

LC-MS/MS法测定母乳中的6种人乳寡糖

Determination of Six Human Milk Oligosaccharides (HMOs) in Human Milk by LC-MS/MS

冷向阳, 钟晨春, 龙志敏, 郭立海

Xiangyang Leng, Chenchun Zhong, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX应用支持中心, 中国

Key Words: HMOs、Human Milk、SCIEX Triple Quad™ System

引言

母乳是公认的新生儿最佳的营养来源, 其成分中含有丰富的乳糖、脂肪和母乳低聚糖 (Human milk oligosaccharides, HMOs) 等。与其他哺乳动物乳汁相比, 人乳中HMOs种类、含量丰富, 其多样性和高含量也赋予了其一些特殊的生物学功能, 对婴幼儿生长发育起着至关重要的作用, 如它可以调节肠道菌群环境, 促进有益菌群的生长; 作为抗黏附抗菌剂, 阻碍病菌与人体肠道黏膜细胞的结合; 调节免疫系统, 促进大脑发育等^[1]。

HMOs由葡萄糖 (Glucose, Glc), 半乳糖 (Galactose, Gal), N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetylglucosamine, GlcNAc), 岩藻糖 (Fucose, Fuc) 和 N-乙酰神经氨酸 (N-Acetylneuraminic acid, NeuAc, 唾液酸) 这五个单糖单元组成, 目前已知的HMOs有超过200多种, 正是由于其结构的复杂多样性, 使得对HMOs分离分析造成一定的挑战, 明确 HMOs 在母乳中的含量及其影响因素具有非常重要的意义^[2]。

本文建立了一种母乳中6种人乳寡糖 (2'-FL, 3-FL, 3'-SL, 6'-SL, LNT, DSLNT) 的快速检测方案, 方法的定量下限可低至为0.067-2 ng/ml, 仪器灵敏度高, 重现性好, 可以很好的满足母乳中人乳寡糖的测定要求。

本实验方法特点:

1. 使用三重四极杆质谱 (SCIEX Triple Quad™ 4500系统) 测定6种人乳寡糖, 具有较好的色谱保留, 同时其中异构体也能实现较好分离, 见图1。

2. 本方法灵敏度低至0.067-2 ng/ml, 重现性好, 很好的满足母乳中人乳寡糖的检测需求。

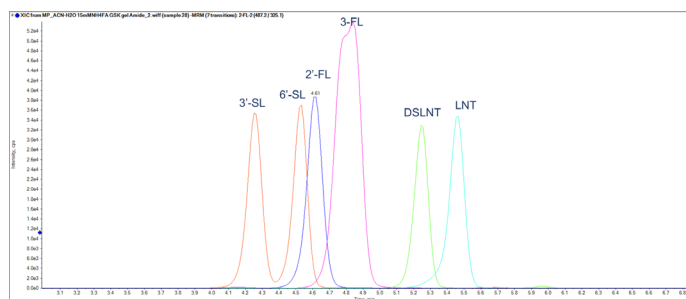


图1. 六种人乳寡糖的典型色谱图

仪器设备

Exion LC™ AD 系统 + SCIEX Triple Quad™ 4500 系统



液相方法

色谱柱：TSK Gel Amide-80 150×2 mm, 3.0 μm

流动相：A相：水（含15mM甲酸铵）

B相：乙腈

流速：0.4 ml/min

柱温：40℃；

流动相梯度：

-	A (%)	B (%)
0.00	25	75
1.00	25	75
7.00	55	45
8.00	55	45
8.10	25	75
10.00	25	75

质谱方法

离子源：ESI源，负离子模式

离子源参数：

电喷雾电压IS: -4500 V

气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GS1: 60 psi

辅助加热气GS2:60 psi

碰撞气 CAD: 8

源温度 TEM: 450℃

表1. 六种人乳寡糖的质谱参数

化合物名称	Adduct	Q1 Mass	Q3 Mass	DP	CE
2'-FL	[M-H] ⁻	487.2	325.1	-85	-15
3-FL	[M+FA-H] ⁻	533.1	179.0	-15	-22
3'-SL	[M-H] ⁻	632.1	290.0	-10	-40
6'-SL	[M-H] ⁻	632.1	290.0	-10	-40
LNT	[M-H] ⁻	706.2	201.9	-5	-30
DSLNT	[M-H] ⁻	644.0	290.0	-100	-39

母乳样品前处理：

取乳汁样品室温水浴解冻，涡旋后，取200 μL样品，于4℃下10000 rpm离心6 min，去除脂层。取去除脂层样品10 μL，加入140 μL水，涡旋混匀后，加入300 μL乙醇，涡旋1 min，于4℃下10000 rpm离心6 min，取上清20 μL，加入180 μL 50%乙腈-水溶液，混匀后进样分析

实验结果

1. 灵敏度和重复性：六种人乳寡糖的最低定量下限为0.067-2 ng/ml，典型色谱图见图2；六种化合物连续进样六针RSD%小于5%。

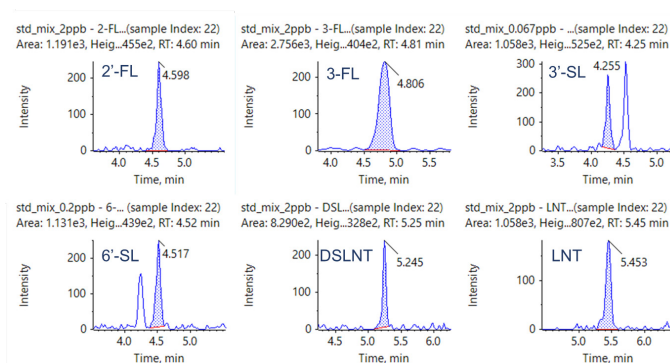


图2. 六种人乳寡糖最低定量限色谱图

表2. 六种化合物的定量下限、线性范围及重现性

	LLOQ(定量下限)	线性范围	重现性 (RSD%)
2'-FL	2 ng/ml	2-2000 ng/ml	1.64
3-FL	2 ng/ml	2-2000 ng/ml	2.14
3'-SL	0.067 ng/ml	0.067-66.67 ng/ml	3.58
6'-SL	0.2 ng/ml	0.2-200 ng/ml	3.19
DSLNT	2 ng/ml	2-2000 ng/ml	4.81
LNT	2 ng/ml	2-2000 ng/ml	2.62

2. 线性范围：六种人乳寡糖在线性范围内线性关系良好，相关系数大于0.995，标曲各点准确度在90%-110%之间。

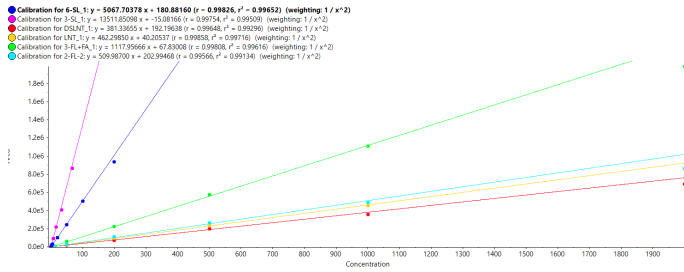


图3.六种人乳寡糖的标准曲线图

3. 样品检测及加标回收率：乳汁样品处理后稀释100倍结果，见图3。取乳汁样品配制成浓度分别为5 ng/mL和20 ng/mL的加标样品，两个不同浓度样品的回收率分别在91.8-102.7%和97.1-100.4%之间。

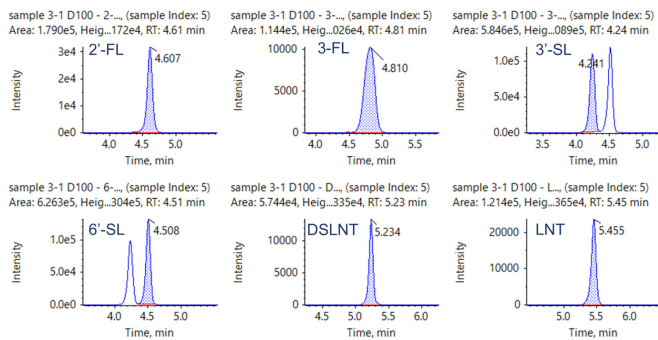


图4.实际乳汁样品检测结果图

表3. 加标回收率测试结果

名称	平均加标回收率 (%)	
	添加 5ng/ml	添加 20 ng/ml
2'-FL	102.7	100.2
3-FL	98.8	100.2
3'-SL	98.4	97.2
6'-SL	99.0	98.1
DSLNT	91.8	100.4
LNT	98.8	99.9

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 4500 系统建立了乳汁中六种人乳寡糖的LC-MS/MS方法。结果表明，本方法灵敏度高、重现性好，其中异构体也能实现较好分离，能够满足母乳中人乳寡糖的检测需求。

参考文献

- [1] 李晨晨, 李梦丽, 张涛. 人乳寡糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(9): 284-292
- [2] 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

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15625-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)