

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

高芳, 汪龙飞, 卜汉萍, 鲍蕾*

[雀巢研发(中国)有限公司, 雀巢食品安全研究院, 北京 100016]

摘要: **目的** 建立高效液相荧光光谱法(high performance liquid chromatography with fluorescence detector, HPLC-FLD)检测婴幼儿配方食品配方奶粉中7种母乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs)的分析方法。**方法** 婴幼儿配方食品复溶后, 首先通过酶解处理(β -半乳糖苷酶和淀粉葡萄糖苷酶)去除婴幼儿配方食品基质中存在的HMOs干扰物, 例如麦芽糊精和低聚半乳糖, 酶解后向样品溶液中添加内标物质, 后使用衍生化方法使得目标HMOs和内标物质均标记荧光基团(2-氨基苯甲酰胺), 即可运用HPLC-FLD对其进行检测。该方法使用HMOs外标法进行目标物的定量分析, 且标准物质信号均亦通过内标物矫正。**结果** 婴幼儿配方食品中7种HMOs可通过酶解、衍生及HPLC-FLD检测, 使用外标法进行定量分析。通过内标物质可矫正信号, 减少实验偏差。7种HMOs [2'-岩藻糖基乳糖(2'-fucosyllactose, 2'-FL)、3-岩藻糖基乳糖(3-fucosyllactose, 3-FL)、双岩藻糖基乳糖(difucosyllactoses, DFL)、乳糖-N-四糖(lacto-N-tetraose, LNT)、乳糖-N-新四糖(lacto-N-neotetraose, LNnT)、3'-唾液酸乳糖(3'-sialyllactose, 3'-SL)和6'-唾液酸乳糖(6'-sialyllactose, 6'-SL)]可检测范围分别为20.0~1247.9、18.3~1146.2、7.6~455.1、16.4~821.9、16.3~814.2、7.2~431.6、8.0~477.2 mg/100 g powder, 平均回收率为91%~110%, 相对标准偏差低于3%。**结论** 该方法可实现0~36月龄婴幼儿配方食品中7种HMOs的定量检测, 结果准确可靠。

关键词: 高效液相荧光光谱法; 母乳低聚糖; 酶解; 衍生; 定量检测

Determination of 7 kinds of human milk oligosaccharides by high performance liquid chromatography with fluorescence detector

GAO Fang, WANG Long-Fei, BU Han-Ping, BAO Lei*

[Nestlé China Food Safety Institute, Nestlé R&D (China) Ltd., Beijing 100016, China]

ABSTRACT: **Objective** To establish analysis method for the determination of 7 kinds of human milk oligosaccharides (HMOs) in infant formula food by high performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLD). **Methods** After the infant formula food was redissolved, the HMO interferents present in the matrix of infant formula food, such as maltodextrin and oligosaccharides, were first removed through enzymatic hydrolysis (β -galactosidase and starch glucosidase). After enzymatic hydrolysis, internal standard substances were added to the sample solution, and derivatization methods were used to label both the target HMOs and internal standard substances with fluorescent groups (2-aminobenzamide), which could be detected by HPLC-FLD. This method used HMOs external standard method for quantitative analysis of the target substance, and the signal of the standard substance was also corrected by internal standard. **Results** The 7 kinds of HMOs in infant formula food

*通信作者: 鲍蕾, 研究员, 主要研究方向为食品安全与标准。E-mail: Lei.bao@rd.nestle.com

*Corresponding author: BAO Lei, Professor, Nestlé R&D (China) Ltd., No.6, Jiuxianqiao Road, Chaoyang District, Beijing 100016, China. E-mail: Lei.bao@rd.nestle.com

could be quantitatively analyzed through enzymatic hydrolysis, derivatization, and HPLC-FLD detection by using external standard method. Signal correction could be achieved through internal standard substances, and experimental bias was reduced. The detectable ranges for 7 kinds of HMOs [2'-fucosyllactose (2'-FL), 3-fucosyllactose (3-FL), difucosyllactoses (DFL), lacto-N-tetraose (LNT), lacto-N-neotetraose (LNnT), 3'-sialyllactose (3'-SL) and 6'-sialyllactose (6'-SL)] were 20.0–1247.9, 18.3–1146.2, 7.6–455.1, 16.4–821.9, 16.3–814.2, 7.2–431.6, 8.0–477.2 mg/100 g powder, respectively, and the average recoveries were 91%–110% with relative standard deviations of less than 3%. **Conclusion** This method can achieve quantitative detection of 7 kinds of HMOs in formula foods for infants and young children aged 0–36 months, with accurate and reliable results.

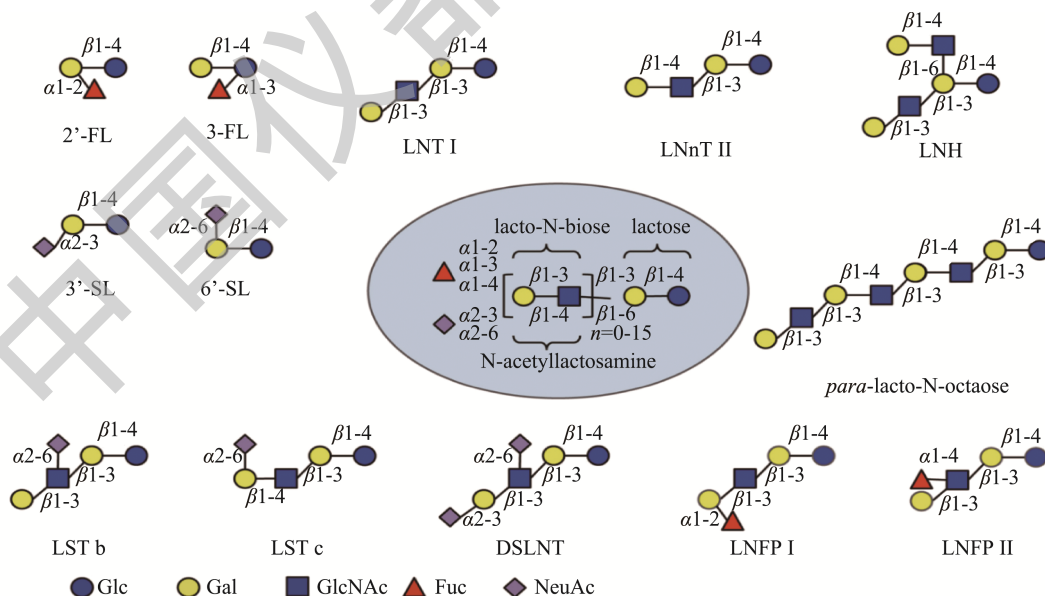
KEY WORDS: high performance liquid chromatography with fluorescence detector; human milk oligosaccharides; enzymatic digestion; derivatization; quantitative detection

0 引 言

母乳是新生儿的主要食物来源, 其中含多种生物分子, 例如蛋白质、脂肪和糖类化合物等。研究表明, 母乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs)是母乳中继乳糖及脂肪之后的第三大主要成分。较多研究发现, HMOs 对婴幼儿的发育有 4 个相关方面的重要功能: (1) 起益生元作用, 选择性促进婴幼儿肠道内有益微生物的定植和增长并抑制有害微生物; (2) 抵御有害细菌、病毒和寄生虫对肠黏膜的入侵; (3) 调控免疫反应, 促进免疫系统的成熟, 降低过敏性疾病的发生概率; (4) 可以帮助婴儿大脑和神经系统的发育, 促进智力和认知能力的提高^[1-6]。

HMOs 在糖基转移酶的作用下可形成或直链或支链型低聚糖。目前, 母乳中已有 200 多种 HMOs 被识别。

研究发现, HMOs 通常含乳糖结构[葡萄糖(glucose, Glc)和半乳糖(galactose, Gal)], 在此基础上结合 N-乙酰基-D-氨基葡萄糖(N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)以及单糖, 例如唾液酸[N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, NeuAc)]和岩藻糖(fucose, Fuc), 从而产生多种 HMOs 分子结构。其中, 多个 HMOs 为母乳中特有分子。一般来说, 不同人种和居住地母亲母乳中 HMOs 含量不同, 且随泌乳期变化, HMOs 总量在初乳期较高, 之后逐步下降, 早产母亲母乳中 HMOs 含量高于足月生产母亲母乳^[7-10]。HMOs 总量在初乳中和成熟母乳中分别约为 20~23 g/L 和 12~14 g/L, 其中岩藻糖基 HMOs 约占比 35%~50%, 唾液酸基 HMOs 为 12%~14%, 非岩藻糖基中性 HMOs 则为 42%~55%。以 HMOs 分子为例, 主要有 15 种 HMOs 结构在母乳中含量相对较高(如图 1)^[11-14]。



注: 2'-岩藻糖基乳糖(2'-fucosyllactose, 2'-FL); 3-岩藻糖基乳糖(3-fucosyllactose, 3-FL); 乳糖-N-四糖I (lacto-N-tetraose I, LNT I); 乳糖-N-新四糖 II (lacto-N-neotetraose II, LNnT II); 乳糖-N-六糖(lacto-N-hexaose, LNH); 3'-唾液酸乳糖(3'-sialyllactose, 3'-SL); 6'-唾液酸乳糖(6'-sialyllactose, 6'-SL); 唾液酸乳糖-N-四糖b (sialic lactose-tetrasaccharide b, LST b); 唾液酸乳糖-N-四糖c (sialic lactose-tetrasaccharide c, LST c); 二唾液酸乳糖-N-四糖(disialyllacto-N-tetraose, DSLNT); 乳-N-岩藻五糖I (lacto-N-fucopentaose I, LNFP I); 乳-N-岩藻五糖II (lacto-N-fucopentaose II, LNFP II)。

图1 HMOs的结构示例^[13]

Fig.1 Structural elucidation of HMOs^[13]

一般婴幼儿配方食品中不含 HMOs, 为使配方食品喂养婴幼儿可同样吸收 HMOs 达到促进发育的目的, 现婴幼儿配方食品中多按一定比例添加 HMOs, 使其营养成分和功效更加贴近母乳^[15-16]。截至 2022 年 12 月 1 日, 欧盟^[17-19]和美国^[20-23]已经分别批准了 2'-FL、3-FL、双岩藻糖基乳糖(difucosyllactoses, DFL)、LNT、LNnT、3'-SL 和 6'-SL 7 种不同 HMO 的单个成分和它们的混合物作为新食品原料和“一般公认安全”(generally recognized as safe, GRAS)物质。此外澳大利亚新西兰(澳新)地区也已批准在婴儿配方食品和幼儿配方辅助食品中单独使用 2'-FL 或与 LNnT 混合使用。以上国家和组织对使用限量也进行了规定(表 1)。

表 1 HMOs 各地区批准使用最大量
Table 1 Allowable addition range of HMOs in different regions

化合物名称	各地区批准使用最大量/(g/L)		
	欧盟	美国	澳新地区
2'-FL	1.2	2.4	2.4
3-FL	0.85	0.44	/
LNT	0.8	0.8	*
LNnT	0.6	0.6	0.6
3'-SL	0.2	0.2	*
6'-SL	0.4	0.4	*
2'-FL/DFL	1.6	1.6	*

注: *近期刚获批可添加, 限量未知^[24]; /未被批准使用。

HMOs 在我国按照食品添加剂中的“营养强化剂”实施管理。近期, 国家食品安全风险评估中心对 2'-FL 和 LNnT 作为营养强化剂新品种在婴儿配方食品、较大婴儿配方食品、幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品和调制乳品(仅限儿童用乳粉)的用量和使用范围公开征求了意见, 并随后批准使用。

现阶段, 随 HMOs 相关法规的更新, HMOs 的检测方法也有逐步积累。离子色谱法(例如团体标准:《食品中 6 种母乳低聚糖的测定 离子色谱法》)作为糖类化合物的常规检测技术手段也应用于婴幼儿配方食品中 6 种 HMOs 的检测, 经研究, 酶解有助于提高 HMOs 检测种类及方法灵敏度^[25-26]。液相色谱-串联质谱法(例如团体标准: T/TDSTIA 032—2023《婴幼儿配方乳粉中 7 种母乳低聚糖的测定 液相色谱-质谱法》)具有高灵敏度特点, 且可检测多种 HMOs, 研究发现, 通过样品溶液简单离心和萃取即可完成样品前处理。但该方法回收率偏低, 会因离心导致部分 HMOs 与基质中其他大分子共沉淀^[27]。且部分 HMOs 结构十分相似(如图 1 显示)并且存在同分异构体, 色谱图中呈现多个峰, 对色谱分离和谱图积分存在挑战^[28], 有学者尝试通过将 HMOs 衍生解决相关挑战^[28]。因此, 结合样品溶液酶解以及衍生, 采用高

效液相荧光色谱法(high performance liquid chromatography with fluorescence detector, HPLC-FLD)进行检测的方法兼具特异性和方法灵敏度^[29-30], 该技术手段被多方认可。本研究采用酶解样品溶液, 并通过 HMOs 衍生从而标记荧光信号的方式定量检测婴幼儿配方食品中 7 种 HMOs, 期为婴幼儿配方奶粉标签声称值提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

婴幼儿配方食品样品购置于大型超市或网络官方购物平台。

乙腈(色谱纯)、乙酸钠(纯度>99%)、乙酸(纯度>99.7%)、二甲亚砜(色谱纯)、甲酸铵(纯度>99.0%)、甲酸(质谱纯)、1.0 mol/L 氢氧化钠、2-甲基吡啶硼烷复合物(纯度 95%)(德国默克公司); 水(超纯水); 2-氨基苯甲酰胺(99%纯度, 梯希爱上海化成公司); β -半乳糖苷酶混悬液(黑曲霉来源, 活度 4000 U/mL)、昆布三糖(纯度>98%)(爱尔兰 Megazyme 公司); 淀粉葡萄糖苷酶(黑曲霉来源, 活度 8.1 U/mg, 德国 Roche diagnostics GmbH 公司)。

1.2 标准品

HMOs 标准物质相关信息如表 2。

表 2 HMOs 相关信息
Table 2 Information related to HMOs

名称	CAS 号	分子式	分子量
2'-FL	41263-94-9	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₅	488.44
3-FL	41312-47-4	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₅	488.44
DFL	20768-11-0	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₉	634.68
LNT	14116-68-8	C ₂₆ H ₄₅ NO ₂₁	707.63
LNnT	13007-32-4	C ₂₆ H ₄₅ NO ₂₁	707.63
3'-SL	35890-38-1	C ₂₃ H ₃₉ NO ₁₉	633.55
6'-SL	35890-39-2	C ₂₃ H ₃₉ NO ₁₉	633.55

1.3 仪器与设备

U3000 超高效液相色谱串联荧光检测器、Legend Micro 21R 离心机、Basic Vortex Mixer 涡旋振荡器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); AT200 分析天平(精度 0.01 g, 瑞士梅特勒-托利多公司); Elmasonic P 超声清洗机(德国艾尔玛公司); 691 pH 计(瑞士万通公司); SW22 恒温水浴振荡器(德国优莱博公司); Integral 5 超纯水机(德国密理博公司); 色谱柱 ACQUITY UPLC BEH Glycan (150 mm×2.1 mm, 1.7 μ m)(美国沃特世公司)。

1.4 标准溶液配制

2'-FL 储备液: 准确称取 50 mg \pm 5 mg 标准物质, 加水溶解定容至 5 mL 容量瓶中。

3-FL 储备液: 准确称取 50 mg±5 mg 标准物质, 加水溶解定容至 5 mL 容量瓶中。

DFL 储备液: 准确称取 25 mg±3 mg 标准物质, 加水溶解定容至 5 mL 容量瓶中。

LNT 储备液: 准确称取 50 mg±5 mg 标准物质, 加水溶解定容至 5 mL 容量瓶中。

LNnT 储备液: 准确称取 50 mg±5 mg 标准物质, 加水溶解定容至 5 mL 容量瓶中。

3'-SL 储备液: 准确称取 25 mg±3 mg 标准物质, 加水溶解定容至 5 mL 容量瓶中。

6'-SL 储备液: 准确称取 25 mg±3 mg 标准物质, 加水溶解定容至 5 mL 容量瓶中。

各储备液可于-18℃条件下保存 1 年, 备用。储备液浓度需结合各个 HMO 标准物质纯度计算。

HMOs 标准品混合工作溶液: 因每种 HMO 标准品工作溶液的目标浓度水平均为 6 个, 为节约标准曲线制备时间, 本方法将浓度水平近似的 7 种 HMOs 混合成为混合工作溶液, 即最终形成 6 个浓度水平的混合工作溶液, 每一浓度水平中含 7 种 HMOs。如表 3 所示, 向与混合工作溶液某一浓度水平对应的容量瓶中, 依次转移各 HMO 标准物质储备液, 储备液转移体积已于表 3 中列出, 加水稀释至刻度线, 各标准物质最终浓度通过计算可得。

工作溶液可于-18℃条件下保存 1 年, 4℃下保存 1 周, 备用。

昆布三糖储备液: 称取约 50 mg 昆布三糖加水溶解, 移至 50 mL 容量瓶中并稀释至刻度线。

昆布三糖工作溶液(内标溶液): 转移 10.0 mL 昆布三糖储备液至 25 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度线。

昆布三糖储备液及工作溶液可于-18℃条件下保存 1 年, 备用。

1.5 酶解溶液配制

移取 5.8 mL 乙酸于 400 mL 水中, 滴加 1.0 mol/L 氢

氧化钠溶液调节 pH 至 4.50±0.05。转移该乙酸钠缓冲液至 500 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度线。

淀粉葡萄糖苷酶溶液(70 U/mL): 于 1 mL 乙酸钠缓冲液中涡旋溶解 8.6 mg 淀粉葡萄糖苷酶样品, 现用现配。

β-半乳糖苷酶和淀粉葡萄糖苷酶混合液: 取 0.1 mL β-半乳糖苷酶混悬液与 0.4 mL 70 U/mL 淀粉葡萄糖苷酶溶液混合, 现用现配。

1.6 衍生溶液配制

量取 4.7 mL 二甲基亚砜和 2.0 mL 乙酸, 涡旋混匀。

准确称量(286±5) mg 2-氨基苯甲酰胺及(625±5) mg 2-甲基吡啶硼烷复合物于 6 mL 上述溶液中, 涡旋混匀。此衍生液可于-18℃条件下保存 3 个月, 备用。

1.7 实验方法

1.7.1 样品稀释

准确称取 25.0 g±0.1 g 奶粉样品(精确至 0.01 g)至 250 mL 锥形瓶中, 向样品中加入 200.0 g±0.2 g 水(精确至 0.01 g), 于 70℃±2℃水浴中振荡 25~30 min, 后取出冷却至室温, 此溶液为复原乳。

准确称取 20.0 g±0.5 g 复原乳加水混匀, 定容于 50 mL 容量瓶中, 此溶液为样品稀释液。

1.7.2 标准品衍生

准确移取 200 μL 标准品溶液至 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 乙酸钠缓冲液及 100 μL 昆布三糖内标溶液, 涡旋混匀。准确转移 100 μL 混合液至另一 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 衍生溶液, 涡旋混匀后置于 65℃±2℃水浴锅中 60 min±5 min。取出后涡旋至少 10 s, 转移至 2~8℃冰箱冷藏 5 min 后取出。向离心管中加入 1000 μL 乙腈-水(1:3, V:V)稀释液, 涡旋混匀, 于 10000×g 下离心 5 min。上清液用于上机分析。

每一浓度水平标准品溶液均重复此操作。

表 3 HMOs 标准品混合工作溶液配制
Table 3 Preparation of mixed working solutions of HMOs standard

混合工作溶液	2'-FL 储备液 /μL	3-FL 储备液 /μL	DFL 储备液 /μL	LNT 储备液 /μL	LNnT 储备液 /μL	3'-SL 储备液 /μL	6'-SL 储备液 /μL	容量瓶体积 /mL
1	4.0	4.0	2.0	4.0	4.0	2.0	2.0	10.00
2	25.0	25.0	10.0	20.0	20.0	10.0	10.0	5.00
3	50.0	50.0	20.0	40.0	40.0	20.0	20.0	5.00
4	75.0	75.0	30.0	60.0	60.0	30.0	30.0	5.00
5	100.0	100.0	40.0	80.0	80.0	40.0	40.0	5.00
6	125.0	125.0	60.0	100.0	100.0	60.0	60.0	5.00

1.7.3 样品酶解

准确移取 200 μL 样品稀释液至 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 淀粉葡萄糖苷酶溶液, 涡旋混匀后置于 60°C \pm 2°C 水浴锅中 60 min \pm 2 min, 取出混匀放至室温。

当婴幼儿配方奶粉中含低聚半乳糖成分, 需另取 200 μL 样品稀释液至另一 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL β -半乳糖苷酶和淀粉葡萄糖苷酶混合液, 涡旋混匀后置于 60°C \pm 2°C 水浴锅中 60 min \pm 2 min, 取出混匀放至室温。

1.7.4 样品衍生

向酶解后样品溶液中加入 100 μL 昆布三糖内标溶液, 涡旋混匀后移取 100 μL 上述溶液于 2.0 mL 离心管中, 加入 100 μL 衍生溶液, 涡旋混匀后置于 65°C \pm 2°C 水浴锅中加热 60 min \pm 5 min。取出后涡旋, 转移至 2~8°C 冰箱冷藏 5 min 后取出。向离心管中加入 1000 μL 乙腈:水 (1:3, $V:V$) 稀释液, 涡旋混匀, 于 10000 \times g 下离心 5 min。上清液用于上机分析。

每个酶解后样品均重复此操作。

1.8 仪器检测

1.8.1 色谱条件

流动相 A: 水(50 mmol/L 甲酸铵, pH 4.4); 流动相 B: 乙腈; 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH Glycan (150 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 60°C(测定羊乳基产品时, 选择 75°C); 进样体积: 2 μL ; 色谱负载泵流速: 0.5 mL/min; 色谱梯度洗脱程序: 0~4.0 min, B 维持在 90.0%; 4.0~38.0 min, B 从 90.0% 降低至 80.1%; 38.0~38.5 min, B 从 80.1% 减至 20.0%; 38.5~41.5 min, B 维持在 20.0%; 41.5~42.0 min, B 从 20.0% 升至 90.0%; 42.0~52.0 min, B 维持 90.0% 不变。

注: 羊乳基奶粉样品的柱温需调节至 75°C 以得到 HMOs 与基质中干扰峰更好的分离。

1.8.2 检测器条件

荧光检测器: 激发波长 330 nm; 发射波长 420 nm; 灵敏度 7。

1.8.3 结果计算

检测结果通过公式(1)计算可得:

$$C = \frac{\left(\frac{A_{\text{os}_{\text{sple}}}}{A_{\text{IS}_{\text{sple}}}\right)}{S} \times \frac{V}{m_{\text{sple}}} \times \frac{1}{F} \quad (1)$$

式中, S 为标准曲线斜率(曲线纵坐标为标准品溶液中 HMOs 色谱峰面积与内标物质峰面积比值);

$A_{\text{os}_{\text{sple}}}$ 为样品溶液中待分析物色谱峰面积;

$A_{\text{IS}_{\text{sple}}}$ 为样品溶液中内标物质(昆布三糖)色谱峰面积;

V 为样品溶液稀释后体积(50 mL);

F 为单位转换系数(10), 由 $\mu\text{g/g}$ 单位换算至 $\text{mg}/100 \text{ g}$ 单位;

m_{sple} 样品质量(g)。

1.9 数据处理

本方法下产生的全部数据, 包括标准品工作溶液以及样品溶液的谱图积分和结果计算, 均通过赛默飞色谱软件完成。

2 结果与分析

2.1 线性范围

据各地区 HMOs 批准使用量以及其在不同品牌和阶段婴幼儿配方食品中添加量调研设计 HMOs 标准品溶液浓度范围(如表 4), 以覆盖实际产品检测需求。结果显示, 每个 HMO 在对应浓度范围内的色谱峰响应良好, 标准曲线线性相关系数 r^2 处于 0.9992~1.0000 范围内, 可重复性高。因此, 该方法条件下的标准品工作溶液产生的标准曲线可用于支持样品检测。

2.2 定量限

各 HMO 定量限目前参考线性范围最低点。因该方法中的各 HMO 线性范围最低点(即表 4 中混合工作溶液浓度水平 1)普遍低于市售相关产品中各 HMO 的添加量, 且部分 HMOs(例如 3'-SL 和 6'-SL)普遍存在于基质本身。

表 4 HMOs 混合工作溶液浓度以及标准曲线的 r^2
Table 4 Concentration of HMOs mixed working solution and r^2 of standard curve

混合工作溶液	HMOs/(mg/100 g powder)						
	2'-FL	3-FL	DFL	LNT	LNnT	3'-SL	6'-SL
1	20.0	18.3	7.6	16.4	16.3	7.2	8.0
2	249.6	229.2	75.8	164.4	162.8	71.9	79.5
3	499.1	458.5	151.7	328.8	325.7	143.9	159.1
4	748.7	687.7	227.5	493.1	488.5	215.8	238.6
5	998.3	916.9	303.4	657.5	651.3	287.7	318.1
6	1247.9	1146.2	455.1	821.9	814.2	431.6	477.2
r^2 重复 1	1.0000	0.9999	0.9992	1.0000	1.0000	1.0000	0.9999
r^2 重复 2	0.9995	0.9997	0.9994	0.9995	0.9998	0.9995	0.9997
r^2 重复 3	0.9995	0.9997	0.9993	0.9997	0.9996	0.9997	0.9998

2.3 准确度和精密度

方法准确度由经典的添加回收方式衡量。本方法考虑几种不同的婴幼儿配方食品基质, 包括豆乳基、牛乳基、牛乳基部分及深度水解配方、羊乳基, 且牛乳基作为最广泛应用的基质, 包括含低聚半乳糖及不含低聚半乳糖配方。在不同基质中参考 1 段配方食品中常见各 HMO 添加水平(表 5)进行添加, 在不同时间重复 12 次。样品分析检测结果显示, 各 HMO 平均回收率处于范围 91%~110%, RSDs 低于 3%, 满足美国官方分析化学师协会(Association of Analytical

Communities, AOAC)发表的分析方法对该指标的要求。

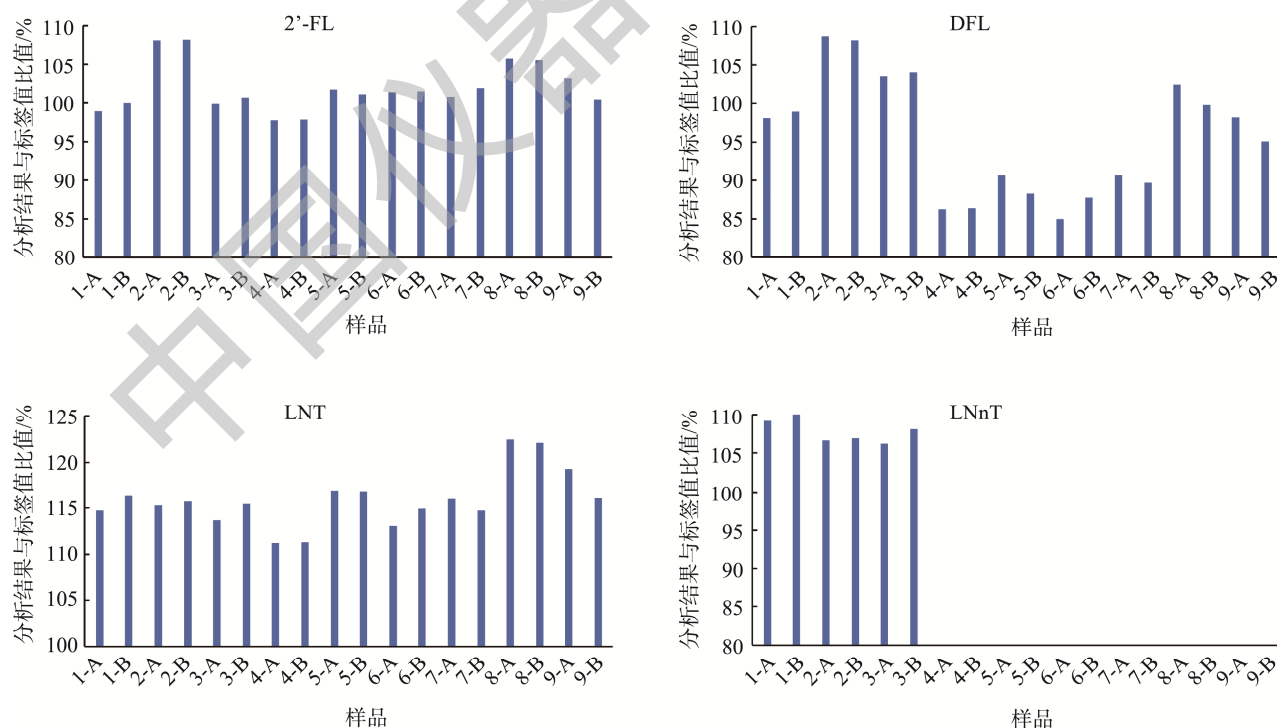
2.4 实际样品分析

对 9 款市售婴幼儿配方食品进行检测, 样品包括含低聚半乳糖和不含低聚半乳糖的牛乳基配方食品以及牛乳基部分及深度水解配方, 覆盖不同种类及含量的 HMOs (3-FL 除外)。每个样品均进行平行实验 2 次, 分析结果与标签值比对。图 2 结果显示, 采用该方法的检测结果与标签值十分相近或因基质本身含有该分析物而使得检测结果高于标签值, 证明此方法适用于样品检测。

表 5 不同基质中 HMOs 的平均回收率及相对标准偏差(%)
Table 5 Average recoveries and relative standard deviations of HMOs in different matrices (%)

名称	豆乳基		牛乳基 (含低聚半乳糖)		牛乳基部分水解 (不含低聚半乳糖)		牛乳基深度水解 (不含低聚半乳糖)		羊乳基	
	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs	回收率	RSDs
2'-FL	103	1	100	1	101	1	103	0	100	1
3-FL	99	1	94	1	97	1	97	1	94	2
DFL	93	1	104	2	93	1	95	0	95	2
LNT	96	2	105	2	93	1	94	1	92	1
LNnT	93	1	91	1	93	1	94	0	93	1
3'-SL	110	1	107	2	109	1	108	1	106	1
6'-SL	92	2	105	1	92	1	93	1	92	2

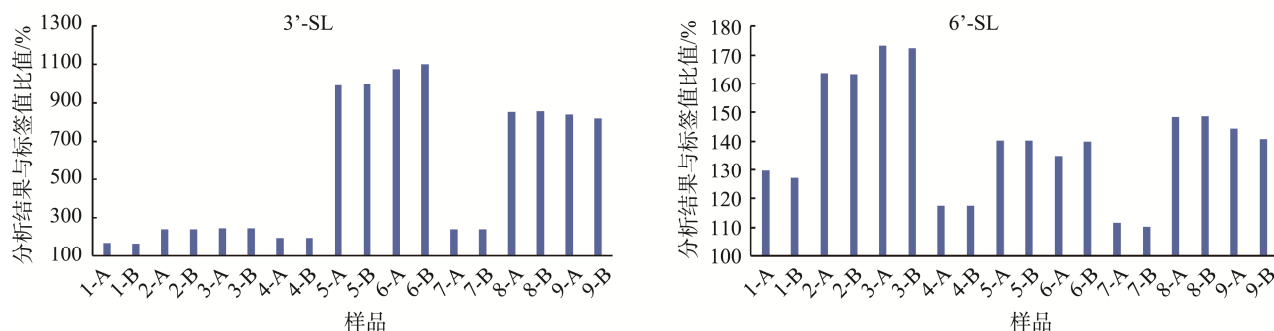
注: 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)。



注: 9 个样品中 A 样与 B 样分别代表 2 次平行实验样品。

图 2 HMOs 检测值与标签值比值

Fig.2 Ratio of HMOs detection value to label value



注: 9个样品中A样与B样分别代表2次平行实验样品。

图2(续) HMOs检测值与标签值比值

Fig.2 Comparison of tested values and label claims for HMOs

3 结论

本研究通过对婴幼儿配方食品样品溶液进行酶解去除 HMOs 干扰物后, 对 HMOs 衍生使其标记有荧光基团, 最终采用 HPLC-FLD 实现对婴幼儿配方食品中 7 种 HMOs 准确且灵敏的定量检测, 并通过线性范围、准确度和精密度以及实际样品分析多个维度对方法的适用性进行评估, 结果显示该方法对实现目标检测具有良好优势。该方法可为婴幼儿配方奶粉中 HMO 的添加声称值提供科学检测结果和依据。

参考文献

- [1] BODE L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama [J]. *Glycobiology*, 2012, 22(9): 1147–1162.
- [2] PETHERICK A. Mother's milk: A rich opportunity [J]. *Nature*, 2010, 468(7327): S5–S7.
- [3] BODE L. Human milk oligosaccharides: Prebiotics and beyond [J]. *Reviews*, 2009, 67(suppl_2): S183–S191.
- [4] KOBATA A. Structures and application of oligosaccharides in human milk [J]. *Jap Acad*, 2010, 86(7): 731–747.
- [5] WALSH C, LANE JA, SINDEREN D, *et al.* Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health [J]. *Funct Food*, 2020. DOI: 10.1016/j.jff.2020.104074
- [6] ZUURVELD M, WITZENBURG NP, GARSSSEN J, *et al.* Immunomodulation by human milk oligosaccharides: The potential role in prevention of allergic diseases [J]. *Immunology*, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00801
- [7] KOBATA A, GINSBURG V. Uridine diphosphate-N-acetyl-D-galactosamine: D-galactose-3-N-acetyl-D-galactosaminyltransferase, a product of the gene that determines blood type A in man [J]. *Biol Chem*, 1970, 245(6): 1484–1490.
- [8] CHEN X. Human milk oligosaccharides (HMOs): Structure, function, and enzyme-catalyzed synthesis [J]. *Carbohydr Chem Biochem*, 2015, 72: 113–190.
- [9] KUNZ C, MEYER C, CARMEN CY, *et al.* Influence of gestational age, secretor, and Lewis blood group status on the oligosaccharide content of human milk [J]. *Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017, 64(5): 789–798.
- [10] ERNEY RM, MALONE WT, SKELDING MB, *et al.* Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population [J]. *Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000, 30(2): 181–192.
- [11] MCGUIRE MK, MEEHAN CL, MCGUIRE MA, *et al.* What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in produced by healthy women vary geographically [J]. *J Clin Nutr*, 2017, 105(5): 1086–1100.
- [12] HEGAR B, WIBOWO Y, BASROWI R, *et al.* The role of two human milk oligosaccharides, 2'-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose, in infant nutrition [J]. *Gastroenterol Hepatol Nutr*, 2019, 22(4): 330–340.
- [13] TRIANTIS V, BODE L, JOOST VNRJ. Immunological effects of human milk oligosaccharides [J]. *Pediatrics*, 2018. DOI: 10.3389/fped.2018.00190
- [14] WICINSKI M, SAWICKA E, GEBALSKI J, *et al.* Human milk oligosaccharides: Health benefits, potential applications in infant formulas, and pharmacology [J]. *Nutrients*, 2020, 12: 266.
- [15] AUER F, JARVAS G, GUTTMAN A. Recent advances in the analysis of human milk oligosaccharides by liquid phase separation methods [J]. *J Chromatogr B*, 2021, 1162: 122497.
- [16] ELISON E, VIGSNAES LK, RINDOM KL, *et al.* Oral supplementation of healthy adults with 2'-O-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose is well tolerated and shifts the intestinal microbiota [J]. *Br J Nutr*, 2016, 116: 1356–1368.
- [17] EFSA Panel on Dietetic Products. Nutrition and allergies: Statement on the safety of lacto-N-neotetraose and 2'-O-fucosyllactose as novel food ingredients in food supplements for children [J]. *EFSA J*, 2015, 13: 4299.
- [18] EFSA Panel on Dietetic Products. Nutrition and allergies: Scientific opinion on the safety of 2'-O-fucosyllactose as a novel food ingredient pursuant to regulation (EC) No 258/97 [J]. *EFSA J*, 2015, 13: 4184.
- [19] EFSA Panel on Dietetic Products. Nutrition and allergies: Statement on the

- safety of 3-fucosyllactose as novel food pursuant to regulation [J]. *EFSA J*, 2015, 26: 2283.
- [20] SALMINEN S. Regulatory aspects of human milk oligosaccharides [Z].
- [21] GRAS Notice (GRN) 546. 2'-O-fucosyllactose [Z].
- [22] GRAS Notice (GRN) 571. 2'-Fucosyllactose [Z].
- [23] GRAS Notice (GRN) 547. Lacto-N-neotetraose [Z].
- [24] Food Standard Notice Application A1265 [Z].
- [25] HASELBERGER P, TIAN F, ERNEY R, *et al.* Method for the determination of 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3-fucosyllactose (3-FL), 6'-sialyllactose (6'-SL), 3'-sialyllactose (3'-SL), lacto-N-tetraose (LNT), and lacto-N-neotetraose (LNnT) by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) [J]. *AOAC Int*, 2023, 106(5): 1237-1245.
- [26] 林毅侃, 郑翌, 宁啸骏. 半制备高效液相色谱-离子色谱法检测婴幼儿配方食品中低聚半乳糖的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(13): 5145-5152.
- LIN YK, ZHENG Y, NING XJ. Determination of galactooligosaccharides in infant formula foods by semi-preparative high performance liquid chromatography combined with ion chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(13): 5145-5152.
- [27] LIU F, MOLEN J, KUIPERS F, *et al.* Quantitation of bioactive components in infant formulas: Milk oligosaccharides, sialic acids and corticosteroids [J]. *Food Res Int*, 2023, 174(1): 113589.
- [28] ZHANG W, WANG T, CHEN X, *et al.* Absolute quantification of twelve oligosaccharides in human milk using a targeted mass spectrometry-based approach [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 219: 328-333.
- [29] ELLINGSON JD, RUOSCH JA, FOSTER LK, *et al.* Analysis of six human milk oligosaccharides (HMO) in infant formula and adult nutritionals by 2AB labeling and quantification with HILIC-FLD [J] *AOAC Int*, 2023, 106(1): 112-126.
- [30] AUSTIN S, DENIS C, JULIEN M, *et al.* Determination of 2'-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose in infant formula [J]. *Molecules* 2018, 23(10): 2650.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介

高 芳, 博士, 分析专员, 主要研究方向为检测分析方法开发。

E-mail: Fang.gao@rd.nestle.com

鲍 蕾, 研究员, 主要研究方向为食品安全与标准。

E-mail: Lei.bao@rd.nestle.com