

荧光检测器应用方案 – 典型

FLD-T-0102

典型 – 母乳低聚糖 (HMOs) 检测



摘要

本实验参考食品安全国家标准 食品中母乳低聚糖的测定（征求意见稿）的色谱条件测试母乳低聚糖（HMOs），采用上海伍丰的 EX1800 液相色谱仪，建立了食品中母乳低聚糖的分析检测方法，本方案仅为方法开发与仪器性能验证之参考。

前言

母乳低聚糖 (Human Milk Oligosaccharides, HMOs) 是母乳中含量仅次于乳糖和脂肪的第三大固体成分, 占比约 8%, 在调节婴幼儿肠道菌群、促进免疫系统发育及大脑发育等方面发挥关键作用。2023 年 10 月, 国家卫健委正式批准 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-FL) 和乳糖-N-新四糖

(LNnT) 作为“三新食品”添加至婴幼儿配方食品, HMOs 由此进入合规应用快车道。然而, 检测方法标准的建设明显滞后于产品端的扩张。目前, 《食品中母乳低聚糖的测定》食品安全国家标准已获批立项, 旨在填补国标方法空白, 规范行业检测需求。

本实验旨在验证本公司仪器能够建立了食品中母乳低聚糖的分析检测方法, 以供客户参考。



实验准备

设备:

-  EX1800 二元高压泵
-  EX1800 荧光检测器
-  EX1800 自动进样器

试剂与材料:

- a) 乙酸钠 (CH_3COONa) 。
- b) 乙酸 (CH_3COOH) 。
- c) 乙腈 (CH_3CN) : 色谱纯。
- d) 甲酸 (HCOONH) : 色谱纯。
- e) 甲酸铵 (HCOONH_4) : 色谱纯。
- f) 二甲基亚砷[(CH_3)₂SO]。
- g) 淀粉葡萄糖苷酶 (来自黑曲霉, CAS 号: 9032-08-0) : 酶活力单位 ≥ 8 U/mg。
- h) β -半乳糖苷酶 (来自黑曲霉, CAS 号: 9031-11-2) : 酶活力单位 ≥ 4000 U/mL。
- i) 2-氨基苯甲酰胺 ($\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$) 。
- j) 2-甲基吡啶硼烷 ($\text{C}_6\text{H}_7\text{N}\cdot\text{BH}_3$) 。



标准品和样品:

7 种母乳低聚糖标准物质和昆布三糖标准物质信息:

序号	名称	简称	CAS	纯度
1	2'-岩藻糖基乳糖	2'-FL	41263-94-9	98.20%
2	3'-岩藻糖基乳糖	3'-FL	41312-47-4	95.70%
3	昆布三糖	IS-昆布三糖	3256-04-0	99.48%
4	双岩藻糖基乳糖	DFL	20768-11-0	95%
4	3'-唾液酸化乳糖	3'-SL	35890-38-1	98.40%
5	乳糖-N-四糖	LNT	14116-68-8	98.64%
6	乳糖-N-新四糖	LNnT	13007-32-4	95%
7	6'-唾液酸化乳糖	6'-SL	35890-39-2	99.99%

标准溶液的配制、标准溶液的衍生、试样的提取、试样的酶解以及酶解液的衍生参考食品国家安全标准 食品中母乳低聚糖的测定（征求意见稿）。

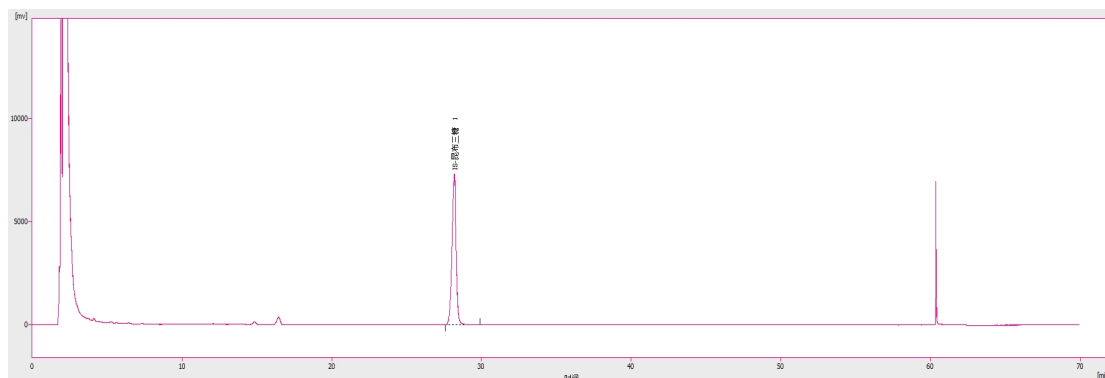
检测方法

泵				
流动相	A 为乙腈, B 为 50mM 甲酸铵 (甲酸调 pH 至 4.2±0.1)			
	时间 (min)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
	0	88	12	0.9
	4	88	12	0.9
	45	80	20	0.9
	58	80	20	0.9
	58.1	20	80	0.9
	60	20	80	0.9
	61	88	12	0.9
	70	88	12	0.9
进样器				
进样量	10μL			
荧光检测器				
激发波长	330 nm			
发射波长	420 nm			
柱温箱				
温度	60℃			
色谱柱				
型号种类	酰胺基键合的全多孔型硅胶色谱柱 Amide 4.6×150 mm, 2.5μm			

检测结果

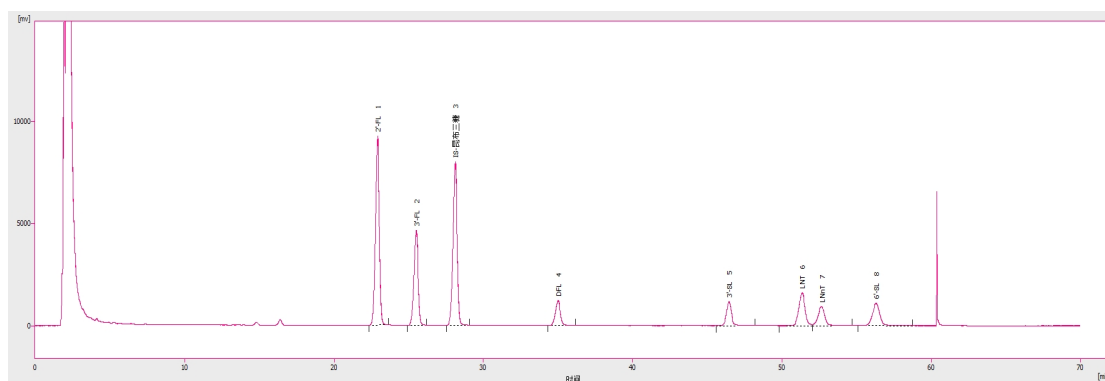
1. 谱图

(1) 空白溶剂和昆布三糖标准物质衍生物



进空白溶剂水和昆布三糖内标，对 7 种母乳低聚糖出峰无干扰。

(2) 7 种母乳低聚糖标准物质 (250mg/L) 和昆布三糖标准物质衍生物

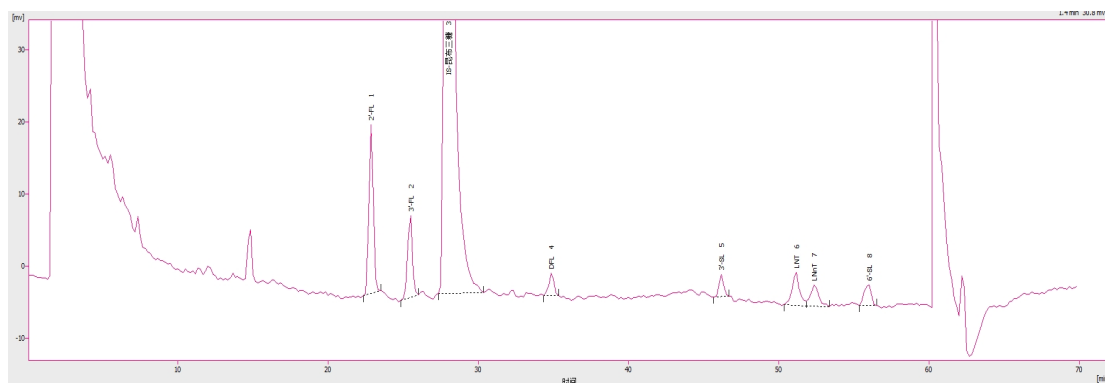


	化合物名称	保留时间 [min]	峰面积 [a.u..s]	峰高 [a.u.]	面积 [%]	含量 [mg/L]	柱效 [th.pl]	对称/拖尾因子 [-]	分离度 [-]	SN
1	2'-FL	22.937	33480.698	1847.621	28.9	253.710	36306	0.919		2427.711
2	3'-FL	25.520	17855.818	931.035	15.4	255.867	40089	0.932	5.226	1223.347
3	IS-昆布三糖	28.140	30849.096	1600.757	26.6	359.504	48743	0.924	5.153	2103.339
4	DFL	35.017	5708.446	245.396	4.9	260.113	54411	1.004	12.420	322.442
5	3'-SL	46.470	5451.986	233.437	4.7	256.096	99548	1.038	19.307	306.729
6	LNT	51.353	9272.137	320.818	8.0	257.189	74334	1.052	7.294	421.544
7	LNnT	52.667	5939.105	187.568	5.1	256.250	70562	0.939	1.703	246.458
8	6'-SL	56.320	7433.716	220.924	6.4	256.021	69362	1.035	4.444	290.286
	合计		115991.002	5587.556	100.0	2154.750				7341.856

进高浓度 7 种母乳低聚糖混标 (2'-FL 浓度为 250mg/L, 其余 6 种母乳低聚糖为 75mg/L), 目标物得到了很好的分离, 即使对于结构高度相似的乳糖-N-四糖 (LNT) 和乳糖-N-新四糖 (LNnT), 也实现了基线分离 (分离度 > 1.7)。

2. 灵敏度

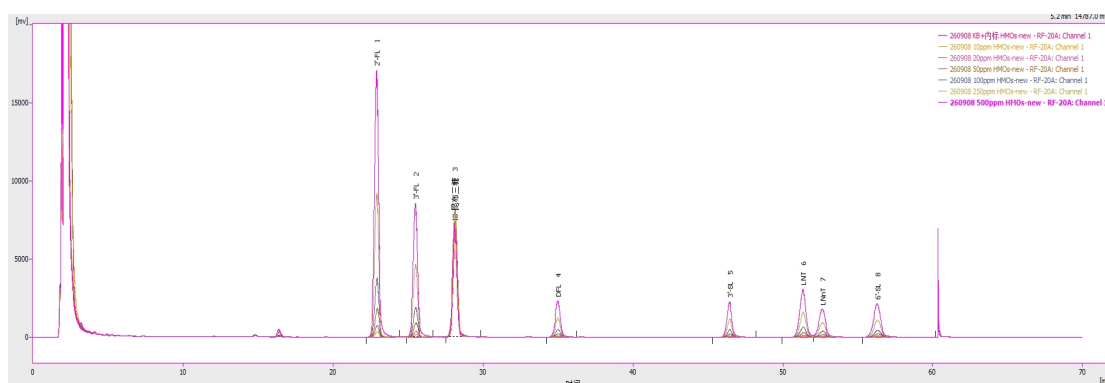
7 种母乳低聚糖标准物质和昆布三糖标准物质衍生物



	化合物名称	保留时间 [min]	峰面积 [a.u.s]	峰高 [a.u.]	面积 [%]	含量 [mg/L]	柱效 [th.pl]	对称/拖尾因子 [-]	分离度 [-]	SN
1	2'-FL	22.833	93.469	4.684	3.5	0.708	11553	1.250		131.800
2	3'-FL	25.500	50.579	2.259	1.9	0.725	14410	1.000	3.147	63.553
3	IS-昆布三糖	28.000	2431.542	105.916	90.8	28.336	17373	1.167	2.950	2980.200
4	DFL	34.833	14.720	0.618	0.5	0.671	26888	1.000	8.063	17.389
5	3'-SL	46.167	13.636	0.626	0.5	0.641	26567	1.250	11.463	17.622
6	LNT	51.167	31.153	0.906	1.2	0.864	32634	0.900	4.425	25.505
7	LNnT	52.333	23.299	0.590	0.9	1.005	34139	1.500	1.033	16.609
8	6'-SL	56.000	18.531	0.565	0.7	0.638	39090	0.750	3.245	15.889
	合计		2676.929	116.165	100.0	33.588				3268.567

进低浓度 7 种母乳低聚糖混标（2'-FL 浓度为 1mg/L，其余 6 种母乳低聚糖为 0.3mg/L），信噪比都 > 10，满足标准对于母乳低聚糖的定量限要求。

3. 线性



序号	化合物	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数 (R ²)
1	2'-岩藻糖基乳糖 (2'-FL)	0, 10, 20, 50, 100, 250, 500	y = 0.0045x	0.9998
2	3'-岩藻糖基乳糖 (3'-FL)	0, 3, 6, 15, 30, 75, 150	y = 0.0082x	0.9999
3	双岩藻糖基乳糖 (DFL)	0, 3, 6, 15, 30, 75, 150	y = 0.0026x	0.9999
4	3'-唾液酸化乳糖 (3'-SL)	0, 3, 6, 15, 30, 75, 150	y = 0.0024x	0.9999
5	乳糖-N-四糖 (LNT)	0, 3, 6, 15, 30, 75, 150	y = 0.0041x	1
6	乳糖-N-新四糖 (LNnT)	0, 3, 6, 15, 30, 75, 150	y = 0.0027x	0.9999
7	6'-唾液酸化乳糖 (6'-SL)	0, 3, 6, 15, 30, 75, 150	y = 0.0033x	0.9999

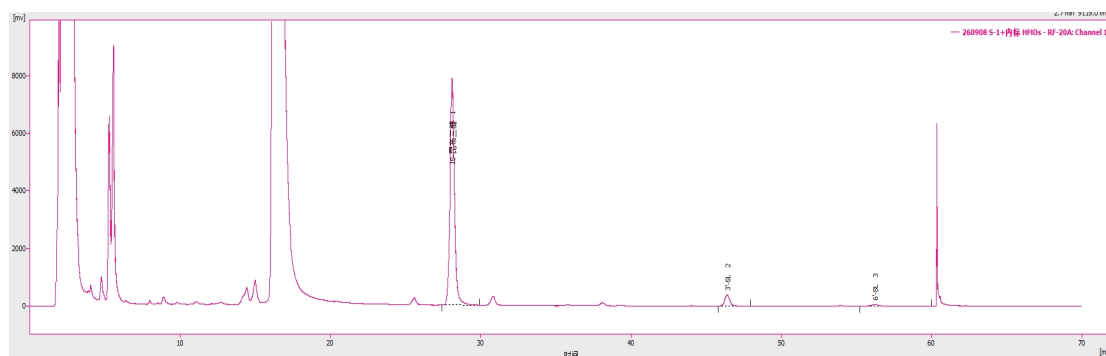
分别以标准工作液的浓度为横坐标，以 7 种母乳低聚糖的峰面积与内标昆布三糖的峰面积比值为纵坐标，绘制标准曲线。结果显示，2'-岩藻糖基乳糖（2'-FL）在 0~500mg/L 范围内具有良好的线性，其余 6 种母乳低聚糖在 0~150mg/L 范围内具有良好的线性。

4. 纯牛奶中母乳低聚糖的测试

准确移取 10.02g 纯牛奶，用水定容至，混匀，备用。

吸取 200 μ L 试样置于 2mL 离心管中，加入 100 μ L 淀粉葡萄糖苷酶溶液，涡旋至充分混匀。将离心管置于 60 $^{\circ}$ C 水浴中保温 60min 后取出，沸水浴 5min，冷却至室温。所得酶解液加入 100 μ L 昆布三糖内标溶液，涡旋至充分混匀。

然后移取酶解液 100 μ L 于 2mL 离心管中，加入 100 μ L 2-氨基苯甲酰胺衍生溶液，涡旋至充分混匀。将离心管置于 65 $^{\circ}$ C 水浴中保温 60min 后取出冷却。向衍生后的酶解液离心管中加入 1mL 乙腈溶液，混匀后 10,000r/min 离心 1min，上清液用 0.22 μ m 亲水 PTFE 针式滤器过滤后，进液相色谱测定。



通过内标法进行计算，纯牛奶中 3'-SL 含量为 11.3mg/100g，6'-SL 含量为 2.13mg/100g。

结论

采用上海伍丰的 EX1800 液相色谱仪（二元泵+荧光检测器），按照食品安全国家标准 食品中母乳低聚糖的测定（征求意见稿）的色谱条件测试母乳低聚糖（HMOs），目标化合物峰形对称性好、所有相邻峰都能实现基线分离、且具有良好的线性。实验结果表明，该仪器可有效实现食品中母乳低聚糖（HMOs）的准确定量。方法可供客户参考。

本方案仅为方法开发与仪器性能验证之参考，文中数据基于实验室加标样品获得，不构成对任何实际样品或批次的检测结论。