DOI:10.12441/spyswjs.20231129002 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0154-10

超高效液相色谱-高分辨质谱定量检测母乳中14种低聚糖

郭 敏[1] 杨 芹[2*] 魏小晶[1] 王琳琳[1] 田丰伟[1] 赵建新[1]

(1. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学无锡医学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】建立了超高效液相色谱-高分辨质谱定量检测母乳中14种母乳低聚糖的方法。**【方法】**样品脱脂后离心取上清液,经Waters ACQUITY UPLC® BEH Amide色谱柱(2.1 mm×100 mm×1.7 μm)分离,以含25 mmol/L乙酸铵水溶液和乙腈作为流动相进行梯度洗脱,在正离子模式下,通过平行反应监测模式(parallel reaction monitoring,PRM)采集数据,外标法定量。**【结果】**14种母乳低聚糖在质量浓度为0.10~100.00 μg/mL时线性关系良好,相关系数≥0.980 2,检出限为0.05~1.00 μg/mL,定量限为0.10~5.00 μg/mL,回收率为78.03%~105.23%,相对标准偏差为0.14%~5.86%。**【结论】**该方法可以快速、有效地检测不同来源母乳样品中母乳低聚糖,为母乳低聚糖的研究提供技术支持。

关键词:母乳;母乳低聚糖;平行反应监测

Quantification of 14 Human Milk Oligosaccharides by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry

GUO Min[1] *YANG Qin*[2*] *WEI Xiaojing*[1] *WANG Linlin*[1] *TIAN Fengwei*[1] *ZHAO Jianxin*[1]

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] To establish a method for quantifying 14 human milk oligosaccharides based on ultra-high performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. [**Method**] The supernatant obtained by centrifugation of defatted human milk was loaded on an Waters ACQUITY UPLC® BEH Amide column (2.1 mm×100 mm×1.7 μm) for gradient elution, with 25 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as mobile phases. Data of human milk oligosaccharides were collected by parallel reaction monitoring in the positive ion mode. Quantitative analysis was performed with the external standard method. [**Result**] The calibration curves of 14 human milk oligosaccharides were linear within the mass concentration range of 0.10~100.00 μg/mL, with the correlation coefficient≥0.980 2. The limits of detection and limits of quantitation were 0.05~1.00 μg/mL and 0.10~5.00 μg/mL, respectively. The recovery of each oligosaccharide added to human milk ranged from 78.03% to 105.23%, with the relative standard deviations ranging from 0.14% to 5.86%. The established method was then employed to quantify human milk oligosaccharides in the samples from different ethnic groups. [**Conclusion**] The results showed that this method could rapidly and effectively detect human milk oligosaccharides in the samples from different sources, providing technical support for the research on human milk oligosaccharides.

Keywords: human milk; human milk oligosaccharide; parallel reaction monitoring

基金项目:国家"十四五"重点研发计划项目(2022YFF1100400)。

通信作者:杨 芹(1981—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事营养与食品卫生学研究。E-mail: qyang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-11-29 **修回日期:**2024-01-04

母乳低聚糖是一类天然存在于母乳中的寡糖分子，是母乳中的第三大营养成分。它是由多种单糖分子通过不同的化学键组合而成，分子组成复杂，具有促进肠道健康、调节免疫系统、预防胃肠感染、降低婴儿过敏和哮喘风险等作用[1-2]。随着人们对母乳营养的认识不断深入，越来越多的研究聚焦于母乳中母乳低聚糖的种类、结构和组成等方面的特征[3-4]。这些特征决定母乳低聚糖对肠道微生物的选择性作用，包括对肠道微生物群落结构和功能的影响、对抗病原菌和促进肠道健康的作用以及对免疫系统的影响。要深入了解母乳低聚糖的特性离不开对母乳这一复杂基质中母乳低聚糖的分离和检测[5-7]。

母乳低聚糖种类繁多、结构复杂且存在大量的同分异构体，这导致母乳低聚糖检测困难较大。近年来，研究人员采用了多种检测技术测定不同样品中的母乳低聚糖，如毛细管电泳[8-10]、高效液相色谱[11-13]、离子色谱[12]、液相色谱质谱联用[14]、核磁共振[15]等。但这些方法还存在一些不足：液相色谱法中因母乳低聚糖的紫外吸收能力差，需对其进行衍生化后再进行检测，故操作复杂且检测限较高；毛细管电泳法对同分异构体不易区分；核磁共振技术所需样品量大，分析较为复杂[16]。随着检测技术的不断发展，高分辨质谱仪因灵敏度高、分离效率高等优点，成为分析领域的重要检测手段[17-20]。高分辨质谱可获得目标化合物的一级质谱信息，并提供二级碎片离子的精确质量数，理论上兼顾定性定量分析的能力[21]，已被广泛应用于母乳低聚糖的分析检测。

综上，研究中采用超高效液相色谱-高分辨质谱技术，以母乳低聚糖为研究对象，采用平行反应监测模式，建立了一种能同时检测14种母乳低聚糖的定性定量检测方法，并将此方法应用于不同来源母乳样品中母乳低聚糖质量浓度的检测。

1　材料与方法

1.1　试剂与材料

母乳样品：从江苏无锡地区的汉族、新疆维吾尔自治区的哈萨克族和维吾尔族中，选择当地常住且身体健康的32~39岁哺乳期女性，收集其自愿捐献的产后第6个月的成熟母乳，共计18份样品，冻存于-80 ℃冰箱。

母乳低聚糖标准品（见表1）：南昌兰军科技有限公司；乙腈、氨水、乙酸铵：色谱纯，德国西格玛公司；其他试剂：分析纯，国药控股化学试剂有限公司；试验用水：自制超纯水。

1.2　仪器与设备

静电场轨道阱高分辨质谱仪：Q Exactive型，配U3000型超高效液相色谱仪，美国赛默飞世尔科技公司；离心浓缩仪：SPD131DDA型，美国赛默飞世尔科技公司；电子分析天平：

表1　母乳低聚糖标准品信息

Table 1　Information of standards of human milk oligosaccharides

母乳低聚糖	分子式	CAS号	货号	纯度/%
2'-岩藻糖乳糖（2'-FL）	$C_{18}H_{32}O_{15}$	41263-94-9	3010101010	98.90
3'-岩藻糖乳糖（3'-FL）	$C_{18}H_{32}O_{15}$	41312-47-4	—	92.40
3'-唾液酸乳糖（3'-SL）	$C_{23}H_{39}NO_{19}$	35890-38-1	3070701021	95.20
6'-唾液酸乳糖（6'-SL）	$C_{23}H_{39}NO_{19}$	35890-39-2	—	98.90
乳酰-N-四糖（LNT）	$C_{26}H_{45}NO_{21}$	14116-68-8	3050501021	86.62
乳酰-N-新四糖（LNnT）	$C_{26}H_{45}NO_{21}$	13007-32-4	3020401010	99.40
乳酰-双盐藻四糖（DF-L）	$C_{24}H_{42}O_{19}$	20768-11-0	ZG-10026	≥95.00
乳酰-N-岩藻五糖 I（LNFP-I）	$C_{32}H_{55}NO_{25}$	7578-25-8	ZG-10048	≥90.00
乳酰-N-岩藻五糖 II（LNFP-II）	$C_{32}H_{55}NO_{25}$	21973-23-9	ZG-10049	≥95.00
唾液基乳糖-N-四糖 a（LST-a）	$C_{37}H_{62}N_2O_{29}$	64003-53-8	ZG-10056	≥90.00
唾液基乳糖-N-四糖 b（LST-b）	$C_{37}H_{62}N_2O_{29}$	64003-54-9	ZG-10058	≥95.00
唾液基乳糖-N-四糖 c（LST-c）	$C_{37}H_{62}N_2O_{29}$	64003-55-0	ZG-10059	≥90.00
二唾液基乳糖-N-四糖（DSLNT）	$C_{48}H_{79}N_3O_{37}$	61278-38-4	ZG-10064	≥95.00
乳酰-N-二岩藻六糖 II（LNDFH-II）	$C_{38}H_{65}NO_{29}$	62258-12-2	ZG-10189	≥90.00

注："—"表示商品信息未查到。

XS105DU 型，瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司；涡旋振荡器：MS3 型，德国艾卡公司；静音型超声波清洗器：KQ-300DM 型，昆山市超声仪器有限公司；台式高速冷冻离心机：5804R 型，德国艾本德公司；超纯水仪：Milli Direct-Q8 型，德国默克密理博公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制

精确称取每种母乳低聚糖标准品各 10.0 mg，分别用体积分数 50% 乙腈水溶解，随后转移至 10 mL 棕色容量瓶中，并以体积分数 50% 乙腈水溶液定容至刻度，得到质量浓度为 1 000 μg/mL 的单标储备液，置于−20 ℃保存备用。

1.3.2 母乳样品的处理

取 1 mL 母乳样品于 5 mL 离心管中，加入 1 mL 的 H_2O 充分溶解；于 4 600 *g*、4 ℃条件下离心 10 min 后去除上层脂肪；在下层清液中加入 3 mL 乙腈，涡旋 30 s 后，于 4 ℃、11 000 *g* 条件下离心 10 min，重复 2 次后取上清液上机检测[22]。

1.3.3 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC® BEH Amide（2.1 mm×100 mm×1.7 μm）色谱柱，自动进样器温度 15 ℃，流量 0.30 mL/min，进样量 2 μL。流动相 A：不同浓度的乙酸铵水溶液；流动相 B：乙腈。梯度洗脱程序：0~1.00 min，体积分数 85% 流动相 B；1.00~14.00 min，体积分数 85%~65% 流动相 B；14.00~16.00 min，体积分数 65%~40% 流动相 B；16.00~18.00 min，体积分数 40% 流动相 B；18.00~18.10 min，体积分数 40%~85% 流动相 B；18.10~23.00 min，体积分数 85% 流动相 B。

1.3.4 质谱条件

电喷雾离子源（ESI），正离子模式；喷雾电压 3.5 kV，毛细管温度 320 ℃，鞘气流量 35 L/h，辅助气流量 15 L/h，干燥气温度 320 ℃；扫描模式为平行反应监测模式，分辨率 17 500，自动增益控制 2×10^5，最大离子注入时间 100 ms，隔离窗口 *m*/*z* 4.00，归一化碰撞能量分别为 10、20、30 eV。

1.4 实际样品应用

完成方法学验证后，应用构建的方法对不同来源的 18 份母乳样品进行检测，每份样品重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相 pH 对分离的影响

14 种母乳低聚糖中 3'-SL 和 6'-SL 是酸性母乳低聚糖，其他为中性母乳低聚糖。在亲水作用色谱（HILIC）模式中，当分析物为酸/碱性化合物时，流动相 pH 对其分离的影响较大。因此，为考察 pH 对 3'-SL 和 6'-SL 色谱分离的影响，在流动相组成基本不变的情况下，采用乙酸和氨水对其 pH 进行调节，比较流动相 pH 分别为 3.0、9.0、10.0 时，目标母乳低聚糖的出峰情况。

结果如图 1 所示，随着流动相 pH 的增加，3'-SL、6'-SL 的色谱峰由较为明显的分叉峰（pH 3.0、pH 9.0）过渡为峰形对称的高斯峰（pH 10.0），说明流动相的酸碱度会影响分离过程中酸性分析物的存在形式，故最终选择流动相的 pH 为 10.0。

2.1.2 缓冲盐浓度对分离的影响

选取浓度分别为 10、20、25 mmol/L 的乙酸铵作为缓冲盐，比较其对母乳低聚糖色谱分离的影响。结果表明，在梯度洗脱程序中随着缓冲盐浓度的升高，2'-FL、3'-FL、3'-SL、6'-SL、DF-L 的响应值基本一致；但 LNT、LNnT、LNFP-I、LNFP-Ⅱ、LST-a、LST-b、LST-c、DSLNT、LNDFH-Ⅱ的响应值会随着缓冲盐浓度的升高提高近 10 倍。以 LNFP-I 为例，在乙酸铵浓度为 10 mmol/L 时，LNFP-I 的响应值为 1.32×10^4；当乙酸铵浓度升高至 25 mmol/L 时，LNFP-I 的响应值升至 1.99×10^5。这可能是因为随着流动相中缓冲盐浓度的增加，部分吸附在固定相表面的极性层极性也随之加强，从而进一步促进极性分析物和固定相的相互作用[23]，提高了物质的响应值。所以，最终选择流动相缓冲盐乙酸铵浓度为 25 mmol/L。

2.1.3 色谱柱温度对分离的影响

考察了不同的色谱柱温度（25、40、50、60 ℃）对母乳低聚糖色谱分离的影响，结果如图 2 所示，随着色谱柱温度的不断提高，部分母乳低聚糖的保留增强，改善了色谱峰的分离情况。其中 LST-a、LST-b、LST-c 这 3 种同分异构体的分离度明显提高，2'-FL、3'-FL 的色谱峰峰形有较大改善；当温度为 60 ℃时，3 种同分异构体已实现基线分离，且 2'-FL、3'-FL

的色谱峰也呈高斯分布；同时随着色谱柱温度的升高，母乳低聚糖的响应值也有所升高。考虑到色谱柱的耐受温度上限，选择60 ℃作为最终方法的分离温度。

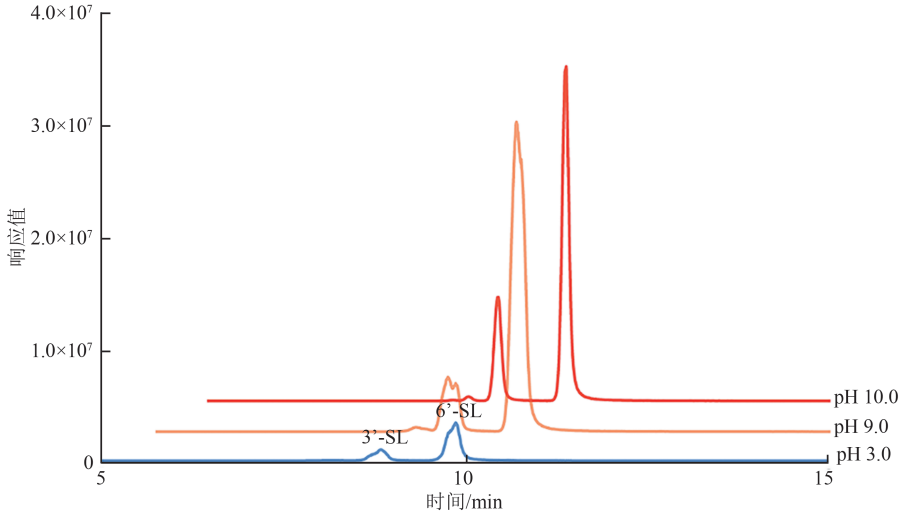
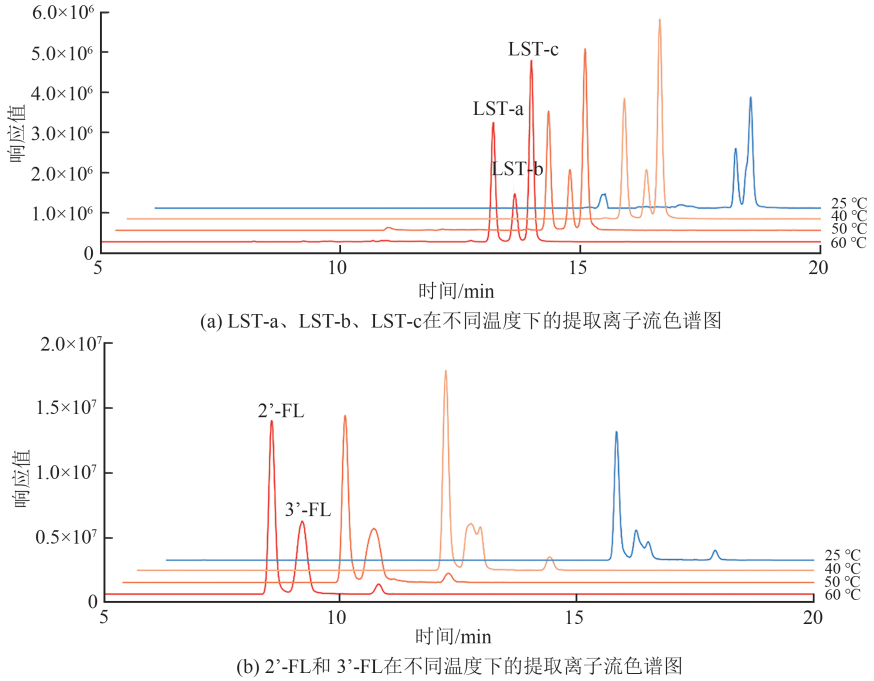


图1　不同pH条件下3'-SL和6'-SL的提取离子流色谱图

Fig. 1　Extracted ion chromatograms of 3'-SL and 6'-SL under different pH values



(a) LST-a、LST-b、LST-c在不同温度下的提取离子流色谱图

(b) 2'-FL和3'-FL在不同温度下的提取离子流色谱图

图2　不同温度下部分母乳低聚糖的提取离子流色谱图

Fig. 2　Extracted ion chromatograms of partial human milk oligosaccharides at different temperatures

2.2　质谱条件的优化

平行反应监测模式是一种基于高分辨、高精度质谱的离子检测技术，利用四极杆质量分析器的选择能力，在一级质谱中选择目标化合物的母离子，并在碰撞池中对其进行碎裂，然后利用高精度分析器得到所选择母离子的所有二级质谱碎片信息，从而对目标化合物进行分析。与传统多反应监测模式仅对目标母离子特定的子离子进行扫描不同，平行反应监测模式可采集目标母离子的所有碎片离子的精确质量数信息，尤其是在复杂样本检测中，能够从背景信号中分辨出碎片离子，对低丰度物质具有较高的检测性能[24]。此外，传统多反应监测

模式主要应用在定量分析中，而平行反应监测模式因可获得目标化合物高质量精度的二级质谱信息，可同时对目标化合物进行定性和定量分析。

在该研究中，以质量浓度为1.00 μg/mL的标准品为对象，优化了平行反应监测模式下各化合物的目标离子和碰撞能量。通过直接进样发现，在正离子模式下，2'-FL、3'-FL、3'-SL、6'-SL、LNT、LNnT、DF-L均产生$[M+H]^+$峰和$[M+Na]^+$峰，且$[M+Na]^+$峰的响应均优于$[M+H]^+$峰。因此，上述7种母乳低聚糖均以$[M+Na]^+$峰作为目标母离子峰；同样的方法，选择$[M+NH_4]^+$峰作为LNDFH-II的目标母离子峰、$[M+H]^+$峰作为剩余6种母乳低聚糖的目标母离子峰。随后，通过软件自动优化碰撞能量，获得不同碰撞能量下目标母离子碎片的二级质谱图，选择目标母离子峰的丰度约为基峰丰度5%时的碰撞能量作为实际测试碰撞能量，并选择此碰撞能量下丰度最大的子离子作为定量子离子，详细的碰撞能量和定量子离子信息见表2。然后将标准品经色谱柱分离后，在平行反应监测模式下确定14种母乳低聚糖的保留时间，最优条件下14种母乳低聚糖标准品的提取离子流色谱图见图3。

表2 14种母乳低聚糖的质谱参数

Table 2 Mass spectrometry parameters of 14 human milk oligosaccharides

母乳低聚糖	保留时间/min	加合方式	母离子 *m/z*	定量子离子 *m/z*	碰撞能量/eV
2'-FL	9.66	$[M+Na]^+$	511.163 34	325.113 62	30
3'-FL	10.30	$[M+Na]^+$	511.163 34	325.113 74	30
3'-SL	9.00	$[M+Na]^+$	656.221 25	292.103 27	30
6'-SL	9.94	$[M+Na]^+$	656.221 25	292.103 36	30
LNT	13.19	$[M+Na]^+$	730.237 63	366.140 87	30
LNnT	13.33	$[M+Na]^+$	730.237 63	366.140 90	30
DF-L	11.95	$[M+Na]^+$	657.221 25	309.118 59	10
LNFP-I	14.62	$[M+H]^+$	854.313 59	512.198 97	10
LNFP-II	15.24	$[M+H]^+$	854.313 59	512.199 10	10
LST-a	12.17	$[M+H]^+$	999.351 10	657.234 62	10
LST-b	12.64	$[M+H]^+$	999.351 10	657.236 45	10
LST-c	12.92	$[M+H]^+$	999.351 10	657.234 99	10
DSLNT	12.59	$[M+H]^+$	1 290.446 52	948.336 73	10
LNDFH-II	16.53	$[M+NH_4]^+$	1 017.398 05	512.199 04	10

2.3 方法学验证

2.3.1 检出限、定量限和线性关系

取适量单一标准溶液，用乙腈溶液稀释，配制成质量浓度分别为0.10、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00、50.00、75.00、100.00 μg/mL的系列混合标准溶液。采用外标法定量分析，以标准品的质量浓度为横坐标，色谱峰峰面积为纵坐标，绘制标准曲线（n=3）。结果表明，14种母乳低聚糖在质量浓度为0.10～100.00 μg/mL时线性关系良好，其中11种母乳低聚糖的相关系数大于0.990 0。14种母乳低聚糖的检出限为0.05～1.00 μg/mL，定量限为0.10～5.00 μg/mL，其中当DSLNT的质量浓度低于5.00 μg/mL时，其质量浓度与色谱峰峰面积无线性关系，可能会导致回收率低或噪声干扰，故将DSLNT的定量限设为5.00 μg/mL，试验结果见表3。

2.3.2 回收率、相对标准偏差和基质效应

将低、中、高3个质量浓度的混合标准溶液添加至空白样品中，每个质量浓度样品制备6份，按照1.3.2的样品前处理方法处理后上机检测，每份样品重复测定3次，据此计算回收率和相对标准偏差。由表4可知，14种母乳低聚糖的回收率为78.03%～105.23%，相对标准偏差为0.14%～5.86%，表明该方法的回收率和精密度满足方法学的验证要求。

为评估检测时的基质效应，考察了低、中、高和定量限4个质量浓度的混合标准溶液在空白样品基质与纯溶剂中信号强度的比值，计算基质效应。

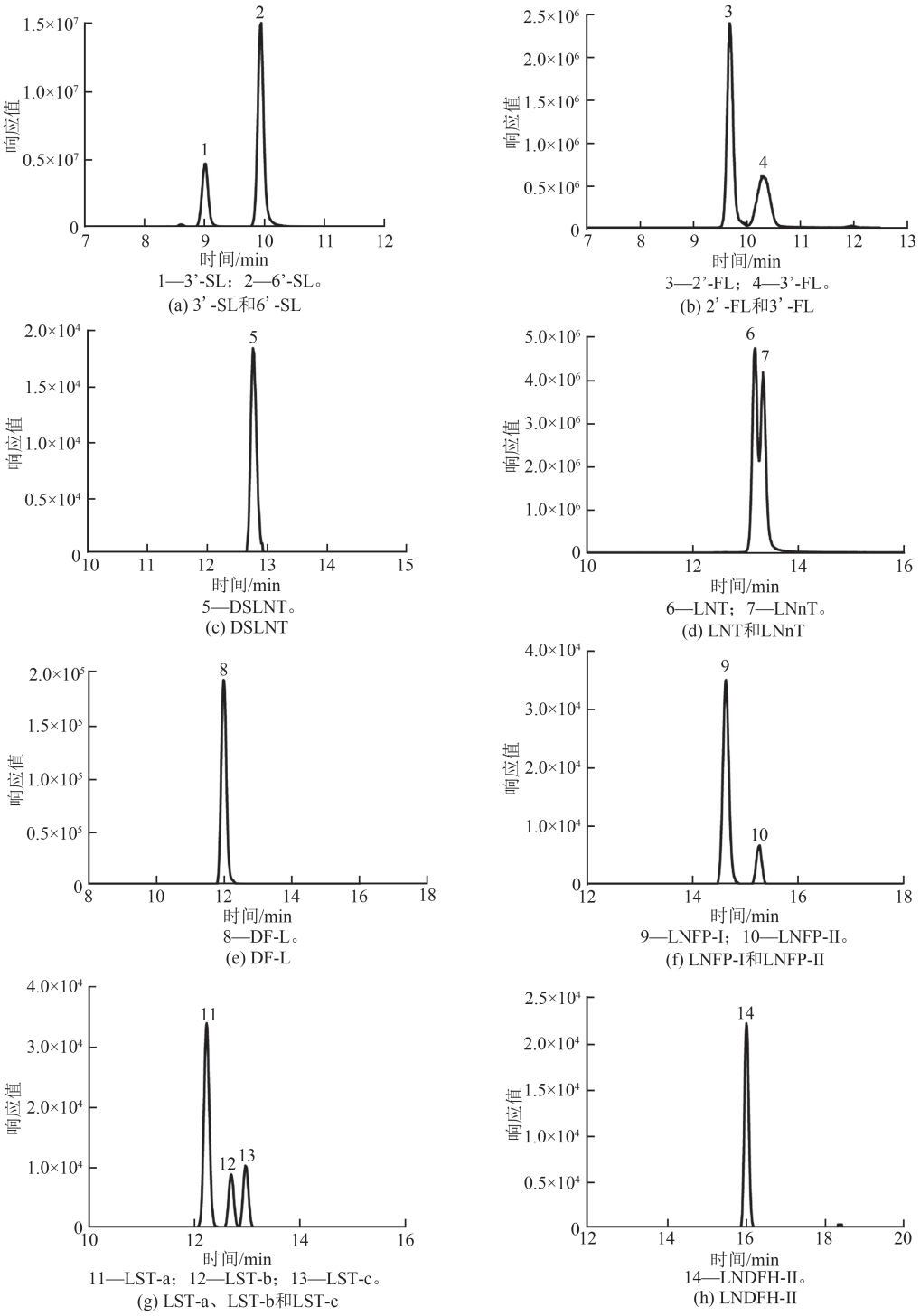


图3　14种母乳低聚糖标准品的提取离子流色谱图

Fig. 3　Extracted ion chromatograms of standards of 14 human milk oligosaccharides

结果表明，该方法存在基质效应，大部分标准溶液在高质量浓度下存在基质增强效应；在低、中质量浓度下存在较弱的基质抑制效应。因此在实际分析时，为了获得更准确的结果，标准溶液必须配制在与样品相匹配的基质中。

2.4　实际样品分析

为进一步验证方法的可行性，利用所建立的方法对不同来源的18份母乳样品中母乳低聚糖质量浓度进行测定，结果如图4所示。总体上来看，14种母乳低聚糖在各样品中均有检出，2’-FL、

表 3　14 种母乳低聚糖的线性范围、检出限及定量限

Table 3　Linear ranges, limits of detection and limits of quantitation of 14 human milk oligosaccharides

母乳低聚糖	线性范围/(μg/mL)	相关系数	检出限/(μg/mL)	定量限/(μg/mL)
2'-FL	0.10~100.00	0.999 7	0.05	0.10
3'-FL	0.50~100.00	0.980 2	0.20	0.50
3'-SL	0.50~100.00	0.991 3	0.20	0.50
6'-SL	0.20~100.00	0.995 0	0.10	0.20
LNT	0.50~100.00	0.993 0	0.20	0.50
LNnT	0.50~100.00	0.993 0	0.20	0.50
DF-L	0.50~100.00	0.988 1	0.20	0.50
LNFP-I	0.25~100.00	0.980 8	0.10	0.25
LNFP-II	1.00~100.00	0.998 1	0.80	1.00
LST-a	1.00~50.00	0.998 2	0.80	1.00
LST-b	1.00~50.00	0.995 1	0.80	1.00
LST-c	1.00~50.00	0.991 6	0.80	1.00
DSLNT	5.00~100.00	0.996 5	1.00	5.00
LNDFH-II	1.00~100.00	0.992 9	0.80	1.00

表 4　14 种母乳低聚糖的回收率、相对标准偏差及基质效应结果

Table 4　Recovery, relative standard deviations and matrix effects of 14 human milk oligosaccharides

母乳低聚糖	质量浓度/(μg/mL)	回收率/%	相对标准偏差/%	基质效应/%
2'-FL	0.10	—	—	97.74
	0.30	78.03	5.20	85.68
	10.00	88.60	4.21	83.49
	75.00	87.70	3.75	90.41
3'-FL	0.50	—	—	85.60
	1.50	81.60	3.23	79.90
	10.00	85.70	0.78	78.17
	75.00	101.40	0.25	105.50
3'-SL	0.50	—	—	87.38
	1.50	91.02	0.14	89.16
	10.00	88.93	4.21	106.01
	75.00	93.50	0.23	104.87
6'-SL	0.20	—	—	73.10
	0.60	98.40	0.56	110.76
	5.00	85.75	1.20	81.63
	75.00	104.30	4.96	89.68
LNT	0.50	—	—	81.81
	1.50	88.90	4.21	87.48
	10.00	85.62	4.96	86.59
	75.00	86.30	3.25	97.09
LNnT	0.50	—	—	90.66
	1.50	89.20	3.02	85.46
	10.00	95.70	0.58	102.44
	75.00	100.63	5.64	112.73
DF-L	0.50	—	—	84.08
	1.50	91.00	2.36	84.20

续表

母乳低聚糖	质量浓度/(μg/mL)	回收率/%	相对标准偏差/%	基质效应/%
DF-L	10.00	96.50	0.18	104.56
	75.00	105.23	0.23	121.38
LNFP-I	0.25	—	—	100.80
	0.75	93.56	1.38	80.50
	5.00	88.74	2.54	104.79
	75.00	79.63	4.03	100.12
LNFP-II	1.00	—	—	75.77
	3.00	83.69	5.04	83.39
	25.00	96.30	2.96	102.61
	75.00	97.56	1.85	94.30
LST-a	1.00	—	—	86.26
	3.00	84.25	4.03	93.12
	25.00	88.96	0.54	93.64
	75.00	99.41	1.21	103.60
LST-b	1.00	—	—	79.17
	3.00	98.36	2.03	70.53
	25.00	95.28	3.96	73.20
	75.00	89.70	1.98	119.49
LST-c	1.00	—	—	94.05
	3.00	93.65	1.04	82.23
	25.00	96.76	5.86	90.90
	75.00	95.71	2.23	119.49
DSLNT	5.00	—	—	100.97
	15.00	98.42	3.68	91.33
	50.00	105.21	1.25	84.58
	75.00	96.34	4.63	87.98
LNDFH-II	1.00	—	—	75.47
	3.00	99.80	1.25	86.65
	25.00	95.36	0.56	95.18
	75.00	86.58	2.98	82.53

注：“—”表示未测到。

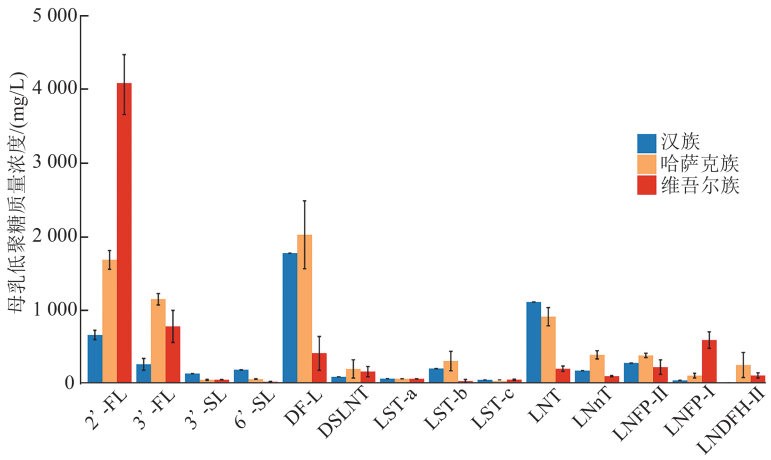


图4　不同来源母乳样品中14种母乳低聚糖的质量浓度

Fig. 4　Mass concentrations of 14 human milk oligosaccharides in human milk samples from different sources

3'-FL、DF-L、LNT和LNFP-II的质量浓度普遍高于其他母乳低聚糖，这与以往文献报道的结论相似[25-27]。结果还显示，来自汉族人群的母乳样品中，LNT的质量浓度较高；来自哈萨克族人群的母乳样品中，3'-FL、DF-L的质量浓度较高；来自维吾尔族人群的母乳样品中，2'-FL和LNFP-I的质量浓度较高。由此说明生活习惯、生存环境及饮食差异对母乳中母乳低聚糖的质量浓度有一定的影响。

3 结论

采用超高效液相色谱-高分辨质谱检测技术建立了快速分析鉴定母乳中14种母乳低聚糖的方法。在23 min内实现了14种母乳低聚糖的分离和定量，且其中5组同分异构体中有4组实现了基线分离。经方法学验证表明，该方法可以满足母乳样本的分析要求。同时，应用构建的方法对不同来源的18份样品进行了检测，结果发现此方法可以满足母乳样品中母乳低聚糖的快速检测，可为母乳低聚糖的研究提供技术支持。

参考文献

[1] 童文烽. 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，2022.

[2] 陈伟，闫宁环，刘宇，等. 牛乳低聚糖与人乳低聚糖的组分及生物活性研究[J]. 食品科技，2017，42(3)：75-78.
CHEN W，YAN N H，LIU Y，et al. Constitute and biological activity of bovine milk oligosaccharides and human milk oligosaccharides [J]. Food Science and Technology，2017，42(3)：75-78.(in Chinese)

[3] THOMSON P，MEDINA D A，GARRIDO D. Human milk oligosaccharides and infant gut *Bifidobacteria*：molecular strategies for their utilization [J]. Food Microbiology，2018，75：37-46.

[4] 任向楠，杨晓光，杨振宇，等. 人乳中低聚糖的含量及其常用分析方法的研究进展[J]. 中国食品卫生杂志，2015，27(2)：200-204.
REN X N，YANG X G，YANG Z Y，et al. Advances in content and main analytical methods of oligosaccharides in human milk[J]. Chinese Journal of Food Hygiene，2015，27(2)：200-204.(in Chinese)

[5] MATSUKI T，YAHAGI K，MORI H，et al. A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development [J]. Nature Communications，2016，7：11939.

[6] ZIVKOVIC A M，GERMAN J B，LEBRILLA C B，et al. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota[J]. PNAS，2011，108：4653-4658.

[7] AUTRAN C A，KELLMAN B P，KIM J H，et al. Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants[J]. Gut，2018，67(6)：1064-1070.

[8] 杨轶涵，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，2022，50(9)：47-52.
YANG Y H，QIAO W C，ZHANG M H，et al. Research progress on detection methods of human milk oligosaccharides[J]. China Dairy Industry，2022，50(9)：47-52.(in Chinese)

[9] BAO Y W，ZHU L B，NEWBURG D S. Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from human milk by capillary electrophoresis[J]. Analytical Biochemistry，2007，370(2)：206-214.

[10] GALEOTTI F，COPPA G V，ZAMPINI L，et al. Capillary electrophoresis separation of human milk neutral and acidic oligosaccharides derivatized with 2-aminoacridone [J]. Electrophoresis，2014，35(6)：811-818.

[11] 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.

[12] 朱伟，宁啸骏，杜茹芸. 高效离子色谱法检测婴幼儿配方奶粉中的功能性低聚糖[J]. 食品科学，2017，38(24)：224-228.
ZHU W，NING X J，DU R Y. Determination of functional oligosaccharides in infant formula milk powder by high performance ion chromatography [J]. Food Science，2017，38(24)：224-228.(in Chinese)

[13] 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.

[14] 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 J H，CHEN L J，ZHAO J Y，et al. Rapid and simultaneous detection of 4 milk oligosaccharides using LC-MS [J]. Food Science，2016，37(14)：86-91.(in Chinese)

[15] LEEUWEN S S，SCHOEMAKER R J，GERWIG G J，et al. Rapid milk group classification by ^{1}H NMR analysis of Le and H epitopes in human milk oligosaccharide donor samples[J]. Glycobiology，2014，24(8)：728-739.

[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)：138-143.
CHEN X X，LU J，LIU L，et al. Determination of 12 oligosaccharides in human milk by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food Science，2018，39(4)：138-143.(in Chinese)

[17] 孟宪双，白桦，马强，等. 超高效液相色谱-高分辨质谱测定大鼠血清中神经递质及其在电离辐射脑损伤动物模型中的应用[J]. 质谱学报，2021，42(3)：334-345.
MENG X S，BAI H，MA Q，et al. Analysis of neurotransmitters in rat serum using ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and its application to ionizing radiation-induced brain injury [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society，2021，42(3)：334-345.(in Chinese)

[18] KHANAL N，MASELLIS C，KAMRATH M Z，et al. Cryogenic IR spectroscopy combined with ion mobility spectrometry for the analysis of human milk oligosaccharides[J]. Analyst，2018，143(8)：1846-1852.

[19] 符灵梅，王玉健，徐莉，等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速分析氰霜唑及其代谢物CCIM在水果中的残留[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(9)：93-103.
FU L M，WANG Y J，XU L，et al. Rapid analysis of cyazofamid and CCIM residues in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(9)：93-103.(in Chinese)

[20] MARTÍN-ORTIZ A，SALCEDO J，BARILE D，et al. Characterization of goat colostrum oligosaccharides by nano-liquid chromatography on chip quadrupole time-of-flight mass spectrometry and hydrophilic interaction liquid chromatography-quadrupole mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A，2016，1428：143-153.

[21] 张欣达，李娜，赵世瑾，等. 免疫亲和注射器微萃取-高效液相色谱串联质谱法测定牛奶中玉米赤霉醇类化合物[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(5)：29-34.
ZHANG X D，LI N，ZHAO S J，et al. Determination of zeranols in milk using immunoaffinity microextraction in a packed syringe and high performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(5)：29-34.(in Chinese)

[22] ZHANG W Y，WANG T，CHEN X X，et al. Absolute quantification of twelve oligosaccharides in human milk using a targeted mass spectrometry-based approach[J]. Carbohydrate Polymers，2019，219：328-333.

[23] 王昌钊，李子豪，张亚莉，等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法同时筛查和测定番茄中11种真菌毒素[J]. 食品科学，2023，44(12)：368-375.
WANG C Z，LI Z H，ZHANG Y L，et al. Simultaneous screening and determination of eleven mycotoxins in tomato by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. Food Science，2023，44(12)：368-375.(in Chinese)

[24] GALLIEN S，DOMON B. Quantitative proteomics using the high resolution accurate mass capabilities of the quadrupole-orbitrap mass spectrometer[J]. Bioanalysis，2014，6(16)：2159-2170.

[25] WANG X Q，LIU J，LI C，et al. Pregnancy-related diseases and delivery mode can affect the content of human milk oligosaccharides：a preliminary study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2022，70(16)：5207-5217.

[26] AUSTIN S，CASTRO C A，BÉNET T，et al. Temporal change of the content of 10 oligosaccharides in the milk of Chinese urban mothers[J]. Nutrients，2016，8(6)：346.

[27] HU M M，MIAO M，LI K W，et al. Human milk oligosaccharide lacto-N-tetraose：physiological functions and synthesis methods [J]. Carbohydrate Polymers，2023，316：121067.

（责任编辑：许艳超）