46/50
3'-SL	5.08	656.2	365.1*/314.0	200	45/40
6'-SL	5.31	656.2	365.1*/314.0	200	45/40
DF-L	5.48	657.2	511.2*/365.2	200	53/61
LNnT	5.68	730.0	388.3*/550.2	165	67/60
LNFP-I	6.09	876.4	730.4*/550.1	200	61/75
LNFP-II	6.43	876.4	730.4*/550.1	200	61/75
LNFP-V	6.20/6.29	876.4	730.4*/550.1	200	61/75
LSTa	5.92	1 021.4	730.3*/550.4	200	54/79
LSTb	6.12	1 021.4	730.3*/550.4	200	54/79
LSTc	6.30	1 021.4	730.3*/550.4	200	54/79
LNnH	6.89	1 095.7	730.0*/964.0	200	70/50

注：\*.定量离子；部分化合物存在端基差异异构体，在色谱中体现为双峰，在保留时间栏分别列出两个峰的保留时间。



#### 1.4 数据统计与分析

使用MultiQuant 3.0软件对实验数据进行处理,使用Microsoft Office Excel 2016软件进行平均值、回收率及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)等数据的分析计算,使用Origin 2018软件进行图形绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 仪器条件优化

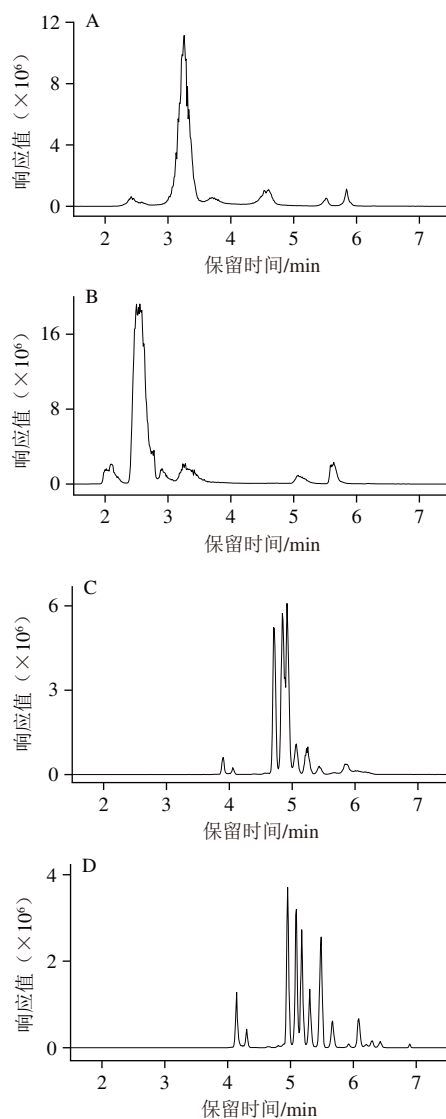
#### 2.1.1 质谱参数的优化

配制质量浓度为1  $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液,不经色谱柱分离,采用外置针泵进行连续进样,直接进入质谱仪进行条件优化。首先分别在正负离子两种模式下进行Q1扫描,结果表明14种HMOs在正离子模式下可形成分子离子峰 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,负离子模式下形成的分子离子峰为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,与文献[30]报道的结果相符。对比正负离子模式下各化合物分子离子峰的响应强度,14种HMOs正离子模式下的加钠母离子峰响应强度均大于负离子模式下的减氢母离子峰,因此选择正离子模式进行扫描。将目标化合物母离子进一步碰撞,在产物离子扫描模式下获得目标化合物的主要碎片离子,选择响应强度较高的子离子为定量离子,响应强度较低的子离子作为定性离子,最后采用多反应监测模式对去簇电压和碰撞电压等参数进行优化,优化后的结果如表2所示。

#### 2.1.2 色谱柱的选择

由于糖类物质的分子中存在大量羟基,这些亲水基团使其具有更好的亲水性和极性,在反相色谱中难以保留,因此文献中大多采用亲水作用色谱柱对糖类物质进行分析<sup>[26,28,30]</sup>。本研究比较了ACQUITY UPLC BEH HILIC (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )、ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )、ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )以及OSAKA SODA CAPCELL PAK ST (2.0 mm $\times$ 150 mm) 4种亲水作用色谱柱对目标化合物的分离效果。如图1所示, HILIC色谱柱和ST色谱柱对目标化合物的保留能力较差,同分异构体无法分离,其中ST色谱柱填料粒径较大,分离效果不佳。Amide色谱柱采用三键键合式的酰胺官能团,对糖类物质有较好保留效果,尤其是对目标化合物中4组同分异构体均能实现基线分离,有利于积分的准确性。由于还原糖在溶液中会发生变旋现象,即产生 $\alpha$ 和 $\beta$ 两种端基差向异构, LNB、3'-FL、LNFP-V 3个目标化合物的色谱峰出现了明显的分裂现象<sup>[31]</sup>。采用100 mm的Amide色谱柱时,由于无法完全分离端基差向异构体从而形成肩峰,通过增大色谱柱的长度,在一定程度上可改善其分离效果。为了更好地展示14种HMOs的分离情况,分别绘制了SHMOs和NHMOs的提取离子色谱图,结果如图2所示。当使用150 mm的Amide色谱柱时,4组同分异构体和3对端基

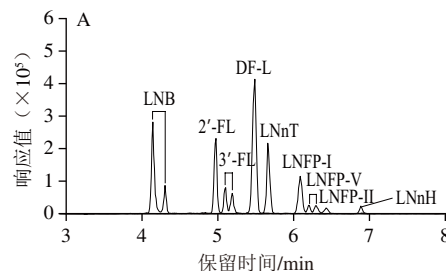
差向异构体的分离效果较好,在积分准确性上更有优势,因此最终选择ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱(2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )为分析柱。



A~D.分别为ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )、OSAKA SODA CAPCELL PAK ST色谱柱(2.0 mm $\times$ 150 mm)、ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )、ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱(2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )。

图1 不同色谱柱条件下HMOs总离子流色谱图

Fig. 1 Total current ion chromatograms of HMOs using different chromatographic columns



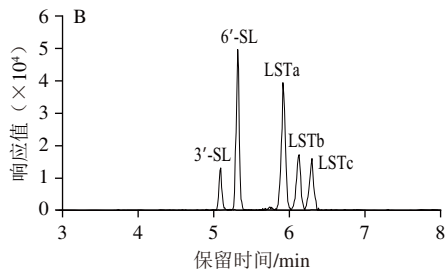
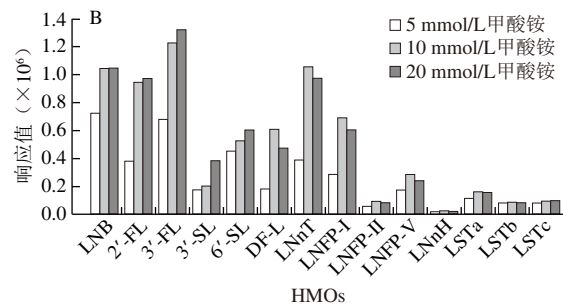
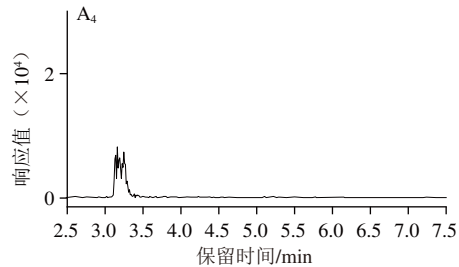
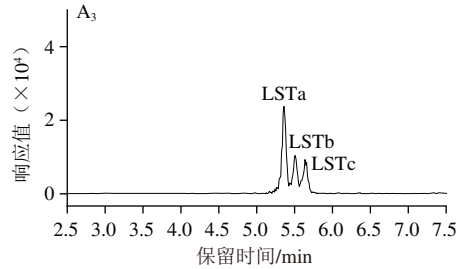
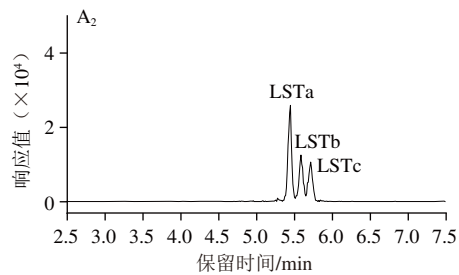
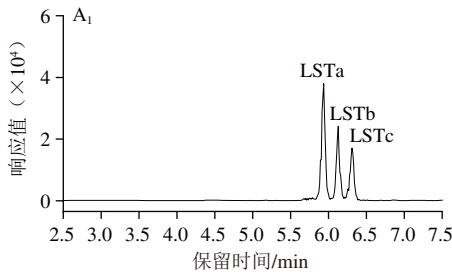


图2 9种NHMOs (A) 及5种SHMOs (B) 的提取离子色谱图

Fig. 2 Extracted ion chromatograms of 9 NHMOs (A) and 5 SHMOs (B)

### 2.1.3 流动相的选择

由于目标化合物中存在大量同分异构体和端基差向异构体,对色谱峰的分离程度和峰型要求较高,通过在流动相中添加改性剂,有利于改善目标化合物的峰型及分离效果,在糖类物质分析中,常用的改良剂为甲酸铵<sup>[26,30]</sup>。本研究分别考察了水-乙腈、5 mmol/L甲酸铵溶液-乙腈、10 mmol/L甲酸铵溶液-乙腈、20 mmol/L甲酸铵溶液-乙腈4种流动相体系对目标化合物响应及分离度的影响。如图3所示,在相同的流动相条件下,相对分子质量较大的目标化合物响应强度较低,SHMOs的响应强度低于相近分子质量的NHMOs。随着甲酸铵浓度的增大,SHMOs的响应强度逐渐增大,NHMOs则大部分呈现先升高后下降的趋势,多数在10 mmol/L时达到最高。在对分离度的影响方面,以SHMOs中3个分子质量较大的同分异构体LSTa、LSTb、LSTc为例,当流动相仅为水-乙腈时,保留时间短、响应强度较低且完全无法实现分离;加入甲酸铵后,其在色谱柱上的保留效果增强,峰型明显改善,同时响应强度增大、分离度提高,在甲酸铵浓度为20 mmol/L时分离效果最好。此外,其余3组同分异构体和3对旋光异构体的分离度均随着甲酸铵浓度的增大而增大。虽然在20 mmol/L甲酸铵条件下部分化合物的响应强度有所下降,但降低的程度较小,同时考虑到较好的分离度更有利于同分异构体积分的准确性,因此最终选择20 mmol/L甲酸铵溶液-乙腈作为流动相。



下标1~4分别为20、10、5 mmol/L甲酸铵-乙腈和水-乙腈。

图3 甲酸铵浓度对14种HMOs质谱响应强度(A)及LSTa、LSTb、LSTc分离程度(B)的影响

Fig. 3 Effect of ammonium formate concentration on the MS response for 14 HMOs (A) and the separation efficiency of LSTa, LSTb and LSTc (B)

## 2.2 前处理条件优化

### 2.2.1 蛋白质沉淀方法的选择

在进行质谱检测前,首先需要通过前处理将乳粉溶液中的脂肪和蛋白质去除。目前常用沉淀蛋白质的方法有等电点沉淀法<sup>[18]</sup>、乙醇沉淀法和乙腈沉淀法等<sup>[30-33]</sup>,为了有效清除乳液中的蛋白质,同时确保目标化合物不受影响,选择合适的蛋白沉淀方法十分重要。

等电点沉淀法是通过调节样液的pH值,当达到等电点时蛋白质分子电荷的平衡状态被打破,导致分子间的相互作用力减弱,进而形成沉淀。乳液中蛋白质主要为

酪蛋白，其等电点约为4.6，本实验通过在复溶后的乳液中加入适量的乙酸溶液，将其pH值调节至 $4.6 \pm 0.1$ ，待沉淀充分析出，样液经滤纸过滤并进行适当稀释后上机测试。

乙醇沉淀法和乙腈沉淀法是通过在样液中加入不同浓度的有机溶剂，破坏蛋白质中氢键，使蛋白质变性，同时破坏蛋白质胶体分子表面的水化层使分子聚集沉淀。本实验取复溶后的乳液1 mL，分别加入体积分数为100%、80%、60%的乙腈溶液和体积分数为100%、80%、60%的乙醇溶液，定容至10 mL，待沉淀充分析出，样液离心后适当稀释，上机测试。

如图4所示，采用乙腈沉淀时14种目标化合物的回收率随着乙腈体积分数的降低而增大，当以纯乙腈为沉淀剂时，样液中的蛋白质会迅速沉降并团聚，形成较大的沉淀颗粒，目标化合物与基质中的大分子发生了共沉淀，几乎均无回收。随着乙腈体积分数的降低，沉淀产生的速度变慢，沉淀变得更加细密，对目标化合物的影响也逐渐变小，当乙腈体积分数为60%时，对目标化合物的影响最小。相较之下，采用乙醇作为沉淀剂时，反应较为温和，且不同体积分数的乙醇溶液作为沉淀剂时目标化合物均有较好的回收，其中纯乙醇和80%乙醇溶液回收率略好于60%乙醇溶液，且沉淀后的溶液更为澄清。等电点沉淀法对目标化合物的回收率影响较小，14种目标化合物均能够较好地回收，但所产生的沉淀较为松散，易悬浮于溶液中，通过离心较难除去，必须采用滤纸过滤才可除尽沉淀，并且调节pH值的过程中需反复使用pH计测定，操作相较于乙醇沉淀法更为复杂。综合考虑几种沉淀方法对目标化合物回收率的影响、溶剂的毒性及操作的难易程度，最终选择体积分数100%乙醇作为沉淀剂。

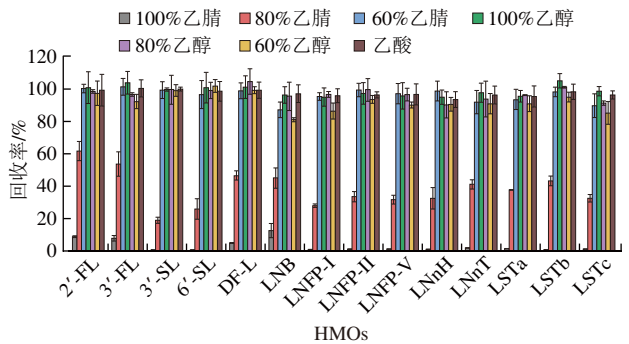


图4 不同沉淀剂对14种HMOs回收率的影响  
Fig. 4 Effects of different precipitants on the recovery rates of 14 HMOs

### 2.2.2 除脂方法的优化

本研究采用冷冻法进行除脂，由于脂肪的存在会造成一定程度的ME，从而影响目标化合物的回收率，因此本实验对比了不同冷冻温度和时间条件对目标化合物回

收率的影响，分别测定4、-18、-21℃条件下30 min、1 h、8 h、24 h后的加标回收率。结果表明，在4℃冷藏条件下，冷藏8 h以上回收率较好，-18、-21℃冷冻条件对回收率的影响差别不明显，冷冻1 h后即可达到较好的回收率，综合考虑时间及成本等条件，最终选择-18℃冷冻1 h进行除脂。

### 2.3 ME评价

实验对比了羊乳粉和牛乳粉两种基质条件下的ME，由表3可知，14种HMOs在牛奶粉和羊奶粉2种基质中的ME介于96.1%~110%之间，说明ME不明显，因此采用纯溶剂绘制的标准工作曲线即可满足实验的需求。

表3 14种HMOs的线性范围、线性方程、决定系数、LOD、LOQ及ME  
Table 3 Linear ranges, linear equations, determination coefficients, LOD, LOQ and ME of 14 HMOs

目标化合物	线性范围/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	线性方程	$R^2$	LOD/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	羊乳粉 ME/%	牛乳粉 ME/%
LNB	0.05~1	$y=3\,061\,760x-65\,642$	0.999 85	0.005	0.015	98.8	96.1
2'-FL	0.05~1	$y=4\,844\,150x-315\,988$	0.999 88	0.003	0.010	101	98.9
3'-FL	0.05~1	$y=2\,033\,590x-228\,137$	0.999 73	0.002	0.007	105	103
3'-SL	0.05~1	$y=571\,290x+43\,969$	0.999 84	0.010	0.034	102	100
6'-SL	0.05~1	$y=1\,170\,590x-40\,845$	0.999 29	0.009	0.031	109	104
DF-L	0.05~1	$y=1\,279\,710x-24\,477$	0.999 48	0.002	0.007	101	103
LNhT	0.05~1	$y=744\,452x-41\,366$	0.999 04	0.009	0.029	108	105
LNFP-I	0.05~1	$y=840\,617x-70\,232$	0.994 27	0.019	0.064	106	102
LNFP-II	0.05~1	$y=91\,233x-2\,108$	0.999 81	0.020	0.067	108	99.4
LNFP-V	0.05~1	$y=505\,676x-35\,058$	0.997 90	0.011	0.038	110	105
LNhH	0.05~1	$y=28\,397x-4\,273$	0.996 75	0.048	0.161	99.6	96.5
LSTa	0.05~1	$y=231\,135x-3\,487$	0.999 84	0.011	0.036	106	98.1
LSTb	0.05~1	$y=1\,025\,04x-1\,045$	0.999 90	0.027	0.091	105	101
LSTc	0.05~1	$y=1\,135\,57x-1\,288$	0.999 96	0.033	0.111	102	99.7

### 2.4 方法学验证

#### 2.4.1 标准曲线与定量分析

配制14种HMOs的系列混合标准溶液，以峰面积为纵坐标、质量浓度( $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标，绘制标准工作曲线，考察目标化合物线性范围和决定系数( $R^2$ )。如表3所示，14种HMOs在设定的质量浓度范围内呈现良好的线性关系， $R^2$ 均在0.994以上。以 $R_{\text{SN}}=3$ 计算检出限(limit of detection, LOD)，以 $R_{\text{SN}}=10$ 计算定量限(limit of quantification, LOQ)，14种HMOs的LOD在0.002~0.048  $\mu\text{g/mL}$ 之间，该LOD可满足实际样品中对乳粉中HMOs检测的需求。

#### 2.4.2 方法的回收率和精密度

采用优化后的条件在牛乳粉和羊乳粉两种空白样品中分别添加200、400、800 mg/100 g 3个水平的14种HMOs混合标准溶液，进行6次平行测定，计算方法的平均回收率及RSD。由表4可知，两种奶粉基质中14种HMOs的平均回收率在90.3%~109.2%之间，RSD为0.7%~9.7%，均小于10%，表明方法的准确度高、重现性好，符合乳粉中HMOs的分析需求。

表 4 14 种HMOs的加标回收率和RSD (n=6)  
Table 4 Recovery rates and RSD of 14 HMOs from spiked milk powder samples (n = 6)

目标化合物	加标量/(mg/100 g)	平均回收率/%		RSD/%	
		羊奶粉	牛奶粉	羊奶粉	牛奶粉
LNB	200	95.6	99.1	6.1	6.5
	400	101.1	104.3	7.7	4.1
	800	102.4	106.6	1.5	4.7
2'-FL	200	104.8	94.9	5.9	8.8
	400	105.1	103.1	3.8	2.3
	800	108.0	107.4	5.1	8.1
3'-FL	200	107.6	101.2	4.3	1.6
	400	102.2	108.7	5.8	3.9
	800	101.5	102.3	1.5	5.5
3'-SL	200	93.4	95.7	7.8	9.7
	400	105.0	106.8	2.0	1.5
	800	102.4	108.0	5.1	4.7
6'-SL	200	104.6	92.8	2.8	2.1
	400	98.3	102.0	4.8	5.0
	800	95.5	98.0	3.8	1.1
DF-L	200	102.3	102.1	8.9	1.6
	400	101.0	101.2	3.7	3.6
	800	97.9	91.2	1.2	2.1
LNnT	200	96.2	96.2	1.7	7.6
	400	101.7	106.6	6.8	2.7
	800	104.3	101.4	1.9	6.1
LNFP-I	200	105.4	108.0	4.1	2.6
	400	100.2	105.4	2.0	1.7
	800	101.9	108.9	0.8	2.3
LNFP-II	200	101.3	98.7	0.7	1.0
	400	104.6	100.3	8.7	6.1
	800	103.3	103.2	2.6	1.1
LNFP-V	200	109.2	102.9	0.7	5.3
	400	105.5	102.4	3.5	2.8
	800	109.0	106.8	8.7	3.8
LNnH	200	105.1	98.9	6.3	9.5
	400	101.3	98.7	1.9	8.1
	800	99.7	103.2	8.8	5.8
LSTa	200	100.8	107.2	2.4	7.4
	400	108.0	106.9	4.8	7.0
	800	104.4	101.0	4.9	3.2
LSTb	200	91.9	95.4	5.9	5.4
	400	101.2	97.2	8.4	3.1
	800	103.3	103.1	3.5	4.7
LSTc	200	95.6	90.3	5.9	5.1
	400	109.0	97.0	1.7	7.7
	800	105.4	100.7	8.2	2.8

2.4.3 与已报道方法的比较

如表5所示，本方法较HPLC法<sup>[18,25]</sup>前处理更为简便，无需除乳糖、进行酶解或衍生化处理等复杂前处理操作，仅需沉淀蛋白质、冷冻除脂后即可稀释上机。相较于离子色谱法<sup>[18,33]</sup>，分析时间更短，仅需9 min，同时不受乳粉基质中GOS的干扰，在积分准确性上更具优

势。对于已报道的质谱法<sup>[28,30]</sup>，多针对人乳基质进行研究，且所覆盖的目标化合物种类较少、灵敏度较低。综上所述，本方法具有前处理简便、分析时间短、灵敏度高、覆盖面广等优势，可实现对14种HMOs的快速分析。

表 5 本方法与已报道HMOs检测方法的比较  
Table 5 Comparison of the proposed method and previously reported methods for the determination of HMOs

基质类型	目标化合物数量	前处理方法	分析方法	分析时间/min	LOQ	参考文献
婴儿配方乳粉	2	等电点沉淀法、衍生	HPAEC-PAD HILIC-FLD	32	1.51~12.80 µg/mL 40~11 µg/mL	[18]
婴儿配方食品	7	酶解、衍生	HPLC-FLD	52	7.2~20 mg/100 g	[25]
人乳	6	衍生	UPLC-MS/MS	11.7	1.5~5.0 µg/mL	[28]
人乳	12	乙醇沉淀	UPLC-QQQ MS	40	/	[30]
人乳	22	乙醇沉淀	HPAEC	65	/	[33]
婴儿配方乳粉	14	乙醇沉淀	HILIC-MS/MS	9	0.007~0.161 µg/mL	本方法

2.5 实际样品分析

选取市售的6款婴幼儿配方乳粉进行检测，包括三段婴儿配方乳粉4个（样品1~4）、四段婴儿配方乳粉1个（样品5）、二段婴儿配方乳粉1个（样品6），其中样品1~4覆盖5种不同种类及含量的HMOs，样品5~6含有2种HMOs，每个样品进行2次平行实验，结果如图5所示。部分实测值高于明示值，其原因可能是基基本身含有该目标分析物而使得实测值较明示值偏高。采用本方法的检测结果均在明示值的±20%以内，符合GB 13432—2013《预包装食品特殊膳食食品标签》以及相关规定关于乳粉中营养物质实际含量不低于明示值80%的要求，说明本研究所采用的检测方法可满足对实际样品的测定。

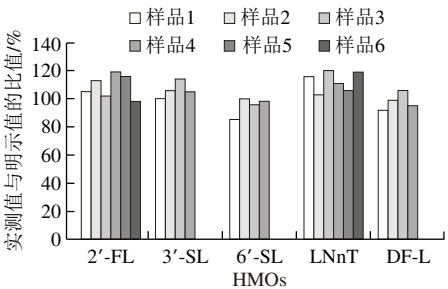


图 5 HMOs实测值与明示值的比值  
Fig. 5 Ratio of measured to labeled values of HMOs in real samples

3 结 论

本研究构建一种利用HILIC-MS/MS测定婴儿配方乳粉中14种HMOs的快速测定方法。方法学验证表明该方法具有良好的线性关系、较低的LOD、较高的准确度和精密度，且方法抗干扰能力强，不受HMOs常见的干扰物质如GOS等的影响，在实际检测中具有优势。该方法可为婴儿配方乳粉中HMOs的添加明示值提供科学的检验依据，为相关监管部门对婴儿配方乳粉中HMOs的监测提供技术支持，具有良好的应用前景。



## 参考文献:

- [1] AKKERMAN R, FAAS M M, DE VOS P. Non-digestible carbohydrates in infant formula as substitution for human milk oligosaccharide functions: effects on microbiota and gut maturation[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(9): 1486-1497. DOI:10.1080/10408398.2017.1414030.
- [2] ZHANG S H, LI T L, XIE J, et al. Gold standard for nutrition: a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 108. DOI:10.1186/s12934-021-01599-y.
- [3] ZUURVELD M, VAN WITZENBURG N P, GARSSSEN J, et al. Immunomodulation by human milk oligosaccharides: the potential role in prevention of allergic diseases[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 801. DOI:10.3389/fimmu.2020.00801.
- [4] DINLEYICI M, BARBIEUR J, DINLEYICI E C, et al. Functional effects of human milk oligosaccharides (HMOs)[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2186115. DOI:10.1080/19490976.2023.2186115.
- [5] WALSH C, LANE J A, VAN SINDEREN D, et al. Human milk oligosaccharides: shaping the infant gut microbiota and supporting health[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 72: 104074. DOI:10.1016/j.jff.2020.104074.
- [6] 卫生部. 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准: GB 14880—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 19.
- [7] TARRANT I, FINLAY B B. Human milk oligosaccharides: potential therapeutic aids for allergic diseases[J]. *Trends in Immunology*, 2023, 44(8): 644-661. DOI:10.1016/j.it.2023.06.003.
- [8] KUMAR B S, CHANDRA DAS J, MARUF-UL-QUADER M, et al. Human milk oligosaccharides and development of gut microbiota with immune system in newborn infants[J]. *American Journal of Pediatrics*, 2023: 204-209. DOI:10.11648/j.ajp.20230904.13.
- [9] ZHU L Y, LI H Y, LUO T, et al. Human milk oligosaccharides: a critical review on structure, preparation, their potential as a food bioactive component, and future perspectives[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(43): 15908-15925. DOI:10.1021/acs.jafc.3c04412.
- [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. DOI:10.16429/j.1009-7848.2023.06.044.
- [11] 卫生部. 食品营养强化剂使用标准: GB 14880—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 13-63.
- [12] SCHÖNKNECHT Y B, MORENO TOVAR M V, JENSEN S R, et al. Clinical studies on the supplementation of manufactured human milk oligosaccharides: a systematic review[J]. *Nutrients*, 2023, 15(16): 3622. DOI:10.3390/nu15163622.
- [13] 郇茜. 人乳寡糖的衍生化分离制备、再生及质谱结构分析[D]. 西安: 西北大学, 2019: 1-3.
- [14] 董人华, 滕国新, 王晓杰, 等. 牛乳低聚糖的结构和功能研究及其开发应用[J]. *中国乳品工业*, 2022, 50(12): 34-38. DOI:10.19827/j.issn1001-2230.2022.12.006.
- [15] 马心悦, 黄纯翠, 赵耀, 等. 人乳寡糖的结构及其分离分析[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2023, 50(12): 2869-2878. DOI:10.16476/j.pibb.2022.0573.
- [16] GU F J, KATE G A T, ARTS I C W, et al. Combining HPAEC-PAD, PGC-LC-MS, and 1D <sup>1</sup>H NMR to investigate metabolic fates of human milk oligosaccharides in 1-month-old infants: a pilot study[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(23): 6495-6509. DOI:10.1021/acs.jafc.0c07446.
- [17] 陈磊, PHILIP H, 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. DOI:10.16429/j.1009-7848.2019.10.028.
- [18] AUSTIN S, CUANY D, MICHAUD J, et al. Determination of 2'-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose in infant formula[J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2650. DOI:10.3390/molecules23102650.
- [19] CHRISTENSEN A S, SKOV S H, LENDAL S E, et al. Quantifying the human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose in different food applications by high-performance liquid chromatography with refractive index detection[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(2): 332-339. DOI:10.1111/1750-3841.15005.
- [20] MANK M, HAUNER H, HECK A J R, et al. Targeted LC-ESI-MS<sup>2</sup> characterization of human milk oligosaccharide diversity at 6 to 16 weeks post-partum reveals clear staging effects and distinctive milk groups[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(25): 6887-6907. DOI:10.1007/s00216-020-02819-x.
- [21] LIU F, VAN DER MOLEN J, KUIPERS F, et al. Quantitation of bioactive components in infant formulas: milk oligosaccharides, sialic acids and corticosteroids[J]. *Food Research International*, 2023, 174: 113589. DOI:10.1016/j.foodres.2023.113589.
- [22] DONG X, ZHOU S Y, MECHREF Y. LC-MS/MS analysis of permethylated free oligosaccharides and N-glycans derived from human, bovine, and goat milk samples[J]. *Electrophoresis*, 2016, 37(11): 1532-1548. DOI:10.1002/elps.201500561.
- [23] MA L, MCJARROW P, FONG B Y. Quantification of major milk oligosaccharides in a range of formulated milk powder products using high performance liquid chromatography-multi reaction monitoring-mass spectrometry[J]. *International Dairy Journal*, 2019, 94: 1-6. DOI:10.1016/j.idairyj.2019.03.001.
- [24] GARÁDI Z, TÓTH A, GÁTI T, et al. Utilizing the <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N NMR methods for the characterization of isomeric human milk oligosaccharides[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 2180. DOI:10.3390/ijms24032180.
- [25] 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. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2023.24.008.
- [26] 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. DOI:10.13590/j.cjfh.2017.04.006.
- [27] 李欣. 人乳寡糖的分离制备及其在婴儿配方粉中的含量分析研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2020: 35-44.
- [28] 童文峰, 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. DOI:10.16429/j.1009-7848.2021.07.034.
- [29] 周鹏, 王征, 高希, 等. 亲水作用色谱-质谱联用法测定茶叶中5种游离糖[J]. *分析试验室*, 2020, 39(11): 1322-1327. DOI:10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2020.040203.
- [30] 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): 138-143. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201804021.
- [31] 蒋士龙, 解庆刚, 王象欣, 等. 检测配方食品中目标母乳低聚糖的方法: CN113686992B[P]. 2023-08-11.
- [32] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201614015.
- [33] 魏远安, 郑惠玲, 吴少辉, 等. 中国母乳中低聚糖组分及含量变化: 以中国广东江门地区为例[J]. *食品科学*, 2017, 38(18): 180-186. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718029.