

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—XXXX

乳及乳制品中 8 种乳寡糖的测定 液相色谱-
串联质谱法

Determination of 8 MOs in milk and milk product

—Liquid chromatography- tandem mass spectrometry

(公开征求意见稿)

(本稿完成日期: 2024.12)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

前 言

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会（SAC/TC 274）归口。

本文件起草单位：XXXX、XXXX、XXXX、XXXX、XXXX、XXXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX、XXX。

乳及乳制品中 8 种乳寡糖的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了乳及乳制品中8种乳寡糖的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于生乳、巴氏杀菌乳、高温杀菌乳、灭菌乳、乳粉、婴幼儿配方乳粉中2'-岩藻糖基乳糖（2'-FL）、3-岩藻糖基乳糖（3-FL）、3'-唾液酸基乳糖（3'-SL）、6'-唾液酸基乳糖（6'-SL）、乳糖二岩藻糖基四糖（DFL）、乳糖-N-新四糖（LNnT）、乳糖-N-四糖（LNT）和乳糖-N-岩藻五糖 I（LNFP I）8种乳寡糖含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样用水溶解或稀释，去除脂肪和蛋白质，乳寡糖经硼氢化钠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，用液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 硼氢化钠溶液（9.5 g/L）：称取 0.95 g 硼氢化钠，加入 80 mL 水，溶解后，用水定容至 100 mL，临用现配。

5.3 乙酸溶液（14.2 mL/L）：移取 1.42 mL 冰乙酸，用水稀释至 100 mL，混匀。

5.4 乙酸铵溶液（15.4 g/L）：准确称取 7.708 g 乙酸铵，加入 450 mL 水溶解后，用冰乙酸调节 pH 至 5.50

±0.05，用水定容至 500 mL，混匀。

5.5 流动相 A：称取 0.7708 g 乙酸铵，加入 900 mL 水溶解，用冰乙酸调 pH 至 5.50 ± 0.05 ，用水定容至 1 L，混匀。

5.6 流动相 B：准确移取 400 mL 异丙醇，加入 50 mL 乙酸铵溶液（5.4），加入 550 mL 乙腈，混匀。

5.7 标准品：8 种乳寡糖标准品中文名称、英文名称、CAS 号和纯度要求见附录 A。

5.8 2'-FL、3-FL、LNnT、LNT、LNFP I 标准储备溶液（2 mg/mL）：准确称取 10 mg（精确至 0.01 mg）2'-FL、3-FL、LNnT、LNT、LNFP I 标准品，分别用水溶解并定容至 5 mL，配制为浓度 2 mg/mL 储备液。-20 °C 以下保存，有效期 1 年。

5.9 3'-SL、6'-SL、DFL 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取 5 mg（精确至 0.01 mg）3'-SL、6'-SL、DFL 标准品，分别用水溶解并定容至 5 mL，配制为浓度 1 mg/mL。-18 °C 以下保存，有效期 1 年。

5.10 混合标准系列溶液：分别准确移取 50 μ L、100 μ L、200 μ L、400 μ L、800 μ L 的标准储备液（5.8，5.9），用水定容至 10 mL，配制成 2'-FL、3-FL、LNT、LNnT、LNFP I 质量浓度为 10 μ g/mL，20 μ g/mL，40 μ g/mL，80 μ g/mL，160 μ g/mL，DFL、3'-SL、6'-SL 质量浓度为 5 μ g/mL，10 μ g/mL，20 μ g/mL，40 μ g/mL，80 μ g/mL 的标准溶液。2 °C ~ 8 °C，有效期 1 周，-18 °C 以下，有效期 1 年。

5.11 超滤管：截留分子量为 10 kDa。

5.12 微孔滤膜：水相，0.22 μ m。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱联用仪：配有电喷雾负离子源（ESI）。

6.2 天平：精度为 0.01 g、0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 离心机：转速不低于 6000 r/min。

6.4 涡旋混匀器。

7 样品

7.1 液体样品：生乳、巴氏杀菌乳、高温杀菌乳和灭菌乳均取有代表性样品约 200 g，混匀，装入洁净容器，密封并做好标识，0 °C ~ 4 °C 保存。

7.2 固体样品：乳粉和婴幼儿配方乳粉均取有代表性样品约200 g，混匀，装入洁净容器，密封并做好标识，常温保存。

8 试验步骤

8.1 试液的制备

8.1.1 液体样品

平行做 2 份试验。称取试样约 0.1g（精确至 0.1 mg）（ m_4 ）至 2 mL 离心管中。加入 100 μ L 水，涡旋 30s。

8.1.2 固体样品

平行做 2 份试验。称取试样约 10 g（精确至 0.01 g）（ m_1 ），至 200 mL 干燥玻璃瓶中，加入约 100 mL 40°C~45°C温水，充分混匀后，冷却至室温，记录加水后的溶液质量（精确至 0.01 g）（ m_2 ）。称量制备后的溶液约 0.1g（精确至 0.1 mg）（ m_3 ）至 2 mL 离心管中。加入 100 μ L 水，涡旋 30 S。

8.2 提取

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 μ L 水，涡旋 30s，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 μ L 水，3 000 r/min 离心 20 min，滤液待还原。

8.3 还原

8.3.1 试样滤液还原

将滤液（8.2）全部转移至 5 mL 离心管内，加入 500 μ L 硼氢化钠溶液（5.2），旋涡振荡 30 s，室温反应 30 min，每隔 5 min 振摇 20 次。缓慢加入 500 μ L 乙酸溶液（5.3），室温下放置 20 min，每隔 5 min 振摇 20 次至不再产生气泡为止。转移所有溶液至 5 mL 容量瓶中，用水定容。过膜（5.12），待测。

8.3.2 混合标准系列溶液还原

准确移取混合标准系列溶液（5.10）各 100 μ L 于 5 mL 离心管中，其余按照 8.3.1 操作，还原后浓度见附录 B。

9 测定

9.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 液相色谱柱：多孔石墨化碳色谱柱，柱长150 mm，柱内径4.6 mm，填料粒径5 μm ，或相当者。
- b) 流速：0.5 mL/min；
- c) 进样量：10 μL ；
- d) 柱温：50°C；
- e) 梯度洗脱条件见表1。

表 1 梯度洗脱条件

序号	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
1	0.0	95	5
2	12.0	87	13
3	14.0	0	100
4	18.0	0	100
5	19.0	95	5
6	30.0	95	5

9.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离，负离子模式ESI-；
- b) 锥孔气流量：150 L/h；
- c) 喷雾电压：2 kV；
- d) 脱溶剂气温度：500°C；
- e) 脱溶剂气流量：1000 L/h；
- f) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- g) 定性/定量离子对、锥孔电压、碰撞能量见表2。

表 2 多反应监测（MRM）条件

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

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

9.3 混合标准系列工作溶液和试样溶液测定

测定前，色谱柱应平衡24 h以上，在仪器最佳条件下，分别取10 μL混合标准系列工作溶液（8.3.2）和试样溶液（8.3.1）上机测定。标准溶液的定量离子色谱图见附录C。

9.4 定性测定

在相同试验条件下，试样溶液与目标化合物混合标准系列工作溶液中待测物的保留时间相对偏差应在 ±2.5%之内。根据表 2 选择的定性离子对，比较试样谱图中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准系列工作溶液中对应的定性离子的相对离子丰度，若偏差不超过表 3 规定，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 定性确定相对离子丰度的允许偏差单位为百分号%

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

9.5 定量测定

以还原后混合标准系列溶液中待测物的浓度为横坐标，定量离子的色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液中待测物的响应值应在标准曲线线性范围内，若超出线性范围，应将试样溶液用水稀释后重新测定。

10 试验数据处理

液体试样中待测物的含量以 ω_i 计，数值以毫克每百克（mg/100 g）表示，按式（1）计算：

$$\omega_i = \frac{c_i \times V}{m_4} \times \frac{100}{1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

c_i —由校准曲线（9.3）得到样品浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V —样品定容体积，单位为毫升（ mL ）；

100—换算系数；

m_4 —试样质量，单位为克（ g ）；

1000—换算系数。

固体试样中待测物的含量以 ω_i 计，数值以毫克每百克（ $\text{mg}/100\text{g}$ ）表示，按式（2）计算：

$$\omega_i = \frac{c_i \times V}{m_3 \times m_1 / m_2} \times \frac{100}{1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

c_i —由校准曲线（9.3）得到样品浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V —样品定容体积，单位为毫升（ mL ）；

100—换算系数；

m_1 —试样质量，单位为克（ g ）；

m_2 —溶液质量，单位为克（ g ）；

m_3 —取样量，单位为克（ g ）；

1000—换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示。

试样中待测物含量 $\geq 10\text{ mg}/100\text{g}$ 时，计算结果保留3位有效数字；当含量 $< 10\text{ mg}/100\text{g}$ 时，计算结果保留2位有效数字。

11 精密度

在重复性条件下，两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的15%。

12 其他

本文件液体试样中，8种乳寡糖的检出限（LOD）与定量限（LOQ）见表4。

表4 液体试样中8种HMOs的检出限与定量限

序号	名称	检出限 (mg/100g)	定量限 (mg/100g)
1	2'-FL	0.3	1.0
2	3-FL	0.3	1.0
3	3'-SL	0.3	1.0

4	6'-SL	0.3	1.0
5	DFL	0.15	0.5
6	LNnT	0.15	0.5
7	LNT	0.15	0.5
8	LNFP I	0.3	1.0

本文件固体试样中，8种乳寡糖的检出限（LOD）与定量限（LOQ）见表5。

表5 固体试样中8种HMOs的检出限与定量限

序号	名称	检出限 (mg/100g)	定量限 (mg/100g)
1	2'-FL	3.0	10.0
2	3-FL	3.0	10.0
3	3'-SL	3.0	10.0
4	6'-SL	3.0	10.0
5	DFL	1.5	5.0
6	LNnT	1.5	5.0
7	LNT	1.5	5.0
8	LNFP I	3.0	10.0

附录A
(规范性)

标准品中文名称、英文名称、CAS号、分子式和纯度要求

标准品中文名称、英文名称、CAS号、分子式和纯度要求见表A.1。

表A.1标准品中文名称、英文名称、CAS号、分子式和纯度要求

序号	中文名称	英文名称	简称	CAS号	分子式	纯度
1	2'-岩藻糖基乳糖	2'-fucosyllactose,	2'-FL	41263-94-9	$C_{18}H_{32}O_{15}$	$\geq 95\%$
2	3'-岩藻糖基乳糖	3-fucosyllactose	3-FL	41312-47-4	$C_{18}H_{32}O_{15}$	$\geq 95\%$
3	3'-唾液酸基乳糖	3'-sialyllactose	3'-SL	35890-38-1	$C_{23}H_{39}NO_{19}$	$\geq 95\%$
4	6'-唾液酸基乳糖	6'-Sialyllactose	6'-SL	35890-39-2	$C_{23}H_{39}NO_{19}$	$\geq 95\%$
5	乳糖二岩藻糖基四糖	difucosyllactose	DFL	20768-11-0	$C_{24}H_{42}O_{19}$	$\geq 95\%$
6	乳糖-N-新四糖	Lacto-N-neotetraose	LNnT	13007-32-4	$C_{26}H_{45}NO_{21}$	$\geq 95\%$
7	乳糖-N-四糖	Lacto-N-tetraose	LNT	14116-68-8	$C_{26}H_{45}NO_{21}$	$\geq 95\%$
8	乳糖-N-岩藻五糖 I	Lacto-N-fucopentaose I	LNFP I	7578-25-8	$C_{32}H_{55}NO_{25}$	$\geq 95\%$

附录B
(规范性)

还原标准溶液浓度的计算

还原后混合标准系列溶液中8种乳寡糖浓度以 c_1 计，数值以微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)表示，按式(B.1)计算：

$$c_1 = c_2 \times \frac{V_1}{V_2} \dots\dots\dots \text{(B.1)}$$

式中：

c_2 —混合标准系列溶液中各乳寡糖浓度(5.10)，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；

V_1 —混合标准系列溶液取样体积，单位为毫升(mL)；

V_2 —定容体积，单位为毫升(mL)。

还原后混合标准系列溶液中8种乳寡糖浓度表B.1。

表 B.1 还原后混合标准系列溶液中 8 种乳寡糖浓度

单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)

浓度水平	名称							
	2'-FL	3-FL	LNT	LNnT	LNFP1	DFL	3'-SL	6'-SL
系列1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
系列2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2
系列3	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.4	0.4	0.4
系列4	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8	0.8	0.8
系列5	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	1.6	1.6	1.6

附录 C
(资料性)

8种乳寡糖液相色谱-串联质谱定量离子色谱图

8 种乳寡糖液相色谱-串联质谱定量离子色谱图见图 C.1。

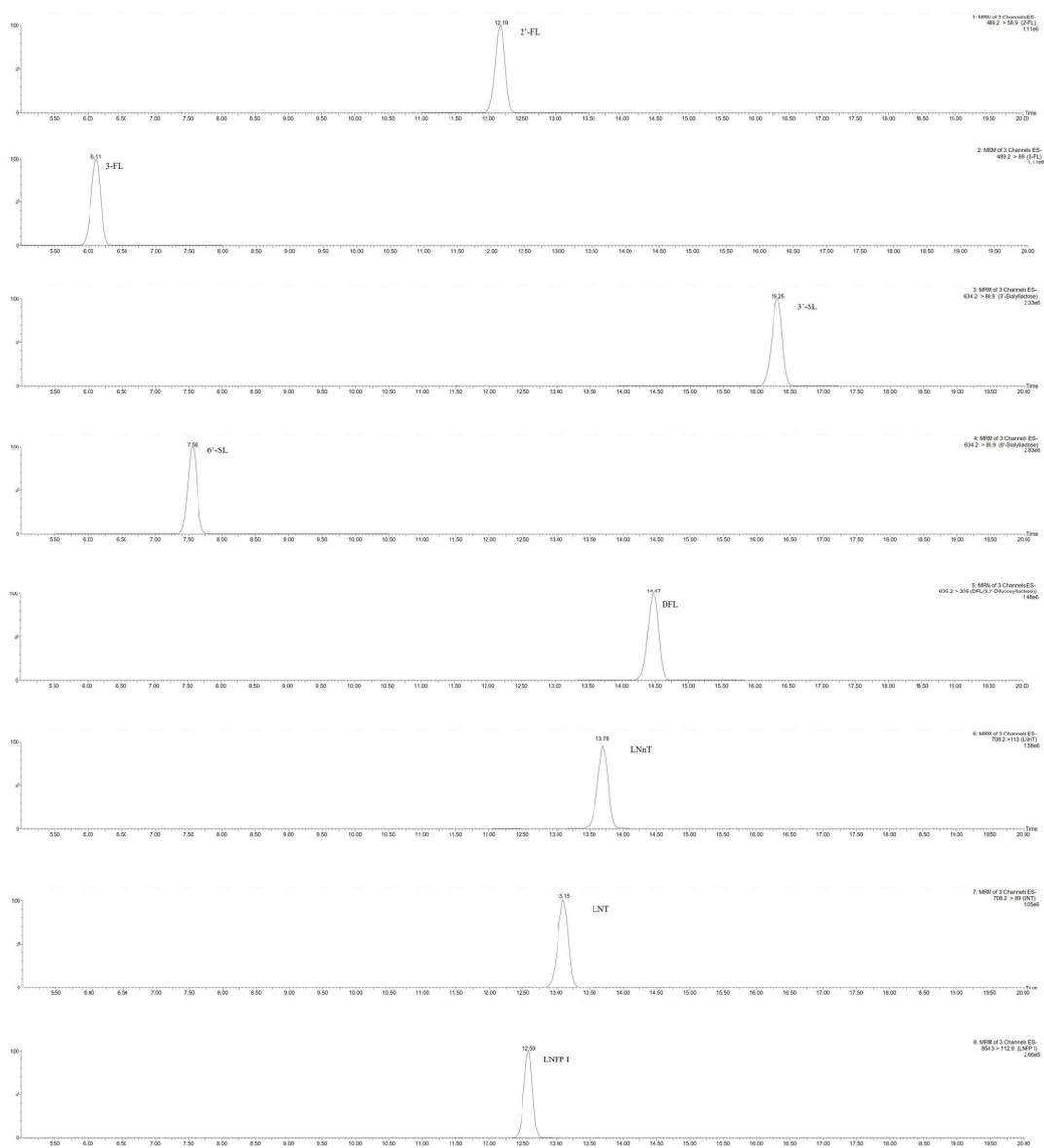


图 C.1 8种乳寡糖液相色谱-串联质谱定量离子色谱图（还原后0.8 μg/mL）