

农业行业标准

《乳及乳制品中 8 种乳寡糖的测定 液相色谱-串联质谱法》

（公开征求意见稿）

编制说明

XXXX

XXXX

XXXX

XXXX

XXXX

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、起草过程

（一）任务来源

2023 年 1 月，XXXX 完成了《乳及乳制品中乳寡糖的测定 液相色谱-质谱法》标准草案和项目建议书等书面材料，向全国畜牧业标准化技术委员会提出申报。2023 年 7 月，农业农村部发布《农业农村部办公厅关于下达 2023 年农业国家、行业标准制定和修订项目任务的通知》和《行业标准制定和修订项目任务的通知》（农办质〔2023〕51 号），批准项目立项，项目计划编号：项目计划号为农办质〔2023〕51 号 NYB-23053，项目名称为《乳及乳制品中乳寡糖的测定 液相色谱-质谱法》。由 XXXX 负责牵头起草。

（二）制定背景

母乳作为新生儿最初的食物，其对婴儿的发育有重要作用。虽然母乳和婴幼儿配方奶粉的主要成分相似，但功能却有很大差异。研究显示，母乳喂养的婴儿具有较低的中耳炎率、腹泻率以及轮状病毒感染率，这主要是因为母乳中含有大量不同长度的结构寡糖——乳寡糖。研究发现，乳寡糖是一类构成哺乳动物乳中特有的复合碳水化合物，通过刺激新生儿中有益肠道细菌如双歧杆菌和乳酸杆菌的生长，平衡肠道菌群的发育，对调节新生儿出生后免疫系统起重要作用，作为婴儿配方食品的功能性成分非常重要。

乳寡糖种类繁多，且不同动物乳中乳寡糖的种类与组成不同。其中，人乳中乳寡糖种类最多，超过 200 种，且中性乳寡糖占比较大，而其他动物乳中以酸性乳寡糖居多。2016 年，在欧洲批准 2'-岩藻糖基乳糖（2'-FL，母乳中含量最高的一种中性岩藻糖基化乳寡糖）和乳糖基-N-新四糖（LNnT，母乳中含量较高的一种中性非岩

藻糖基化乳寡糖)的在配方奶粉中使用，此后，美国、澳大利亚和新西兰也相继批准乳寡糖在配方粉中的应用。相应法规见表 1。

表 18 种寡糖的应用相应法规

项目	国家	法规
2'-FL	中国	《关于桃胶等 15 种“三新食品”的公告》 (2023 年第 8 号)
	美国	GRN 546; GRN 571; GRN 650; GRN 735; GRN 749; GRN 852; GRN 929; GRN 932
	欧盟	Implementing Decision 2016/376; Substantial Equivalence Opinion Issued by the FSAI
3-FL	中国	
	美国	GRN 925; GRN 951
	欧盟	Commission Implementing Regulation (EU) 2021/2029
3'-SL	中国	
	美国	GRN 766; GRN 880; GRN 921
	欧盟	Commission Implementing Regulation (EU) 2021/96
6'-SL	中国	
	美国	GRN 881; GRN 922
	欧盟	Commission Implementing Regulation (EU) 2021/82
LNT	中国	
	美国	GRN 833; GRN 923
	欧盟	Commission Implementing Regulation (EU) 2020/484
LNnT	中国	关于桃胶等 15 种“三新食品”的公告》(2023 年第 8 号)
	美国	GRN 547; GRN 659; GRN 919
	欧盟	Substantial Equivalence Opinion Issued by the FSAI
DFL	中国	
	美国	GRN 815
	欧盟	Commission Implementing Regulation (EU) 2019/1979
LNFP I	中国	
	美国	GRN 1035
	欧盟	

因此，对乳寡糖进行定性及定量分析是乳寡糖功能挖掘与应用的关键步骤。由于哺乳动物乳中乳寡糖结构高度复杂，存在组成变化、序列变化和多种连接异构体，不同物种间的种类和含量存在巨大差异，这都为乳寡糖的定性定量分析带来挑战。

质谱能够提供更多的化合物信息，为异构体的鉴定和定量提供帮助，液相色谱与质谱串联，能够为质谱提供有效的前一级分离，合理的减少共流出，使得质谱定量稳定性准确性提升。因此，建立一种母乳寡糖的快速定量检测方法，利用液相色谱与质谱串联，调整优化液相分离条件和质谱参数信息，实现乳寡糖的高通量绝对定量具有十分重要的意义。

（三）起草过程

第一阶段：起草阶段

（1）成立起草组

在接到标准制定任务后，2023 年 1 月成立了标准起草组，包括 XXX、XXX、XXX、XXX 等共 11 人，见表 2。2023 年 4 月，围绕前处理方法、方法学考察等方面，制定了详细的实施方案和技术路线。

表 2 标准起草组成员及分工

序号	姓名	单位	分工
1	XXX	XXXX	整体方案设计，组织协调
2	XXX	XXXX	标准征求意见、方法验证
3	XXX	XXXX	组织协调
4	XXX	XXXX	方法优化、材料完善
5	XXX	XXXX	组织协调
6	XXX	XXXX	方法优化、材料完善
7	XXX	XXXX	材料检查修改
8	XXX	XXXX	方法优化、材料完善
9	XXX	XXXX	材料检查修改
10	XXX	XXXX	材料检查修改
11	XXX	XXXX	方法验证

(2) 收集和分析相关参考文献

收集到如下国内外相关标准和文章，为标准起草提供了参考。

- [1] Coppa, G. V., P. Pierani, L. Zampini, I. Carloni, A. Carlucci and O. Gabrielli. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatrica*, 1999, 88(430): 89-94.
- [2] Bao, Y., C. Chen and D. S. Newburg. Quantification of neutral human milk oligosaccharides by graphitic carbon high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 2013, 433(1): 28-35
- [3] Jantscher-Krenn, E., M. Zharebtsov, C. Nissan, K. Goth, Y. S. Guner, N. Naidu, B. Choudhury, A. V. Grishin, H. R. Ford and L. Bode. The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats[J]. *Gut*, 2012, 61(10): 1417-1425.
- [4] Kunz, C., S. Rudloff, W. Baier, N. Klein and S. Strobel. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual Review of Nutrition*, 2000, 20: 699-722.
- [5] Liu, Z., P. Moate, B. Cocks and S. Rochfort. Simple liquid chromatography-mass spectrometry method for quantification of major free oligosaccharides in bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(47): 11568-11574.
- [6] LoCascio, R. G., M. R. Ninonuevo, S. L. Freeman, D. A. Sela,

- R. Grimm, C. B. Lebrilla, D. A. Mills and J. B. German. Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(22): 8914-8919.
- [7] Ninonuevo, M. R., Y. Park, H. Yin, J. Zhang, R. E. Ward, B. H. Clowers, J. B. German, S. L. Freeman, K. Killeen, R. Grimm and C. B. Lebrilla. A strategy for annotating the human milk glycome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(20): 7471-7480.
- [8] Phipps, K. R., N. Baldwin, B. Lynch, J. Flaxmer, A. Soltesova, B. Gilby, M. H. Miks and C. H. Rohrig. Safety evaluation of a mixture of the human-identical milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and difucosyllactose. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 120: 552-565.
- [9] Remoroza, C. A., Y. Liang, T. D. Mak, Y. Mirokhin, S. L. Sheetlin, X. Yang, J. V. San Andres, M. L. Power and S. E. Stein. Increasing the Coverage of a Mass Spectral Library of Milk Oligosaccharides Using a Hybrid-Search-Based Bootstrapping Method and Milks from a Wide Variety of Mammals. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(15): 10316-10326.
- [10] Tonon, K. M., A. Miranda, A. Abrao, M. B. de Moraes and T. B. Moraes. Validation and application of a method for the

simultaneous absolute quantification of 16 neutral and acidic human milk oligosaccharides by graphitized carbon liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. Food Chemistry, 2019, 274: 691-697.

[11] van Leeuwen, S. S. Challenges and Pitfalls in Human Milk Oligosaccharide Analysis. Nutrients, 2019, 11(11).

[12] Zhang, T., X. Liu, H. Li, Z. Wang, L. Chi, J. P. Li and T. Tan. Characterization of epimerization and composition of heparin and dalteparin using a UHPLC-ESI-MS/MS method. Carbohydrate Polymers, 2019, 203: 87-94.

[13] Zhang, W., T. Wang, X. Chen, X. Pang, S. Zhang, J. U. Obaroakpo, J. Shilong, J. Lu and J. Lv. Absolute quantification of twelve oligosaccharides in human milk using a targeted mass spectrometry-based approach. Carbohydrate Polymers, 2019, 219: 328-333.

标准起草组首先查阅了大量参考文献，认为以上参考文献中前处理方法及仪器条件对起草本文件具有参考价值。

(3) 实验工作，方法建立

标准起草组在广泛查阅收集国内外相关技术资料基础上，拟定了样品前处理方法和仪器检测条件等初步实验方案，开展了乳及乳制品中乳寡糖含量检测技术研究。本方法主要围绕前处理条件、色谱条件和质谱条件等多个方面对乳及乳制品中乳寡糖含量的测定方法进行了优化，最后对建立的方法进行方法学评价包括准确度、精密度、灵敏度、线性范围等。

（4）试验验证情况

2023 年 8 月，委托新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、农业农村部乳品质量检验检测中心（北京）和农业农村部乳品质量监督检验测试中心（哈尔滨）三家检测机构对检测方法的检测灵敏度、检测限、重复性、重现性、检测范围进行复核验证实验。验证结果表明，该方法设计合理，实用有效。

（5）形成标准征求意见稿

在以上工作基础上，标准起草组按照《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1—2020）和《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》（GB/T 20001.4—2015）的规定起草编写文本内容和编制说明内容，并组织开展 4 次专家讨论会。

2022 年 11 月 19 日，XXXX 组织召开研讨会，XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX 等人讨论标准的框架、关键环节和关键点。

2022 年 12 月 10 日，XXXX 组织召开内部研讨会，XXX、XXX、XXX、XXX、XXX 等人讨论标准的主要技术要点。

2023 年 4 月 7 日，XXXX 组织召开线上讨论会，会议邀请农业农村部乳品质量安全监督检验测试中心张宗城教授级高级工程师、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所周正奎研究员、天津市奶业科技创新协会孟庆江会长、河南农业大学动物科技学院高腾云教授、内蒙古自治区农牧业科学院农牧业质量安全与检测研究所王丽芳研究员、农业农村部乳品质量检验检测中心（哈尔滨）陶大利研究员、青岛农业大学食品学院韩荣伟副教授等相关领导专家对标准的文本

框架、编制说明、前期修改情况进行了讨论。

2023 年 10 月 24 日，XXXX 组织召开研讨会，XXX、XXX、XXX、XXX 等人讨论了标准编制说明的主要技术内容。

第二阶段：定向征求意见阶段

2023 年 4 月，标准起草组面向国内科研、教学、生产和检测等相关领域单位的专家发出征求意见函 20 份，见表 3，不同领域单位类型情况见表 4。

表 3 征求意见单位名单

序号	单位名称	备注
1	全国农技中心	/
2	上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所	/
3	广东省农业科学院动物科学研究所	/
4	农业农村部乳品质量监督检验测试中心	/
5	新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	/
6	安徽农业大学	/
7	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	/
8	内蒙古自治区农牧业科学院	/
9	农业农村部乳品质量监督检验测试中心（哈尔滨）	/
10	山东省农科院农业质量标准与检测技术研究所	/
11	唐山市农产品质量安全检验检测中心	/
12	农业农村部蔬菜品质监督检验测试中心（北京）	/
13	青岛农业大学	/
14	新疆农业大学	/
15	甘州区动物卫生监督所	/
16	河南农业大学	/
17	农业农村部棉花质量监督检验测试中心（乌鲁木齐）	/
18	农业农村部乳品质量监督检验测试中心（北京）	/

19	扬州大学动物科学技术学院	/
20	福建长富乳品有限公司	/

表 4 不同领域单位类型情况

序号	单位类型	单位数量
1	教学机构	5
2	科研机构	11
3	技术推广机构	2
4	生产企业	2

收到有意见和建议的回函 20 份，共提出建议意见 95 项，其中采纳 65 条，部分采纳 2 条，不采纳 28 条。标准起草组总结函审意见，进一步修改和规范了文件内容，形成标准预审稿。

第三阶段：预审阶段

2024 年 11 月 21 日，标准起草组组织召开了标准预审会，邀请郑小平、郑百芹、李俊玲、许文涛、单吉浩、牟玉莲、许晓敏 7 位专家，对标准预审稿进行了认真审查。在听取标准起草组汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出如下主要修改意见：一是建议标准名称修改为“乳及乳制品中 8 种乳寡糖的测定 液相色谱-串联质谱法”。二是删除乳寡糖的术语和定义。三是编制说明中补充完善基质效应试验数据及定量限浓度添加回收率试验数据。四是按 GB/T1.1、GB/T 20001.4 的要求进一步规范标准文本。专家组一致同意审查通过，建议标准起草单位按照上述意见进一步修改后形成公开征求意见稿，报全国畜牧业标准化技术委员会秘书处。预审意见汇总处理表附件 1。

第四阶段 公开征求意见阶段

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草，同时遵循以下原则：

1、政策性：制定本文件直接关系到国家 and 广大人民群众的利益。因此，在制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法规和规章。

2、先进性：对本文件中有关内容的确定，力求反映本研究领域的国内外先进技术和经验，使文件中所规定的技术内容可用于乳糖含量的准确测定。

3、规范性：在本文件的编制过程中力求做到技术内容的叙述正确无误，文字表达准确和简明易懂，文件构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑。

4、可操作性：可操作性是制定标准的必备因素。制定本文件时，始终把经济实用和可操作性作为重要依据，以便在执行中容易操作。

（二）主要内容及其确定依据

2.1 标准文本结构

标准文本结构为：1 范围、2 规范性引用文件、3 术语和定义、4 原理、5 试剂或材料、6 仪器设备、7 样品、8 试验步骤、9 液相色谱质谱条件、10 试验数据处理、11 精密度、12 检出限和定量限。

2.2 标准检测原理

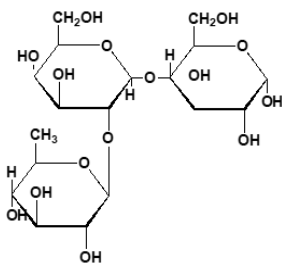
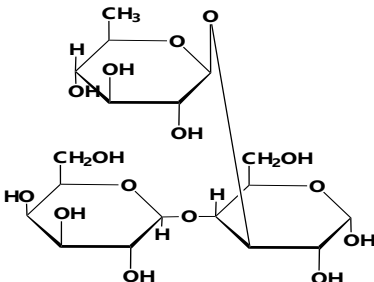
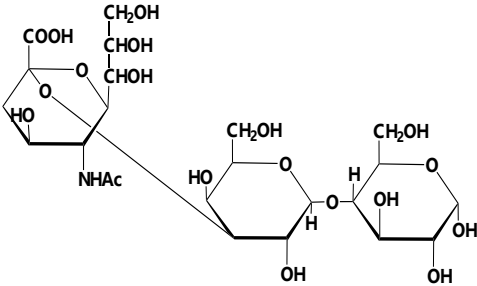
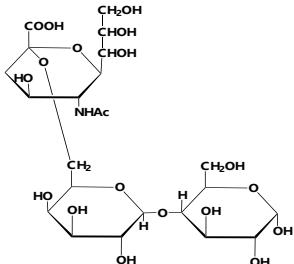
多孔石墨化碳色谱柱（Hypercarb PGC）机械性能稳定，宽 pH 耐受范围，耐纯水相，低柱流失，适用于极性化合物、顺反异构体、非对映异构体，特别是寡糖类目标物的分离。试样经溶解制备后，

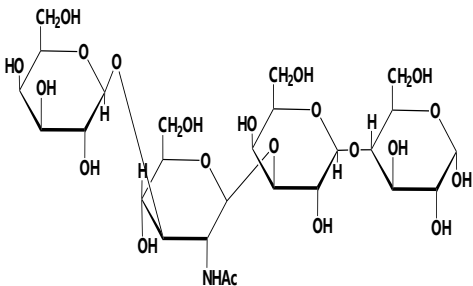
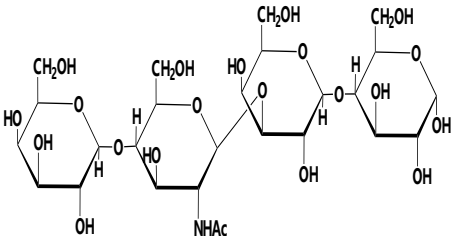
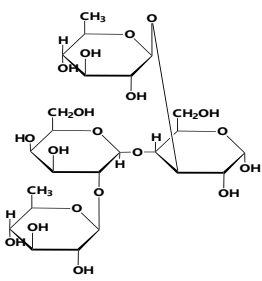
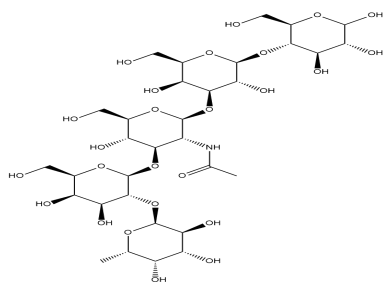
采用高速离心的方式去除脂肪，超滤法去除蛋白质。滤液中的低聚糖经 NaBH_4 破坏寡糖还原端的半缩醛结构，将 α 和 β 异头体还原成结构完全相同的开环结构，经液相色谱-质谱检测，外标法定量。

2.3 标准试验方法

2.3.1 目标物结构与性质

表 5 目标物结构与性质

目标物	CAS	结构	性质
2'-FL	41263-94-9		中性糖
3-FL	41312-47-4		中性糖
3'-SL	35890-38-1		酸性糖
6'-SL	35890-39-2		酸性糖

LNT	14116-68-8		中性糖
LNnT	13007-32-4		中性糖
DFL	20768-11-0		中性糖
LNFP I	7578-25-8		中性糖

2.3.2 前处理条件

2.3.2.1 脂肪与蛋白的去除方法的选择

为了提高HMOs分析的准确性并减少基质对色谱柱和色谱仪的损耗，需要选择适当的纯化方法去除基质中的脂肪和蛋白质。研究表明，高速离心、固相萃取和液相萃取是常用的去除脂肪的方法，而超滤和有机溶剂沉淀法则是有效去除蛋白的方法。

对于脂肪的去除，本文件选择了操作简便且经济有效的高速离心法。基于HMOs与脂肪之间密度和溶解度的差异，实现两者的有

效分离，达到去除脂肪的目的。首先，将基质用水溶解，HMOs 水溶性较好，能够完全溶于水中，而脂肪相反；接下来，进行高速离心，使液体分层，此时脂肪浮于基质液面；最后，使用移液枪移取下层清液，得到富集 HMOs 且去除脂肪的清液。在操作过程中应注意避免触碰到底部的不溶物沉淀。经方法优化，实验结果表明，以 6000 r/min 离心 20 min 的条件进行基质溶液与脂肪的分离效果最佳。

对于蛋白的去除，尽管超滤和有机溶剂沉淀法均是有效的方法，然而后者存在三点弊端。第一点，有机溶剂沉淀法利用蛋白与 HMOs 在乙醇、乙腈等有机溶剂中溶解度的差异来达到去除蛋白的目的，在此处理过程中可能会引发某些 HMOs 的损失；第二点，该方法引入的有机溶剂难以完全去除，不利于后续 NaBH_4 还原反应的进行；第三点，有机溶剂废液处理费用昂贵。因此，本文件选择了超滤法进行蛋白处理，且使用 10 KDa 超滤管，在此条件下能够有效去除样品中的蛋白质干扰。

综合考虑操作简便性、经济性和对样品的影响，本文件选择了高速离心去除脂肪，以及超滤法去除蛋白质，以确保最终 HMOs 分析结果准确可靠。

2.3.2.2 目标物的 NaBH_4 还原

寡糖末端（还原端）的糖单元上存在 C1 原子的差相异构化现象，形成 α 和 β 异构体，这会导致寡糖分析困难，因为它们的结构存在差异，在色谱分离中会产生“双峰”现象。为了解决这一问题，可以采用还原剂硼氢化钠（ NaBH_4 ）将糖环打开。 NaBH_4 会破坏寡糖还原端的半缩醛结构，将 α 和 β 异构体还原成结构完全相同的开环结构，从而降低分析难度。

在实际样品中，乳粉基质中含有大量乳糖，因此在进行 HMOs 还原时需要计算乳糖消耗的 NaBH_4 量。经方法优化，实验结果表明，添加 0.5 mL 0.25 mol/L 的 NaBH_4 即可将基质中的寡糖完全还原，且保证了还原剂处于过量状态。然而，过量的 NaBH_4 可能损坏色谱柱，降低柱效，因此在还原反应完成后需要加入足量的乙酸，将未参与反应的 NaBH_4 转化为乙酸钠。

有研究表明，经 NaBH_4 还原、乙酸中和后的样品不需要额外的脱盐处理即可直接进行后续 LC-MS 分析(Bao, Chen et al. 2013, Tonon, Miranda et al. 2019)。需要注意的是，乙酸加入过程中会产生大量气体，需要缓慢加入，防止液体飞溅。通过以上前处理方法，可以有效消除异构体，降低分析难度，确保后续分析结果的准确性。

2.3.3 色谱条件

2.3.3.1 色谱柱选择

色谱柱选择及条件优化，是 HMOs 寡糖 LC-MS 定量方法的关键。鉴于寡糖的亲水性，亲水色谱（HILIC）分离成为首选。亲水色谱（HILIC）是一种以乙腈（甲醇）-水体系作为流动相，按照化合物极性以及所带电荷数的不同对目标物进行分离的色谱分析方法，是寡糖分离的常用手段，同时亦可以实现与质谱检测器的在线联用。

因此建立过程中首先尝试了两种不同品牌的 HILIC 色谱柱，菲罗门公司的 Luna HILIC 色谱柱以及赛默飞公司的 GlycanPac™ AXH-1 色谱柱。Luna HILIC 柱的硅胶表面被交联的二醇基团覆盖，适合分析如 HMOs 类的强极性化合物。GlycanPac™ AXH-1 是 HILIC 和弱阴离子交换（WAX）混合模式色谱柱，其保留机理结合了亲水相互作用、离子间静电作用力以及离子交换，可显著提高色谱柱的

选择性。此外，GlycanPac™ AXH-1 的柱填料粒径为 1.9 μm，相较于普通 HILIC 柱具有更高的柱效。

将 8 种 HMOs 标准品混合、经 NaBH₄ 还原后，采用 Luna HILIC 色谱柱进行 LC-MS 分析，实验结果表明，酸性糖同分异构体 3'-SL 和 6'-SL 可以实现较好的分离效果，但是 LNT 和 LNnT、2'-FL 和 3-FL 这两对中性糖无法分离，不满足 MS 定量条件。同时发现不同缓冲液条件（如缓冲盐浓度等）对分离效果影响不大。GlycanPac™ AXH-1 色谱柱与 Luna HILIC 色谱柱相比，分离效果稍有提高，但对于两对中性糖异构体而言仍无法满足定量要求，并且通过缓冲盐浓度、pH 以及液相梯度三项条件优化均无法实现中性糖异构体的有效分离。三对同分异构体在 GlycanPac™ AXH-1 色谱柱与 Luna HILIC 色谱柱上的分离情况见图 1~图 2。

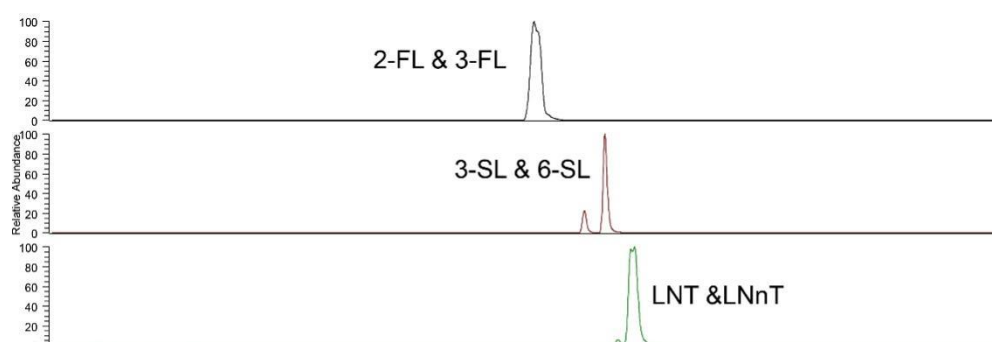


图 1 三对 HMOs 同分异构体的 Luna-HILIC-MS 谱图

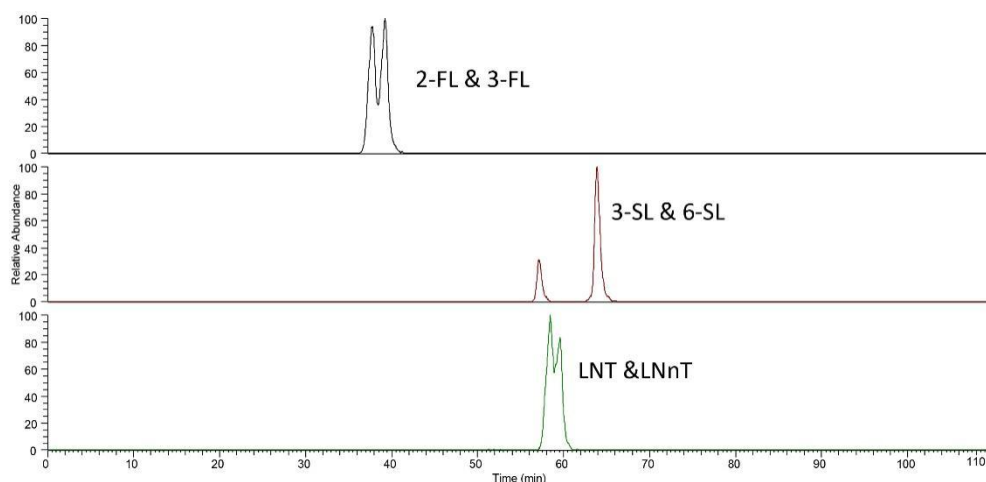


图 2 三对 HMOs 同分异构体的 GlycanPac™ AXH-1-HILIC-MS 谱图

再次对色谱柱性能进行分析后，尝试采用多孔石墨化碳色谱柱（Hypercarb PGC）对 8 种还原后的 HMOs 寡糖进行分离。PGC 色谱柱具有稳定的机械性能，宽 pH 耐受范围，耐纯水相，低柱流失，可用于极性化合物、顺反异构体、非对映异构体，特别是寡糖类目标物的分离。由于糖苷键的连接方式不同，HMOs 寡糖异构体的分子结构（主要是平面结构）、极性以及带电荷的难易程度都具有较大差异，这使得 HMOs 在多孔石墨化碳色谱柱上保留能力有很大差异，进而能够满足准确定性与定量的要求。8 种 HMOs 在多孔石墨化碳色谱柱上分离的情况见图 3。

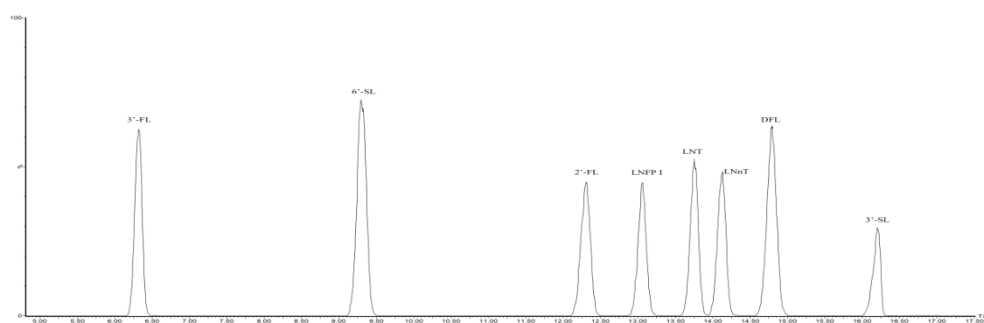


图 3 8 种 HMOs 在多孔石墨化碳色谱柱上分离的情况

2.3.3.2 流动相的选择

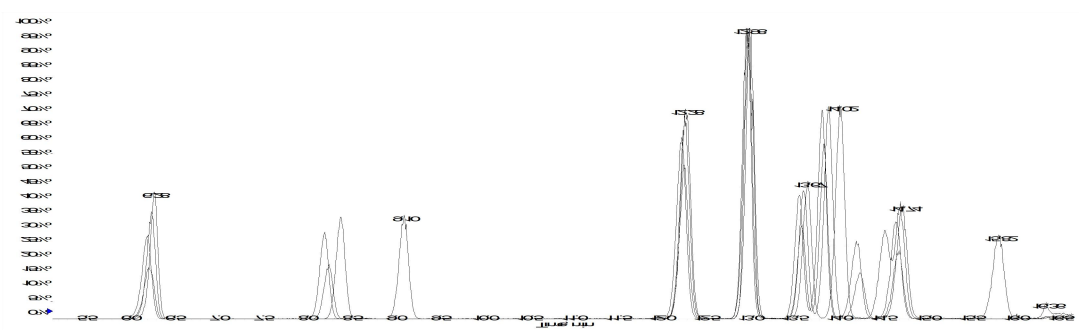
1、缓冲盐优化实验

（1）浓度

在实验初期选择了纯水作为流动相 A，乙腈作为流动相 B 进行分析，发现酸性糖无法从多孔石墨化碳色谱柱上洗脱，后经采用 0.1%甲酸作为流动相 A，0.1%甲酸乙腈作为流动相 B，进行分析，酸性糖可以被洗脱下来，但是出现了洗脱时间不稳定的情况，并且

洗脱程序长达 70 min; 后改用乙酸铵缓冲盐体系, 解决了保留时间漂移的问题, 并且乙酸铵降低了酸性 HMO 与柱填料的相互作用, 使其更容易被洗脱下来, 缩短了色谱分析的时间, 与程序相比时间缩短了一半。

本方法共对比了 3 个不同浓度的乙酸铵水相溶液, 分别是 5 mM、10 mM、20 mM。通过对比发现 10 mM 和 20 mM 两个浓度条件下的酸性糖保留稳定性优于 5 mM, 但是当乙酸铵浓度为 20 mM 时, 其降低了各寡糖在多孔石墨化碳色谱柱上的保留, 并且盐浓度过高会导致质谱稳定性降低。综合比对后得出结论, 当乙酸铵浓度为 10 mM 时最为合适。为满足流动相乙酸铵浓度环境, 在有机相中通过添加高浓度乙酸铵水溶液的方式使有机相中的乙酸铵浓度也为 10 mM, 并且让有机相中水的比例占 5%。缓冲盐体系下连续进样后各 HMOs 保留情况见图 4~图 5。



(2) pH 值

实验中发现流动相 pH 值对各寡糖间的分离度有一定影响，特别是对 6'-SL 与 3'-SL 这对酸性糖。我们分别考察了 pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5 五个不同 pH 条件下各寡糖间的分离度。

总体来说，随着 pH 值降低，酸性糖在色谱柱上的保留逐渐增强，洗脱时间变长，而对中性糖的保留影响不大，保留时间的变化不大。当 pH=6.5 时，3'-SL 与 DFL 共洗脱，色谱峰完全重叠，无法分离，无法满足色谱定量要求。当 pH6.0 时，随着酸性糖保留变强，6'-SL 与 3'-SL 出峰时间延后，DFL 与 3'-SL 被分离开来。当 pH5.5 时，8 种寡糖分离度皆已满足色谱定性和定量要求。当 pH5.0 时，寡糖间的分离度优于 pH5.5，但是由于 3'-SL 的保留增强，在 35 min 的梯度洗脱程序内已无法洗脱出来。当 pH4.5 时，由于 6'-SL 保留的增强，6'-SL 出峰时间延后，因而与 2'-FL 的色谱峰发生部分重叠，继而无法满足色谱定量要求。

因此经综合考量后，流动相的最适 pH 为 5.5，既能满足色谱分离要求，又能保证分析时间不会过长。

2、有机相

在实验中发现 LNT 与 LNnT 这对异构体很难分离，不管是调整缓冲盐浓度，还是调整梯度洗脱程序，亦或是调整流动相 pH 对 LNT 与 LNnT 的分离都不起作用，后来发现在有机相中增加异丙醇，可以改善 LNT 与 LNnT 的分离度。

当异丙醇的比例增加到 20% 时，可以从谱图中看到 LNT 与 LNnT 的分离度得到很大改善，随着异丙醇比例增加，LNT 与 LNnT 的分离度逐渐增加。当异丙醇比例增加至 40% 时，LNT 与 LNnT 的

分离度完全满足色谱定性与定量要求。当继续增加异丙醇比例后，分离度虽然更好，但是由于异丙醇黏度大，系统压力也逐渐增加，导致系统超压报警，所以综合考量分离度与系统压力，异丙醇比例最终定为 40%，有机相最终组成为 5% 200 mM 乙酸铵(pH5.5)+55% 乙腈+40%异丙醇。有机相中不同比例异丙醇条件下 HMOs 保留情况见图 6~图 8。

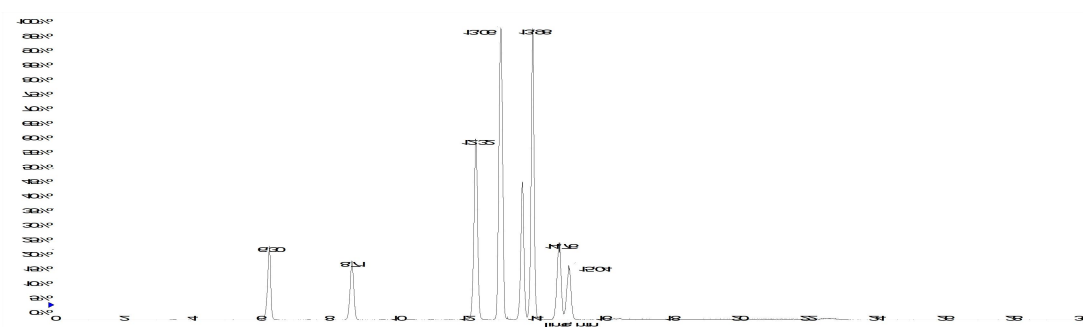


图 6 20 %异丙醇条件下各 HMOs 保留情况

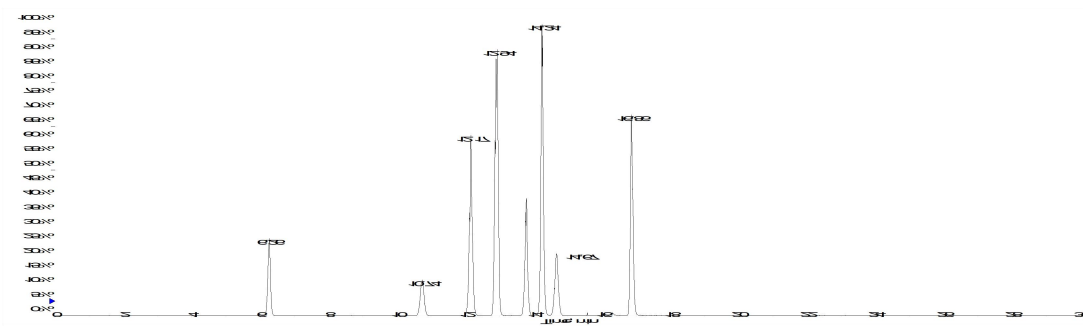


图 7 40 %异丙醇条件下各 HMOs 保留情况

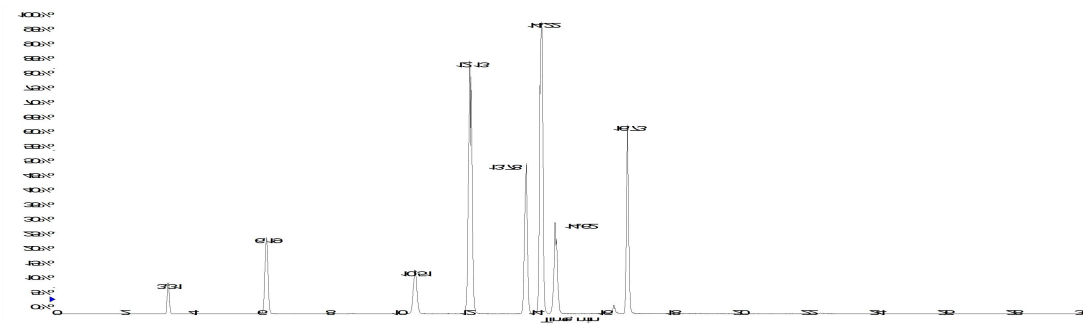


图 8 50 %异丙醇条件下各 HMOs 保留情况

2.3.3.3 柱温

结合多孔石墨化碳色谱柱的特性，可以发现色谱柱温度影响寡

糖的保留，在实际应用过程中发现随着柱温的提高，寡糖在色谱柱上的保留减弱，洗脱提前，在相同洗脱程序内，后续平衡时间可以更长，这样更利于保证连续进样后的重现性。我们以 10 °C 为步长考察柱温对保留时间的影响，当柱温升至 60 °C 时，色谱柱对 LNNt 与 DFL 的保留强度接近，色谱峰发生重叠，两个寡糖的分离度无法满足色谱定量要求。因此，50 °C 的柱温更利于寡糖的洗脱与分离。

2.3.3.4 梯度调整

在确定了流动相中各组分比例、pH 值，以及色谱柱温度后，进行连续进样发现洗脱程序梯度不稳定，寡糖保留时间漂移。

针对此项进行了洗脱程序梯度调整，首先调整初始流动相比例，即改变前段洗脱行为，发现随着初始有机相比比例降低，前 7 个寡糖的保留时间集体后移，虽然此过程保留漂移问题没有改善，但有机相初始比例在 5% 时，8 种寡糖保留时间较为合适，集中在整体洗脱时间的中段。

因此，洗脱程序以有机相初始比例为 5% 开始，调整 12 min~14 min 间的流动相比比例，保留漂移问题仍没有改善，且改变了寡糖间的分离度，导致寡糖间分离度差。尝试将后段大比例有机相平衡调整为 100% 有机相平衡，中性糖的保留漂移问题得到改善，但酸性糖的保留漂移问题依然没有改善。增加前段和后段的平衡时间，仍没有改善酸性糖的保留漂移问题。通过调整缓冲盐浓度，解决了酸性糖保留漂移问题。

最终洗脱程序及流动相见表 6。

表 6 梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	流动相 A (10mM 乙酸铵水溶液, pH=5.5)	流动相 B (5%200mM 乙酸铵水溶液,pH=5.5/55%乙腈/40%异丙醇)
0	0.5	95	5
12	0.5	87	13
14	0.5	0	100
18	0.5	0	100
19	0.5	95	5
30	0.5	95	5

2.3.4 质谱条件

2.3.4.1 扫描方式

对各 HMOs 在正、负离子电离模式下的响应进行比较时发现，中性 HMOs 在正离子模式下的响应较高，酸性 HMOs 在负离子模式下的响应较高。鉴于正离子模式下，样品分析时产生的背景信号较强，因此采用负离子扫描模式进行 HMOs 定量分析。各 HMO 在正、负离子电离模式下的质谱图见图 9~图 16。

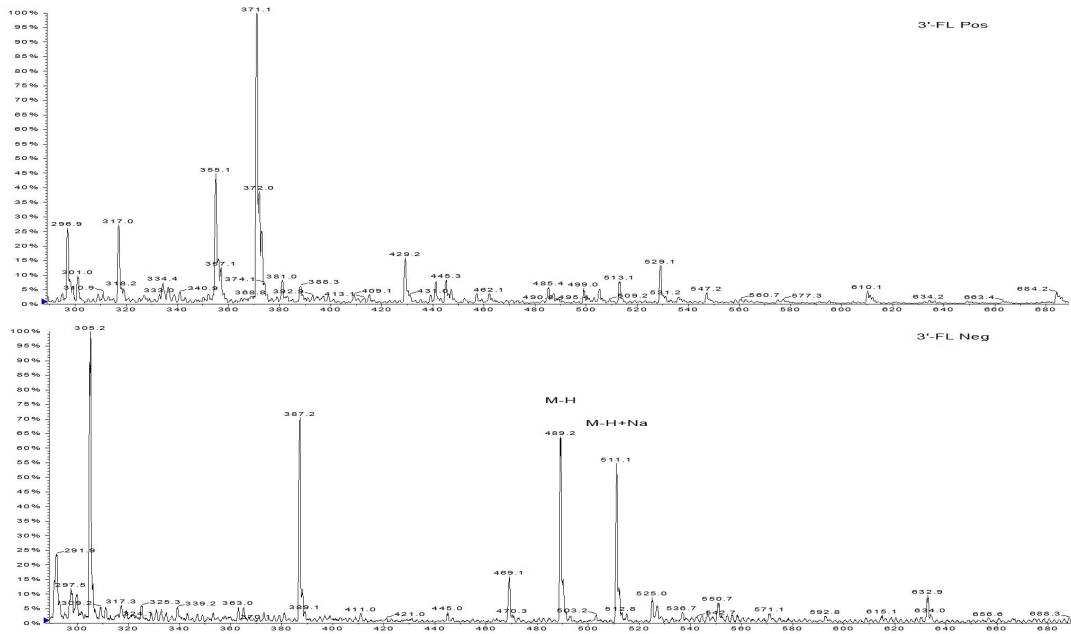


图 9 3-FL 正/负离子模式扫描图

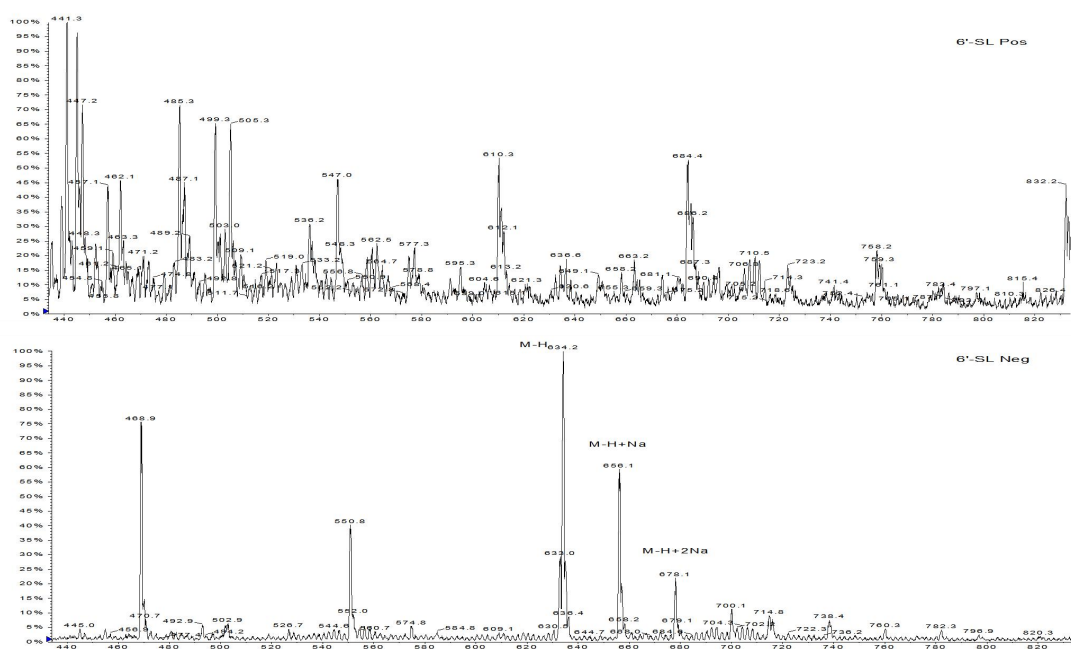


图 10 6' -SL 正/负离子模式扫描图

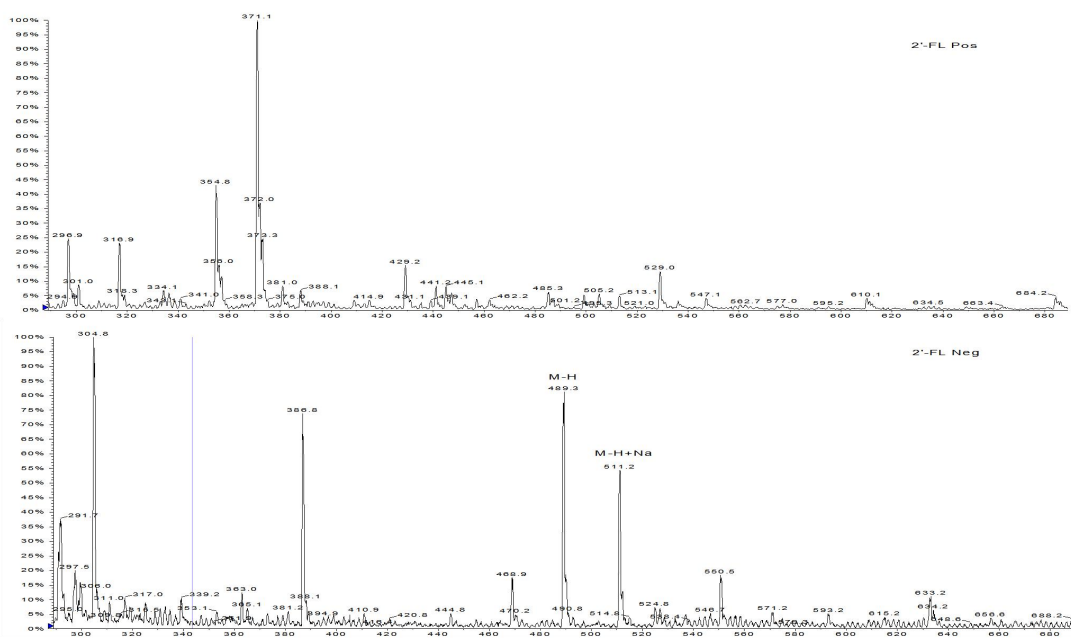


图 11 2' -FL 正/负离子模式扫描图

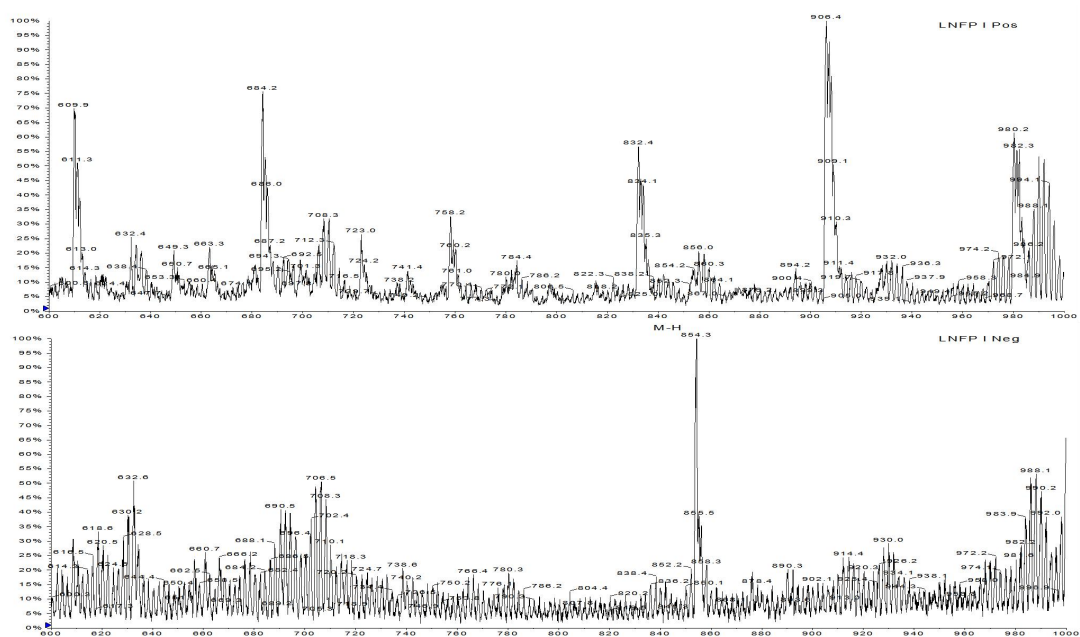


图 12 LNFP I 正/负离子模式扫描图

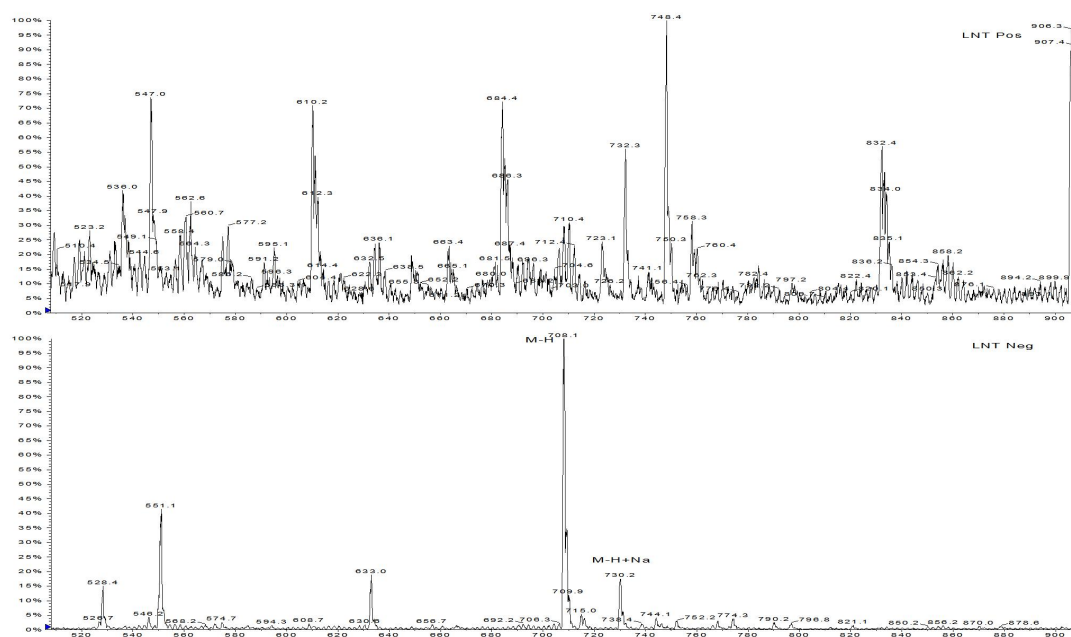


图 13 LNT 正/负离子模式扫描图

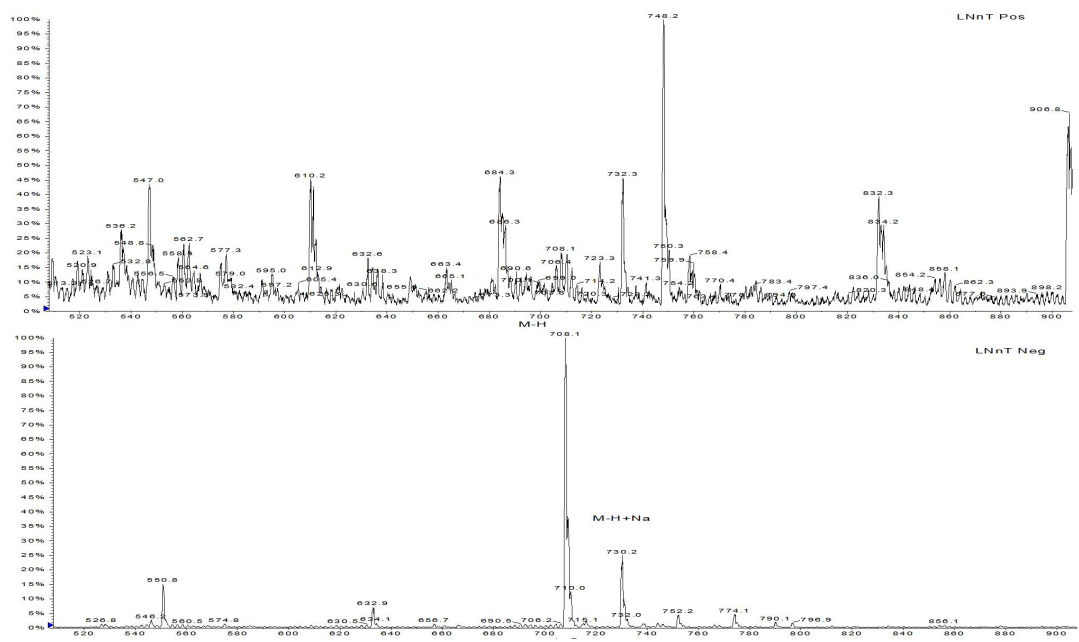


图 14 LNaT 正/负离子模式扫描图

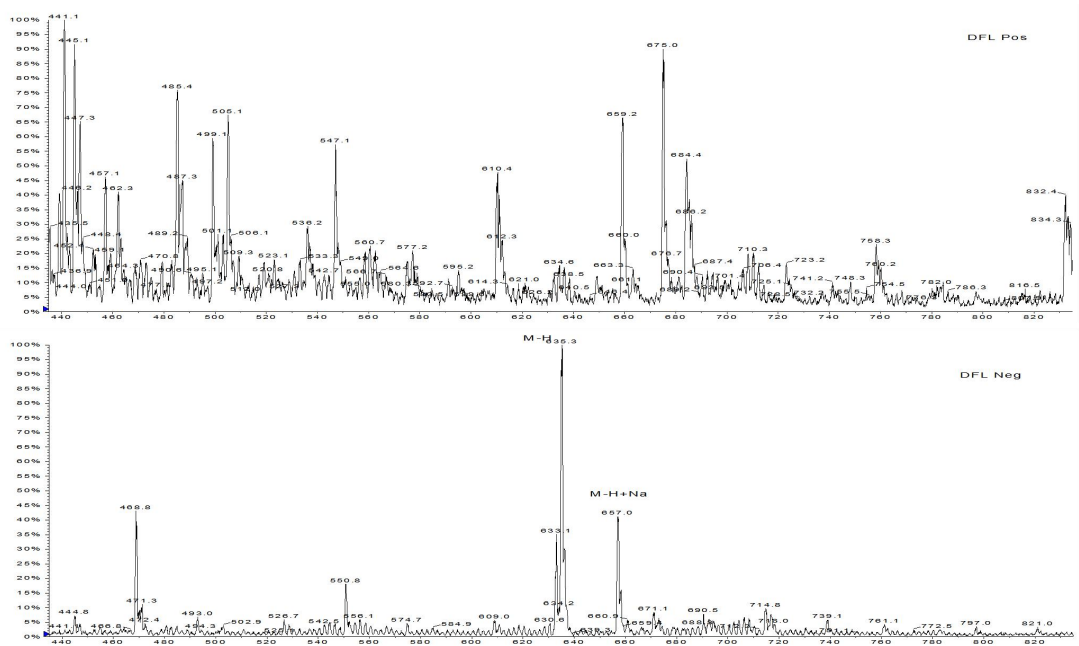


图 15 DFL 正/负离子模式扫描图

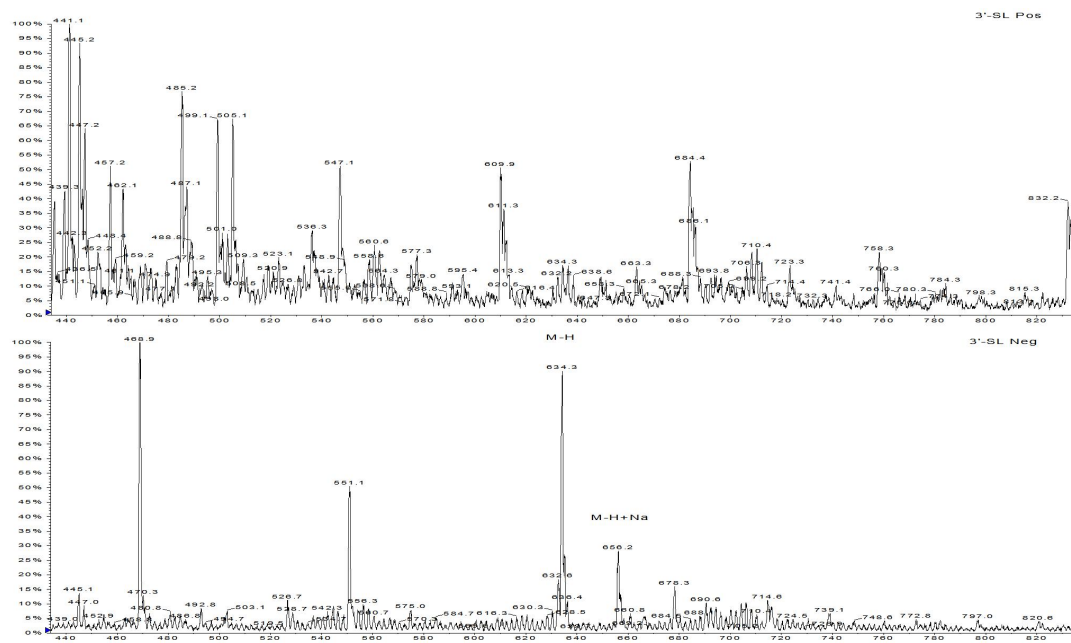


图 16 3'-SL 正/负离子模式扫描图

2.3.4.2 定量离子选择与质谱方法优化

在不同流动相（甲酸/乙酸铵）以及不同扫描模式（正离子/负离子）下，各个经 NaNH_4 还原后的 HMOs 电离形成的母离子种类及其相对丰度有显著差异。选取强度最高的子离子作为定量依据。按照 2.3.3 中建立的液相条件进行 LC-MS 分析，各 HMOs 的定性离子与定量离子如表 7 所示。对离子源参数进行进一步优化，最终确定的质谱条件如下：

表 7 8 种 HMOs 多反应监测条件

序号	化合物名称	母离子 (m/z) a	锥孔电压(eV)	定性/定量离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
1	2'-FL	489.2	40	58.9*	40
				89.0	28
2	3-FL	489.2	45	89.0*	26
				58.9	32
3	3'-SL	634.2	20	86.9*	36
				289.9	26
4	6'-SL	634.2	20	86.9*	36

				289.9	28
5	DFL	635.2	55	205.0*	30
				89.0	36
6	LNnT	708.2	65	113.0*	40
				89.0	44
7	LNT	708.2	55	89.0*	42
				112.9	42
8	LNFP I	854.3	70	112.9*	48
				89.1	50
a为还原后的化合物母离子。					
*定量离子。					

扫描模式：负离子；鞘气流速：15 arb；辅助气流速：3 arb；
喷雾电压：2 kV；毛细管温度：275 °C；毛细管电压：50%。

2.4 方法验证

2.4.1 方法线性范围

各 HMOs 的标准曲线方程与相关系数如表 8 所示，校准曲线中各 HMOs 浓度范围覆盖一个数量级，且各标准曲线方程的相关系数均大于 0.99，满足方法验证要求。

表 8 各 HMOs 的校准曲线方程与相关系数

项目	曲线方程	相关系数
2'-FL	$Y=75436.35X+273.745$	0.9969
3-FL	$Y=77840.78X+453.23$	0.9985
3'-SL	$Y=25856.95X+374.29$	0.9992
6'-SL	$Y=23376.40X+831.25$	0.9987
LNT	$Y=70936.64X+672.95$	0.9982
LNnT	$Y=28258.03X+1039.43$	0.9989
DFL	$Y=38569.24X+211.54$	0.9988
LNFP I	$Y=57136.21X+312.361$	0.9987

2.4.2 方法定量限

以三倍信噪比为检出限，10 倍信噪比为定量限，各 HMOs 检出限与定量限见表 9、10。

表 9 婴幼儿配方粉中 8 种 HMOs 的检出限与定量限

项目	检出限 mg/100g	定量限 mg/100g
2'-FL	3	10
3-FL	3	10
3'-SL	3	10
6'-SL	3	10
LNT	1.5	5
LNnT	1.5	5
DFL	1.5	5
LNFP I	3	10

表 10 乳及乳制品中 8 种 HMOs 的检出限与定量限

名称	检出限 (mg/100g)	定量限 (mg/100g)
2'-FL	0.3	1.0
3-FL	0.3	1.0
3'-SL	0.3	1.0
6'-SL	0.3	1.0
DFL	0.15	0.5
LNnT	0.15	0.5
LNT	0.15	0.5
LNFP I	0.3	1.0

对确定的定量限水平，以回收率方式验证，结果见表11。结果符合方法学验证参数，检出限水平满足实际检测需求。

表 11 乳及乳制品中 8 种 HMOs 的定量限验证

目标物	液体试样(牛乳)		固体试样（婴儿配方乳粉）	
	添加水平 (mg/100g)	回收率 (%) n=6	添加水平 (mg/100g)	回收率 (%) n=6
2'-FL	1	99.2±5.2	10	98.4±4.8
3-FL	1	100.6±3.6	10	96.0±4.6

3'-SL	1	97.6±3.6	10	96.7±4.0
6'-SL	1	101.4±3.7	10	97.0±3.2
DFL	0.5	97.5±5.5	5	99.5±4.1
LNnT	0.5	97.7±6.4	5	98.4±4.9
LNT	0.5	97.9±5.5	5	100.6±4.2
LNFP I	1	98.8±5.8	10	97.4±5.9

2.4.3 标准溶液稳定性

使用已知纯度和水分含量的标准品，通过称量计算标准品储备液的浓度。生产商 (如 Glycom) 一般会以密封瓶的形式提供 HMOs 标准品，同时提供 COA 证书，说明所提供对照品的纯度和水分含量。若供应商未说明对照品的水分含量，则应在真空烘箱中对获得的对照品进行干燥 (真空，60 °C，干燥整夜) 或测定对照品的水分含量。在实验阶段，配制一定浓度的溶液或者试剂作为受试液，分装后保存于适宜的环境中；实验中采用 E_n (也称 E 比率) 值确定所储备液的有效期，具体操作如下：4 °C ~6 °C 储存条件下按周时间间隔，-20 °C 储存条件下按月时间间隔，取部分分装后标准溶液，以新配制标准溶液 (x_0) 为标准对其进行测定，得到不同保存期的标准溶液浓度值 (x_i)。计算 x_0 与 x_i 相比较的 E_n 值，依据 E_n 值及 x_i 对应的保存期确定该标准溶液的有效期，可接受的 E_n 值应在 -1 到 +1 之间，即 $E_n \leq 1$ (越接近零越好)。计算公式见公式 1。

公式 1:

$$E_n = \frac{x_i - x_0}{\sqrt{U_1^2 + U_2^2}}$$

式中： x_i -储备液的测试浓度； x_0 -测试时新配制标准溶液浓度； U_1 -储备液测试浓度扩展不确定度； U_2 -新配制标准溶液浓度扩展不

确定度。

经实验储备液在 4 °C ~6 °C 下储存 1 周稳定, 在-20 °C 下储存 1 年稳定, 但冻融次数不建议超过 3 次。测试过程中发现储备液反复冻融 5 次以上储备液的流动性变差, 因此建议冻融次数不超过 3 次。配制方式见表 12。标准曲线的配制根据表 13, 制备混合溶液, 并用水定容至刻度。

表 12 8 种 HMOs 储备液的配制

项目	配制方式	备注
2'-FL	称取 10 mg±1 mg 2'-FL 对照品, 置 5 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	
3-FL	称取 10 mg±1 mg 3-FL 对照品, 置 5 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	
3'-SL	称取 5 mg±1 mg 3'-SL Na 对照品, 置 5 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	3'-SL 对照品通常以钠盐的形式提供。用称量重量除以 3'-SL·Na 的分子量 (655.353), 并乘以 3'-SL 的分子量 (633.553), 将该钠盐对照品的浓度转化为 3'-SL 的浓度 (游离酸)。
6'-SL	称取 5 mg±1 mg 6'-SL Na 对照品, 置 5 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	6'-SL 对照品通常以钠盐的形式提供。用称量重量除以 6'-SL·Na 的分子量 (655.353), 并乘以 6'-SL 的分子量 (633.553), 将该钠盐对照品的浓度转化为 6'-SL 的浓度 (游离酸)。
LNT	称取 5 mg±1mg DFL 对照品, 置 5 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	
LNnT	称取 10 mg±1 mg LNT 对照品, 置 5 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	
DFL	称取 10 mg±1 mg LNT 对照品, 置 5 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	
LNFP I	称取 10 mg±1 mg LNT 对照品, 置 5 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	

表 13 8 种 HMOs 标准曲线的配制

浓度 水平	吸取储备液体积 (μL)							
	2'-FL (2 mg/mL)	3-FL (2 mg/mL)	LNT (2 mg/mL)	LNnT (2 mg/mL)	DFL (1 mg/mL)	3'-SL (1 mg/mL)	6'-SL (1 mg/mL)	LNFP I (2 mg/mL)
系列 1	50	50	50	50	50	50	50	50
系列 2	100	100	100	100	100	100	100	100
系列 3	200	200	200	200	200	200	200	200
系列 4	400	400	400	400	400	400	400	400
系列 5	800	800	800	800	800	800	800	800

2.4.4 准确度和精密度

按照低中高 3 水平向基质中添加不同量的 HMOs，进行 6 平行检测，计算回收率以评估方法准确度，计算相对标准偏差（RSD）用以评估方法精密度。各 HMOs 在三种添加量下的回收率及 RSD 见表 14，HMOs 回收率在 95%以上；RSD 在 5.10%以内，小于 6%，精密度和准确度满足方法验证要求。

表 14 8 种 HMOs 添加量及准确度与精密度

项目	添加量 mg/100g	1	2	3	4	5	6	平均值	准确度%	精密度% RSD
2'-FL	30	30.52	30.47	29.88	28.33	28.42	29.11	29.46	98.2	0.98
	90	92.24	93.5	92.76	92.81	92.76	91.04	92.52	102.8	0.82
	500	503.09	501.49	500.05	504.27	506.53	490.06	500.92	100.2	1.05
3-FL	30	30.1	29.59	29.41	30.57	28.73	30.37	29.80	99.3	2.10
	90	89.63	94.31	88.24	87.15	90.68	90.38	90.07	100.1	2.50
	500	504.26	504.15	495.3	501.8	498.01	496.51	500.01	100.0	0.72
3'-SL	15	15.13	15.15	14.35	15.12	14.88	14.15	14.80	97.5	2.71
	45	46.68	45.25	43.18	45.07	44.23	45.08	44.92	99.8	2.36
	200	203.49	199.82	192.6	209.58	208.36	201.87	202.62	101.3	2.78
6'-SL	15	13.58	15.28	13.81	15.14	13.81	15.18	14.47	96.4	5.10
	45	45.09	42.93	44.27	42.3	45.18	42.61	43.73	97.2	2.67
	200	205.84	209.84	205.01	195.32	205.09	205.09	204.37	102.2	2.15

LNT	30	29.11	28.74	29.03	28.34	28.84	29.75	28.97	96.6	1.48
	90	90.01	92.66	91	92.55	89.57	93.78	91.60	101.8	1.65
	500	492.14	504.06	493.45	499.97	500.14	501.37	498.52	99.7	0.86
LNnT	30	28.09	30.98	30.4	30.87	29.1	28.14	29.60	98.7	4.10
	90	91.97	92.07	93.66	91.22	94.54	88.13	91.93	102.1	2.21
	500	508.81	502.58	500.38	507.54	502.86	490.86	502.17	100.4	1.16
DFL	15	14.46	15.27	15.14	14.76	15.28	15.18	15.02	100.1	2.02
	45	44.12	43.94	45.09	43.9	42.84	44.71	44.10	98.0	1.60
	200	203.43	201.34	199.59	209.23	207.98	209.96	205.26	102.6	1.95
LNFP I	30	28.96	30.37	30.87	30.12	29.78	29.01	29.85	99.5	2.32
	90	91.39	93.22	90.19	91.34	91.55	90.01	91.28	101.4	1.15
	500	502.7	487.5	504.05	494.43	505.32	488.54	497.09	99.4	1.47

2.4.5 基质干扰及灵敏度

目前已发表的文献均采用外标法对人乳/乳粉中的 HMO 进行定量分析。其中一些文献采用校准曲线法,利用溶解于水中的 HMO 标准品绘制校准曲线(Tonon, Miranda et al. 2019, Zhang, Wang et al. 2019), 另一些文献采用基质匹配法,向基质中添加 HMO 标准品并绘制校准曲线(Bao, Chen et al. 2013)。当采用水溶 HMO 进行校准曲线绘制时,定量结果可能会在一定程度上受到基质效应的影响。研究组同时采用两种方法绘制校准曲线,对同一组添加回收的样品(添加量为定量限水平)进行回收率计算,得到两种方法的加标回收率,并对基质效应进行评估。两种不同定量方法的加标回收率见表 15。

表 15 两种不同定量方法的加标回收率

目标物	液体试样(牛乳)			固体试样（婴儿配方乳粉）		
	添加水平 (mg/100g)	纯标标准曲线 回收率, n=6 (%)	基质标标准曲线 回收率, n=6 (%)	添加水平 (mg/100g)	纯标标准曲线 回收率, n=6 (%)	基质标标准曲线 回收率, n=6 (%)
2'-FL	1	99.2±5.2	98.3±6.8	10	98.4±4.8	96.8±5.2

3-FL	1	100.6±3.6	97.3±4.3	10	96.0±4.6	97.2±4.4
3'-SL	1	97.6±3.6	99.1±5.2	10	96.7±4.0	98.2±6.2
6'-SL	1	101.4±3.7	99.1±5.6	10	97.0±3.2	98.8±4.7
DFL	0.5	97.5±5.5	97.7±3.0	5	99.5±4.1	100.5±4.1
LNnT	0.5	97.7±6.4	91.9±5.2	5	98.4±4.9	98.6±6.2
LNT	0.5	97.9±5.5	97.8±5.2	5	100.6±4.2	99.1±6.4
LNFP I	1	98.8±5.8	100.8±3.4	10	97.4±5.9	103.0±1.8

由上表可知，在 8 种 HMO 的定量结果受基质效应影响规律不同，与校准曲线法相比，基质效应影响并不明显，基质干扰小，综合实验操作的简便性、定量的准确率。本标准采用纯标标准曲线进行定量。

2.4.5 实际样品测定

对牛奶、山羊奶、绵羊奶、水牛奶、牦牛奶、驴奶、马奶、骆驼奶的生乳分别进行检测，结果见表 16。测定结果与文献报道结果一致，表明本方法对特色畜奶中 HMO 的测定可满足实际应用需求。

表 16 不同畜奶中 8 种 HMO 的检测结果

项目	测定结果（mg/100g）							
	牛奶	山羊奶	绵羊奶	水牛奶	牦牛奶	驴奶	马奶	骆驼奶
2'-FL	-	41.38	79.36	10.18	9.48	9.14	9.13	11.17
3-FL	-	19.37	30.39	20.99	11.13	13.97	16.74	56.36
3'-SL	-	142.2	112.14	386.17	356.76	123.88	313.94	788.05
6'-SL	-	64.17	29.77	180.27	76.84	72.66	48.07	107.94
LNT	-	-	-	-	-	-	-	-
LNnT	-	15.34	8.44	8.21	14.50	29.86	11.19	14.39

DFL	-	-	-	-	-	-	-	-
LNFP I	-	-	-	-	-	-	-	-

对市售的 3 款不同段数的添加 HMOs 的婴幼儿配方乳粉进行检测，检测结果见表 17，通过检测值与标签值计算出各 HMOs 的准确度在 96.5%~101.4%之间，表明本方法可满足实际应用需求，且检测准确度符合方法学要求。

表 17 实际样品检测结果

样品编号	添加项目	实际值 mg/100g	检测值 1	检测值 2	检测值 3	平均值	标准 偏差	精密度 RSD%	准确度 %
Sample 1	LNFP	50	49	50	50	50	0.58	1.16	99.3
	3-FL	150	147	149	151	149	2.00	1.34	99.3
	LNnT	120	120	118	119	119	1.00	0.84	99.2
	2'-FL	600	598	599	596	598	1.53	0.26	99.6
Sample 2	2'-FL	380	362	371	367	367	3.68	1.00	96.5
	LNnT	100	98	100	105	101	2.94	2.91	101.0
Sample 3	2'-FL	798	799	805	805	803	2.83	0.35	100.6
	DFL	110	111	109	110	110	0.82	0.74	100.0
	LNT	264	264	271	268	268	2.87	1.07	101.4
	3'-SL	26	24	25	24	24	0.47	1.94	93.6
	6'-SL	120	119	122	121	121	1.25	1.03	100.6

三. 试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益。

(一) 试验验证的分析

本方法分别在 3 家实验室进行比对验证实验,以验证其重现性、灵敏度、准确性。以奶粉为基质,三种不同 HMOs 添加量进行连续 6 次重复测定,测得 HMOs 的回收率汇总见表 18~表 20。以婴儿配方食品和液奶为基质,做定量限水平添加实验,每个样品 6 平行,回收率汇总表见表 21。通过 3 家比对单位的结果显示,本方法满足重复性、再现性和灵敏度方法学验证要求。

表 18 8 种 HMOs 添加量及准确度与精密度 (Lab 1)

项目	添加量 mg/100g	1	2	3	4	5	6	平均值	准确度%	精密度% RSD
2'-FL	30	30.52	30.47	29.88	28.33	28.42	29.11	29.46	98.2	0.98
	90	92.24	93.5	92.76	92.81	92.76	91.04	92.52	102.8	0.82
	500	503.09	501.49	500.05	504.27	506.53	490.06	500.92	100.2	1.05
3-FL	30	30.1	29.59	29.41	30.57	28.73	30.37	29.80	99.3	2.10
	90	89.63	94.31	88.24	87.15	90.68	90.38	90.07	100.1	2.50
	500	504.26	504.15	495.3	501.8	498.01	496.51	500.01	100.0	0.72
3'-SL	15	15.13	15.15	14.35	15.12	14.88	14.15	14.80	97.5	2.71
	45	46.68	45.25	43.18	45.07	44.23	45.08	44.92	99.8	2.36
	200	203.49	199.82	192.6	209.58	208.36	201.87	202.62	101.3	2.78
6'-SL	15	13.58	15.28	13.81	15.14	13.81	15.18	14.47	96.4	5.10
	45	45.09	42.93	44.27	42.3	45.18	42.61	43.73	97.2	2.67
	200	205.84	209.84	205.01	195.32	205.09	205.09	204.37	102.2	2.15
LNT	30	29.11	28.74	29.03	28.34	28.84	29.75	28.97	96.6	1.48
	90	90.01	92.66	91	92.55	89.57	93.78	91.60	101.8	1.65
	500	492.14	504.06	493.45	499.97	500.14	501.37	498.52	99.7	0.86

LNnT	30	28.09	30.98	30.4	30.87	29.1	28.14	29.60	98.7	4.10
	90	91.97	92.07	93.66	91.22	94.54	88.13	91.93	102.1	2.21
	500	508.81	502.58	500.38	507.54	502.86	490.86	502.17	100.4	1.16
DFL	15	14.46	15.27	15.14	14.76	15.28	15.18	15.02	100.1	2.02
	45	44.12	43.94	45.09	43.9	42.84	44.71	44.10	98.0	1.60
	200	203.43	201.34	199.59	209.23	207.98	209.96	205.26	102.6	1.95
LNFP I	30	28.96	30.37	30.87	30.12	29.78	29.01	29.85	99.5	2.32
	90	91.39	93.22	90.19	91.34	91.55	90.01	91.28	101.4	1.15
	500	502.7	487.5	504.05	494.43	505.32	488.54	497.09	99.4	1.47

表 19 8 种 HMOs 添加量及准确度与精密度 (Lab 2)

项目	添加量 mg/100g	1	2	3	4	5	6	平均值	准确 度%	精密度% RSD
2'-FL	30	30.52	30.47	29.88	28.33	28.42	29.11	29.46	98.2	0.98
	90	92.24	93.5	92.76	92.81	92.76	91.04	92.52	102.8	0.82
	500	503.09	501.49	500.05	504.27	506.53	490.06	500.92	100.2	1.05
3-FL	30	30.1	29.59	29.41	30.57	28.73	30.37	29.80	99.3	2.10
	90	89.63	94.31	88.24	87.15	90.68	90.38	90.07	100.1	2.50
	500	504.26	504.15	495.3	501.8	498.01	496.51	500.01	100.0	0.72
3'-SL	15	15.13	15.15	14.35	15.12	14.88	14.15	14.80	97.5	2.71
	45	46.68	45.25	43.18	45.07	44.23	45.08	44.92	99.8	2.36
	200	203.49	199.82	192.6	209.58	208.36	201.87	202.62	101.3	2.78
6'-SL	15	13.58	15.28	13.81	15.14	13.81	15.18	14.47	96.4	5.10
	45	45.09	42.93	44.27	42.3	45.18	42.61	43.73	97.2	2.67

	200	205.84	209.84	205.01	195.32	205.09	205.09	204.37	102.2	2.15
LNT	30	29.11	28.74	29.03	28.34	28.84	29.75	28.97	96.6	1.48
	90	90.01	92.66	91	92.55	89.57	93.78	91.60	101.8	1.65
	500	492.14	504.06	493.45	499.97	500.14	501.37	498.52	99.7	0.86
LNnT	30	28.09	30.98	30.4	30.87	29.1	28.14	29.60	98.7	4.10
	90	91.97	92.07	93.66	91.22	94.54	88.13	91.93	102.1	2.21
	500	508.81	502.58	500.38	507.54	502.86	490.86	502.17	100.4	1.16
DFL	15	14.46	15.27	15.14	14.76	15.28	15.18	15.02	100.1	2.02
	45	44.12	43.94	45.09	43.9	42.84	44.71	44.10	98.0	1.60
	200	203.43	201.34	199.59	209.23	207.98	209.96	205.26	102.6	1.95
LNFP I	30	28.96	30.37	30.87	30.12	29.78	29.01	29.85	99.5	2.32
	90	91.39	93.22	90.19	91.34	91.55	90.01	91.28	101.4	1.15
	500	502.7	487.5	504.05	494.43	505.32	488.54	497.09	99.4	1.47

表 20 8 种 HMOs 添加量及准确度与精密度 (Lab 3)

项目	添加量 mg/100g	1	2	3	4	5	6	平均值	准确度%	精密度% RSD
2'-FL	30	30.52	30.47	29.88	28.33	28.42	29.11	29.46	98.2	0.98
	90	92.24	93.5	92.76	92.81	92.76	91.04	92.52	102.8	0.82
	500	503.09	501.49	500.05	504.27	506.53	490.06	500.92	100.2	1.05
3-FL	30	30.1	29.59	29.41	30.57	28.73	30.37	29.80	99.3	2.10
	90	89.63	94.31	88.24	87.15	90.68	90.38	90.07	100.1	2.50
	500	504.26	504.15	495.3	501.8	498.01	496.51	500.01	100.0	0.72
3'-SL	15	15.13	15.15	14.35	15.12	14.88	14.15	14.80	97.5	2.71

	45	46.68	45.25	43.18	45.07	44.23	45.08	44.92	99.8	2.36
	200	203.49	199.82	192.6	209.58	208.36	201.87	202.62	101.3	2.78
6'-SL	15	13.58	15.28	13.81	15.14	13.81	15.18	14.47	96.4	5.10
	45	45.09	42.93	44.27	42.3	45.18	42.61	43.73	97.2	2.67
	200	205.84	209.84	205.01	195.32	205.09	205.09	204.37	102.2	2.15
LNT	30	29.11	28.74	29.03	28.34	28.84	29.75	28.97	96.6	1.48
	90	90.01	92.66	91	92.55	89.57	93.78	91.60	101.8	1.65
	500	492.14	504.06	493.45	499.97	500.14	501.37	498.52	99.7	0.86
LNnT	30	28.09	30.98	30.4	30.87	29.1	28.14	29.60	98.7	4.10
	90	91.97	92.07	93.66	91.22	94.54	88.13	91.93	102.1	2.21
	500	508.81	502.58	500.38	507.54	502.86	490.86	502.17	100.4	1.16
DFL	15	14.46	15.27	15.14	14.76	15.28	15.18	15.02	100.1	2.02
	45	44.12	43.94	45.09	43.9	42.84	44.71	44.10	98.0	1.60
	200	203.43	201.34	199.59	209.23	207.98	209.96	205.26	102.6	1.95
LNFP I	30	28.96	30.37	30.87	30.12	29.78	29.01	29.85	99.5	2.32
	90	91.39	93.22	90.19	91.34	91.55	90.01	91.28	101.4	1.15
	500	502.7	487.5	504.05	494.43	505.32	488.54	497.09	99.4	1.47

表 21 3 家比对单位 8 种 HMOs 定量限水平回收率结果

Lab 1										
目标物	液体试样（牛乳）									
	添加量 mg/100g	1	2	3	4	5	6	平均值	准确度%	精密度% RSD
2'-FL	1	0.93	0.94	0.93	1.0	0.93	0.98	0.96	95.9	1

3-FL	1	1.0	1.0	1.0	0.98	0.92	0.93	0.99	98.7	1
3'-SL	1	0.99	1.0	0.95	1.0	0.95	0.94	0.98	98.0	1
6'-SL	1	0.99	0.98	0.92	1.0	0.95	1.0	0.98	98.4	1
DFL	0.5	0.52	0.49	0.51	0.52	0.48	0.52	0.51	101.6	0.5
LNnT	0.5	0.52	0.49	0.46	0.48	0.52	0.50	0.50	99.2	0.5
LNT	0.5	0.50	0.47	0.49	0.46	0.49	0.46	0.48	95.9	0.5
LNFP I	1	0.99	1.0	0.97	0.92	0.95	0.97	0.97	96.7	1
目标物	固体试样（婴儿配方乳粉）									
	添加量 mg/100g	1	2	3	4	5	6	平均值	准确度%	精密度% RSD
2'-FL	10	10.0	10.0	9.5	9.4	10.0	9.8	9.8	97.9	3.0
3-FL	10	9.4	9.2	9.2	9.6	9.2	9.5	9.4	93.8	1.7
3'-SL	10	9.8	10.0	9.1	9.4	9.1	10.4	9.7	96.6	5.4
6'-SL	10	9.8	10.4	9.9	10.5	10.4	10.1	10.2	102.0	2.9
DFL	5	5.1	4.6	4.6	5.1	4.6	5.0	4.8	96.7	5.4
LNnT	5	4.9	4.8	4.9	5.1	4.9	4.9	4.9	98.5	2.1
LNT	5	4.9	4.8	5.2	5.0	4.8	4.8	4.9	98.1	3.2
LNFP I	10	9.9	10.0	9.2	9.2	10.4	9.2	9.6	96.4	5.2
Lab 2										
目标物	液体试样（牛乳）									
	添加量 mg/100g	1	2	3	4	5	6	平均值	准确度%	精密度% RSD
2'-FL	1	1.0	1.0	1.0	0.93	1.0	1.0	1.0	100.6	1
3-FL	1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.99	1.0	1.0	101.9	1
3'-SL	1	0.97	0.99	1.0	1.0	0.96	1.0	1.0	99.6	1

6'-SL	1	1.0	1.0	0.92	0.92	1.0	1.0	0.99	98.8	1
DFL	0.5	0.51	0.49	0.47	0.52	0.50	0.49	0.50	99.4	0.5
LNnT	0.5	0.49	0.47	0.48	0.46	0.48	0.49	0.48	95.7	0.5
LNT	0.5	0.47	0.47	0.49	0.52	0.50	0.47	0.49	97.5	0.5
LNFP I	1	0.93	1.0	0.97	0.94	1.0	0.96	0.97	96.7	1.0
目标物	固体试样（婴儿配方乳粉）									
	添加量 mg/100g	1	2	3	4	5	6	平均值	准确度%	精密度% RSD
2'-FL	10	9.5	9.7	9.8	10.5	10.4	9.8	9.9	99.3	4.0
3-FL	10	9.6	9.4	10.5	10.4	10.1	10.0	10.0	100.1	4.1
3'-SL	10	9.3	10.2	10.5	9.9	10.4	10.0	10.0	100.2	4.3
6'-SL	10	9.5	10.0	10.4	10.2	10.2	9.1	9.9	99.0	5.0
DFL	5	4.8	4.9	4.6	4.6	4.6	4.9	4.7	94.5	3.2
LNnT	5	5.1	4.9	5.2	5.1	5.0	4.6	5.0	100.3	4.2
LNT	5	5.0	5.1	5.2	5.2	5.0	4.7	5.0	100.7	4.0
LNFP I	10	10.0	9.8	9.8	9.3	10.3	9.7	9.8	98.3	3.3
Lab 3										
目标物	液体试样（牛乳）									
	添加量 mg/100g	1	2	3	4	5	6	平均值	准确度%	精密度% RSD
2'-FL	1	1.0	1.0	0.95	0.94	1.0	0.95	1.0	97.0	1.0
3-FL	1	1.0	0.92	1.0	0.94	1.0	1.0	1.0	96.2	1.0
3'-SL	1	0.93	0.94	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	96.7	1.0
6'-SL	1	1.0	1.0	1.0	0.95	1.0	1.0	1.0	100.4	1.0
DFL	0.5	0.49	0.48	0.51	0.52	0.52	0.47	0.50	99.6	0.5

LNnT	0.5	0.49	0.49	0.48	0.52	0.50	0.50	0.50	99.6	0.5
LNT	0.5	0.48	0.53	0.48	0.52	0.51	0.48	0.50	100.2	0.5
LNFP I	1	1.0	0.92	1.0	0.93	1.0	1.0	1.0	96.0	1.0
目标物	固体试样（婴儿配方乳粉）									
	添加量 mg/100g	1	2	3	4	5	6	平均值	准确度%	精密度% RSD
2'-FL	10	9.2	9.2	10.0	9.5	9.3	10.1	9.6	95.7	4.2
3-FL	10	9.5	9.6	10.0	9.8	10.3	10.3	9.9	98.9	3.4
3'-SL	10	9.6	9.2	9.2	10.0	9.2	10.2	9.6	95.9	4.6
6'-SL	10	9.3	10.4	10.4	10.3	9.3	9.2	9.8	98.0	6.2
DFL	5	5.0	4.7	5.0	4.8	5.2	5.2	5.0	99.5	3.9
LNnT	5	5.1	4.8	4.8	4.9	4.8	5.0	4.9	97.8	2.2
LNT	5	4.8	5.1	4.8	5.0	4.9	4.7	4.9	97.7	3.5
LNFP I	10	10.5	10.5	9.4	9.7	9.5	10.2	10.0	99.6	4.9

（二）技术经济论证、预期的经济效益、社会效益和生态效益

本文件为检测方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文的八项要求之一。本文件填补了乳及乳制品中乳寡糖检测标准的空白，为乳寡糖的检测提供了技术支撑，符合我国奶业行业发展及农产品质量安全和监管的需要。文本在结构上严谨合理，内容编排、层次划分符合逻辑，参数设置及实验方法合理，适合在国内不同层次的检测机构中推广。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与

测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

经查，国外没有关于乳及乳制品中乳寡糖的检测相关标准，本文件不存在数据及技术比对问题。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因。

经查，国外没有关于乳及乳制品中乳寡糖的检测相关标准，本文件不存在采标问题。

六、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

在制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，严格执行强制性国家标准、行业标准和团体标准，与相关的各种基础标准相衔接，遵循政策性和协调统一性的原则。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本文件在制定过程中不存在重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

经查，未识别到与本文件技术内容有关的专利。

九、实施行业标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

本文件为农业行业标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性标准要求，因此建议将其作为推荐性行业标准颁布实施。组织标准学习，加大对标准的宣传及贯彻力度，建议农业行政主管部门采用本文件对乳及乳制

品中乳寡糖含量的测定方法进行指导。

十、其他应予说明的事项

本文件没有说明的其他事项。

附件 1

预审会议审查意见汇总处理表

标准名称：乳及乳制品中乳寡糖的测定 液相色谱-质谱法

共 3 页

标准项目承担单位：XXXX 等

2024 年 11 月 21 日填写

序号	标准章 条编号	意见内容	提出单位	处理意见	备注
1	标准名 称	建议修改为“乳及乳制品中8种乳寡糖的测定 液相色谱-串联质谱法”。	专家组	采纳	
2	1	增加检出限和定量限，具体内容见附录 A。	专家组	采纳	
3	3	删除“3.1”术语和定义。	专家组	采纳	
4	4	试样用水溶解改为“试样用水溶解或稀释”，低聚糖改为“乳寡糖”。	专家组	采纳	

5	5.7	全文删除“HMOs”。 删除“纯度均>95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质，若标准品以盐形式存在，则应根据分子量做折算”。	专家组	采纳	
6	5.10	删除“冻融次数不宜超过3次”。	专家组	采纳	
7	5.11	删除“5.11 离心管”。	专家组	采纳	
8	6.2	增加“0.01 mg”。	专家组	采纳	
9	8.1	增加涡旋时间“30s”。	专家组	采纳	
10	8.2	表述修改为“将8.1中的试液，室温条件下6 000 r/min离心20 min，吸取上清液至洁净的超滤管（5.11）中。向原离心管中加入200 μL水，涡旋30 S，室温条件下6 000 r/min离心20 min，上清液合并至超滤管（5.11）中，再重复提取1次。超滤管于3 000 r/min离心20 min。再加入400 μL水，3 000 r/min离心20 min，滤液待还原”。	专家组	采纳	
11	9.1	表1“时间列保留小数点后1位”。	专家组	采纳	

12	9.3	增加“测定前，色谱柱应平衡 24 h 以上”。	专家组	采纳	
13	10	解释公式中 100 和 1000 含义；将 HMOs 改为“待测物”，全文表述统一；增加“平行测定结果以算术平均值表示”。	专家组	采纳	
14	11	建议将精密度调整为 15%。	专家组	采纳	
15	附录	标准品名称、英文名称、缩写、CAS 号、分子式、纯度等内容作为附录给出。	专家组	采纳	
16	标准文本	按 GB/T 1.1 和 GB/T 20001.4 的要求进一步规范。	专家组	采纳	
17	编制说明	补充完善基质效应实验数据；定量限浓度添加回收率试验数据；实验室间比对验证报告补充定量限浓度验证数据。	专家组	采纳	

注:提出单位为专家组。

