

高效液相色谱-串联质谱法测定母乳中的 N-乙酰神经氨酸

李秀英¹, 黄伟乾¹, 黄荣荣¹, 周海练¹, 陆晓雁², 周之荣^{3*}

(1. 广州质量监督检测研究院, 广州 511447; 2. 江西卫生职业学院, 南昌 330201;
3. 广东药学院公共卫生学院卫生检验与卫生化学系, 广州 510310)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法测定母乳中 N-乙酰神经氨酸的分析方法。**方法** 用盐酸对样品进行酸水解释放出母乳中的结合态 N-乙酰神经氨酸, 高速离心后, 采用 C₁₈ 柱进行分离。以 0.1% 甲酸-乙腈溶液和 0.1% 甲酸-水溶液作为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾质谱检测, 正离子多反应监测模式(MRM) 进行定性和定量分析。**结果** 在优化的条件下, N-乙酰神经氨酸在 0.01~0.5 mg/L 范围线性关系良好($r=0.9997$)。以 10、50、100 mg/kg 3 个添加水平进行加标回收试验, N-乙酰神经氨酸的平均回收率为 95.0%~98.7%, 相对标准偏差为 11.6%~14.5%, N-乙酰神经氨酸的检出限为 0.21 $\mu\text{g/kg}$ 。**结论** 该方法简单、快速、重复性好、灵敏度高, 可广泛用于母乳中 N-乙酰神经氨酸的测定。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; N-乙酰神经氨酸; 母乳

Determination of N-acetylneuraminic acid in breast milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Xiu-Ying¹, HUANG Wei-Qian¹, HUANG Rong-Rong¹, ZHOU Hai-Lian¹,
LU Xiao-Yan², ZHOU Zhi-Rong^{3*}

(1. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China; 2. Jiangxi Health Vocational College, Nanchang 330201, China; 3. Department of Sanitary Analysis and Sanitary Chemistry, School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for the determination of sialic acid (N-acetylneuraminic acid, NANA) in breast milk by high performance liquid-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The NANA was released through the hydrolysis of samples by hydrochloric acid, and purified by the high-speed centrifugation. The HPLC separation process was performed on a C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) utilizing a gradient elution program of acetonitrile (containing 0.1% formic acid) and water (containing 0.1% formic acid) as the mobile phases. The identification and quantification were achieved by using electrospray ionization (ESI)-MS/MS in positive ion mode and multiple reactions monitoring (MRM) mode. **Result** The results showed that the NANA had a good linear relationship in the range of 0.01~0.5 mg/L ($r=0.9997$). The average recoveries spiked at the 3 concentration levels of 10, 50, 100 mg/kg were in the range of 95.0%~98.7% with the relative standard deviations from 11.6% to 14.5%. The method was sensitive with the detection limit ($S/N=3$) of 0.21 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** The established method has the characteristics of simple operation, rapidity, high reproducibility and sensitivity, and can be widely applied to the

*通讯作者: 周之荣, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为分析化学。E-mail: zhouzhirong1965@sina.com

*Corresponding author: ZHOU Zhi-Rong, Professor, School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, No.40, Baogang Guanghang Road, Guangzhou 510310, China. E-mail: zhouzhirong1965@sina.com

quantitative determination of NANA in breast milk.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; N-acetylneuraminic acid; breast milk

1 引言

N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, NANA, 图1)是唾液酸在自然界分布最广泛的种类, 它的含量占整个唾液酸家族的99%以上, 通常所说的唾液酸多是指NANA, 除少数以游离状态存在外, 绝大部分以结合形式存在于糖蛋白、糖脂分子和一些寡糖中, 参与细胞的多种重要生理功能^[1]。

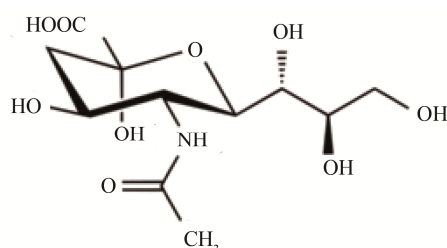


图1 N-乙酰神经氨酸的结构

Fig. 1 Structure of NANA

母乳中的唾液酸绝大多数是N-乙酰神经氨酸, 研究证明母乳中的唾液酸具有一定的抗菌能力^[2], 也有研究发现外源性唾液酸有助于婴儿期的大脑发育和学习记忆能力的提高^[3,4]。母乳中尤其是初乳唾液酸水平和婴儿早期智能发育密切相关, 提高唾液酸摄入量有益于婴儿早期发育^[7]。而牛乳和婴儿配方乳粉中N-乙酰神经氨酸含量都很低^[5,6]。现在有的市售的配方奶粉已将N-乙酰神经氨酸作为奶粉优化的一个参数, 使其更接近母乳的自然标准。因此, 需要找到一种简单可靠方法来测定母乳中N-乙酰神经氨酸含量, 为婴幼儿配方奶粉的生产提供参考。

目前报道的检测唾液酸的基质主要是燕窝、奶粉、牛奶、人血清等样品, 而对于母乳中唾液酸的检测鲜有报道。检测方法主要有分光光度法^[7]、高效液相色谱法^[8]、气相色谱法^[9]、毛细管区带电泳法^[10]、液质联用法^[11-14]等。分光光度法操作简单, 但方法较费时且灵敏度欠佳, 不适用于微量生物样本的测定; 唾液酸的紫外吸收十分微弱, 在采用高效液相色谱法和气相色谱法进行检测时, 需要衍生处理, 费时费力, 而且残留的衍生试剂对测定结果也存在一定的影响; 毛细管区带电泳法较简单, 但检出限较高。液质联用法结合色谱的强分离能力和质谱的高分辨力, 可以在短时间内分析含量低、组分复杂的样品, 已成为一种常见的复杂食品基质的分析手段^[15]。本研究采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)对母乳中的N-乙酰神

经氨酸含量进行定量测定, 方法简单、快速、重复性好、灵敏度高。该方法仅开展了人乳中N-乙酰神经氨酸的检测, 可为乳品(牛乳、羊乳及相关乳制品)中N-乙酰神经氨酸含量的测定提供一定的参考。

2 材料与方法

2.1 仪器

1200 高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Agilent 公司)、4000 QTRAP 串联质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); SW22 恒温振荡水浴仪(德国 Julabo 公司); ME2002, MS204S 电子天平(瑞士梅特勒公司); 3K15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); TurboVap LV 浓缩仪(美国 Caliper 公司); MS3 IKA 涡旋振荡仪(德国 IKA 公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

2.2 材料与试剂

NANA 标准品(纯度 99%, CAS 号: 131-48-6, 美国 Sigma 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 盐酸、氢氧化钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为超纯水(18.2 MΩ/cm)。

NANA 标准储备液的制备: 称取 NANA 标准品 0.0100 g 于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈-水(8:2, V:V)定容至刻度, 得到 1000 mg/L 的 NANA 标准储备液, 4 °C 储存备用。

NANA 标准工作液: 根据需要吸取适量的 NANA 标准储备液, 用空白试样提取液逐级稀释成浓度依次为 0.01、0.025、0.05、0.1、0.25 和 0.50 mg/L 系列基质标准工作液, 当天配制, 在 4 °C 下储存备用。

母乳样品采集于不同哺乳期的哺乳妈妈。

2.3 HPLC-MS/MS 条件

2.3.1 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司); 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL; 流动相 A: 0.1%(V:V)甲酸-乙腈, 流动相 B: 0.1%(V:V)甲酸-水溶液, 梯度洗脱程序: 0~3 min: 20%A; 3~5 min: 20%A~80%A; 5~11 min: 80%A~20%A; 流速: 600 μL/min。

2.3.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子(ESI⁺)扫描; 检测模式: 多反应监测(MRM); 电喷雾电压: 5500 V; 离子源温度: 400 °C; 气帘气、雾化气、辅助加热气、碰撞气等在使用前调节各流量使质谱灵敏度达到检测要求; 去簇电压、碰撞电压应优化至最优灵敏度。NANA 标准溶液的质谱参数见表 1。

2.4 样品制备

准确称取液体母乳样品 1.0 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中, 加入 0.1%(V:V)盐酸溶液 10 mL, 涡旋混匀, 置于 80 ℃水浴中振荡水解 1 h, 水解完成取出冷却至室温, 用 20%(m:V)氢氧化钾调节 pH 至 5~7, 用超纯水将样液定容至 50 mL。取 1 mL 样液于高速离心管中, 15000 r/min 离心 2 min, 取上清液过孔径为 0.22 μm 有机滤膜, 滤液供 HPLC-MS/MS 测定。若样品含量超出标准曲线范围, 应适当稀释。

3 结果与讨论

3.1 质谱分析条件的选择及参数的优化

取 NANA 的标准溶液(1.0 mg/L)通过蠕动泵以 5 μL/min

的速度持续进样到质谱仪分别在 ESI⁻与 ESI⁺条件下对唾液酸质谱分析条件进行了优化: 对母离子进行全扫描, 得到不同离子源下 NANA 的母离子棒状图。结果表明: NANA 在 ESI⁺条件下母离子棒状图的丰度远比在 ESI⁻条件下高, 因此本试验选用 ESI⁺方式电离, 即选择正离子模式对 NANA 的质谱参数进行优化。

NANA 在正离子模式下形成[M+H]⁺分子离子峰, 确定其准分子离子(*m/z* 310.2)为母离子, 进一步对其子离子进行全扫描, 选择响应较强(丰度较高)的 3 个特征碎片离子(*m/z* 274.2、*m/z* 292.1 和 *m/z* 197.2)作为定性、定量特征离子。其中 *m/z* 274.2 为定量离子。NANA 在正离子模式下的二级质谱图见图 2。

表 1 NANA 标准溶液的质谱参数
Table 1 MS/MS acquisition parameters for NANA

母离子 <i>Q</i> ₁ /(<i>m/z</i>)	特征性离子 <i>Q</i> ₃ /(<i>m/z</i>)	驻留时间/ms	去簇电压/V	碰撞电压/V
310.2	274.2*	100	50.0	14.5
310.2	292.1	100	50.0	10.0
310.2	197.2	100	50.0	22.0

注: *为定量离子。

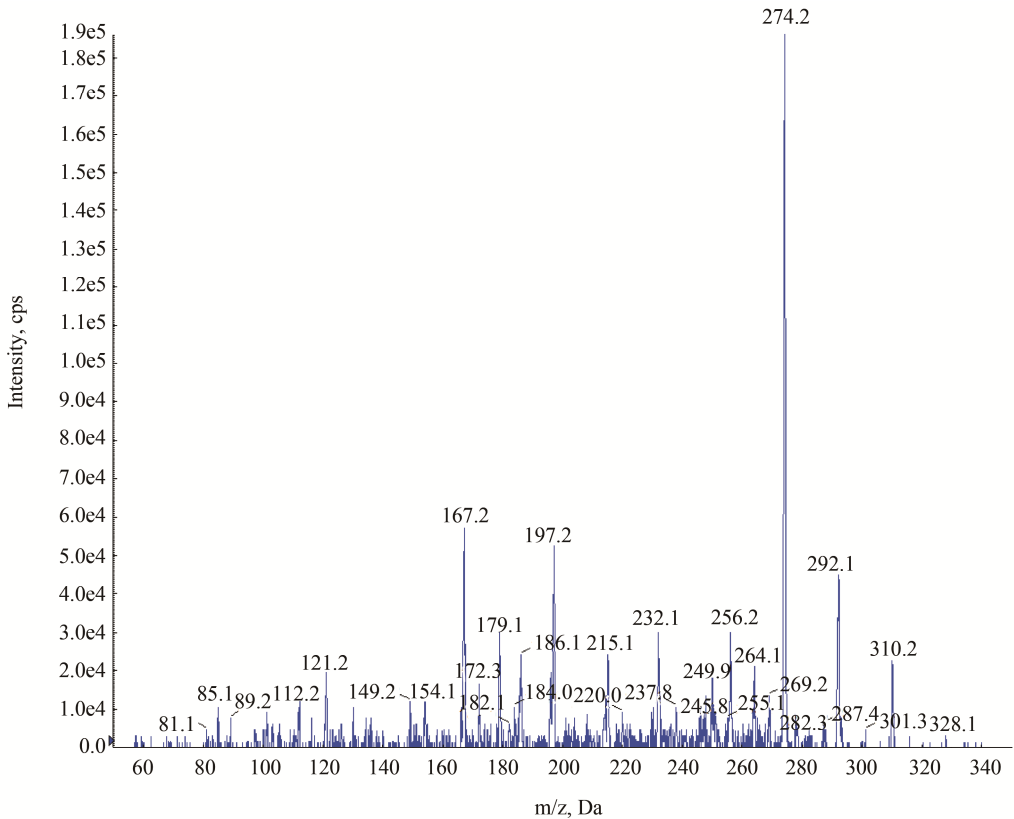


图 2 NANA 在正离子模式下的二级质谱图
Fig. 2 MS/MS spectra of NANA in ESI⁺ mode

最后以正离子多反应监测模式优化各种质谱调谐参数,得到 NANA 3 个特征碎片离子碰撞能优化的结果,其中碰撞电压分别为 14.5 V (m/z 310.2/274.2)、10 V (m/z 310.2/292.1)、22 V (m/z 310.2/197.2),最大程度地提高检测灵敏度。优化的质谱参数见表 1。

3.2 液相色谱条件优化

3.2.1 色谱柱的选择

根据 NANA 的理化性质和在色谱柱上的分配特性,实验采用 Waters Symmetry C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)进行分离。结果表明,在优化条件下,NANA 的保留时间为 3.25 min,保留时间合理,有良好的分离效果和较高的灵敏度,适于样品检测。

3.2.2 流动相的优化

NANA 是一种碳水化合物,通常以游离态或在糖蛋白或糖脂的末端以糖苷的形式存在,属于糖类。本研究采用正离子模式检测 NANA,在流动相中加入酸有利于 NANA 的离子化,提高灵敏度。实验比较了流动相为乙腈-水体系,0.1%(V:V,下同)甲酸-乙腈-0.1%甲酸-水体系,以及 0.1%甲酸-甲醇-0.1%甲酸水-体系,NANA 的响应情况。结果表明,在流动相为 0.1%甲酸-乙腈-0.1%甲酸-水体系中,NANA 的信号强,峰形较好,保留时间理想。乙腈因具有优良的溶剂性能,极性较大,可以溶解多数样品,与水无限互溶,并且可以改善色谱峰的峰形。在 0.1%甲酸-乙腈和 0.1%甲酸-水流动相体系下,对等度洗脱与梯度洗脱进行了对比,发现等度洗脱时,色谱峰拖尾,峰形不理想。故选择梯度洗脱程序。分别对比 2 种梯度洗脱对唾液酸分离效果,发现梯度洗脱时 0.1%甲酸-乙腈所占比例较大,NANA 保留时间较好,否则出峰过早。乙腈是优良的溶剂,能任意比例与水无限互溶,极性较大。最终确定了 3.2.1 中的梯度洗脱程序。采用优化的梯度对 NANA 标准溶液、母乳样品提取溶液进行检测,多反应监测色谱图分别见图 3、图 4。

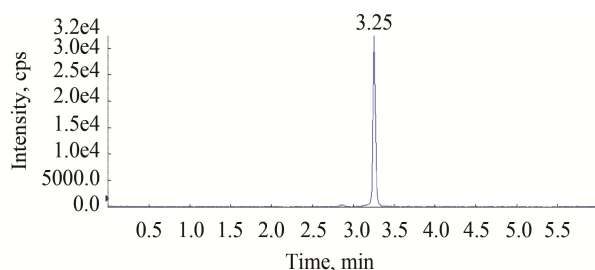


图3 NANA 标准溶液(25 ng/mL)的多反应监测色谱图

Fig. 3 MRM chromatogram of NANA standard solution (25 ng/mL)

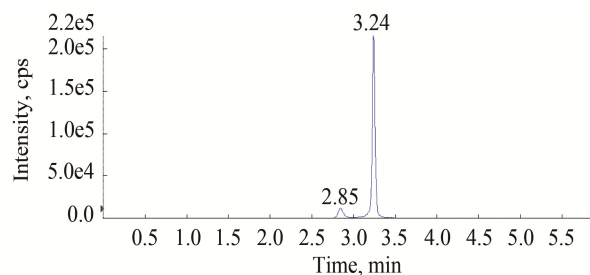


图4 母乳样品提取溶液的 MRM 色谱图

Fig. 4 MRM chromatogram of the extraction solution for breast milk sample

3.3 样品前处理的优化

一般以乳制品为样品提取 NANA 主要对其进行酸水解、离心、过滤。根据仪器要求不同,而选择固相萃取去除杂质干扰,或衍生化处理进行进一步提高方法的灵敏度。而相关报道母乳中 NANA 的含量较高,约 0.3~1.5 g/L,基于质谱抗干扰能力强的特点,本研究旨在建立一种快速的检测技术。

文献报道多采用酸水解释放结合态唾液酸,参考文献^[14,16]的条件,实验比较了 20%(V:V)三氯乙酸与 0.1%(V:V)盐酸进行水解的效果,结果表明两种酸的水解效果相当。考虑到三氯乙酸具有强腐蚀性且所需消耗的量比较大,故选用 0.1%(V:V)盐酸溶液进行酸水解。水解过程中需要注意的是要使碳水化合物受到最低程度的破坏和唾液酸得到最大程度的释放。比较了水解时间分别是 15、30、60、90 和 120 min 的影响,结果表明,80 ℃下用 0.1%(V:V)盐酸水解 60 min,能够使所有的 NANA 链断裂并使这些残基脱酰、脱羧化,能保证 NANA 的完全水解。

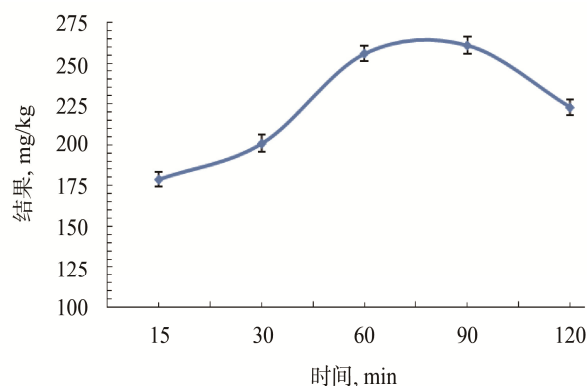


图5 水解时间对唾液酸的影响($n=3$)

Fig. 5 Effects of digestion time on the results of NANA($n=3$)

3.4 线性关系、准确度、精密度及检出限

3.4.1 线性关系

根据需要吸取适量的 NANA 标准储备液, 用空白试样提取液稀释成浓度依次为 0.01、0.025、0.05、0.1、0.25 和 0.50 mg/L 系列基质匹配标准工作液, 当天配制。上机测定, 记录峰面积。根据 NANA 的定量离子峰面积(Y)与 NANA 的质量浓度(X, ng/L)进行线性回归, 绘制基质匹配标准曲线。在 0.01~0.5 mg/L 范围内, NANA 的峰面积与含量呈良好的线性关系。线性回归方程为 $Y=2.53 \times 10^3 X + 1.81 \times 10^4$, $r=0.9997$ 。

3.4.2 准确度、精密度及检出限

取 3 份不同样品, 依次添加 NANA 浓度为 10、50、100 mg/kg, 分别对样品及加标样品平行测量 6 次, 分别

计算样品及加标样品中 NANA 的含量, 计算加标回收率, 结果如表 3 所示, 本方法在 3 个水平的加标回收率分别为 95.00%、98.67%、98.67%, RSD 分别为 14.5%、10.9%、11.6%。

在 HPLC-MS/MS 测定条件下, 对 50 ng/mL 的 NANA 标准溶液进行性噪比测试, 结果见图 6。以 3 倍信噪比值(S/N)和 10 倍信噪比值(S/N)所对应样品中待测物的浓度, 确定方法的检出限和定量限分别为 0.21 μg/kg 和 0.71 μg/kg。表明所建立的方法具有较高的灵敏度。

3.5 样品分析

取 4 个母乳样品, 每个样品取 6 份平行试样, 均按照实验方法进行前处理及测量 NANA, 以基质匹配标准曲线进行定量。结果见表 3。

表 2 母乳样品中 NANA 的加标回收率和精密度(n=6)
Table 2 Recoveries and precisions of NANA spiked in the breast milk (n=6)

样品	样品含量/(mg/kg)	加入量/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	189.0	10.0	199.0	100.0	95.0	14.5
	188.0	10.0	197.0	90.00		
	195.0	10.0	203.0	80.00		
	190.0	10.0	201.0	110.0		
	197.0	10.0	205.0	80.00		
	182.0	10.0	193.0	110.0		
2	255.0	50.0	309.0	108.0	98.7	10.9
	265.0	50.0	315.0	100.0		
	266.0	50.0	311.0	90.00		
	251.0	50.0	307.0	112.0		
	269.0	50.0	311.0	84.00		
	250.0	50.0	299.0	98.00		
3	335.0	100.0	429.0	94.00	98.7	11.6
	343.0	100.0	430.0	87.00		
	331.0	100.0	450.0	119.0		
	329.0	100.0	440.0	111.0		
	347.0	100.0	434.0	87.00		
	350.0	100.0	444.0	94.00		

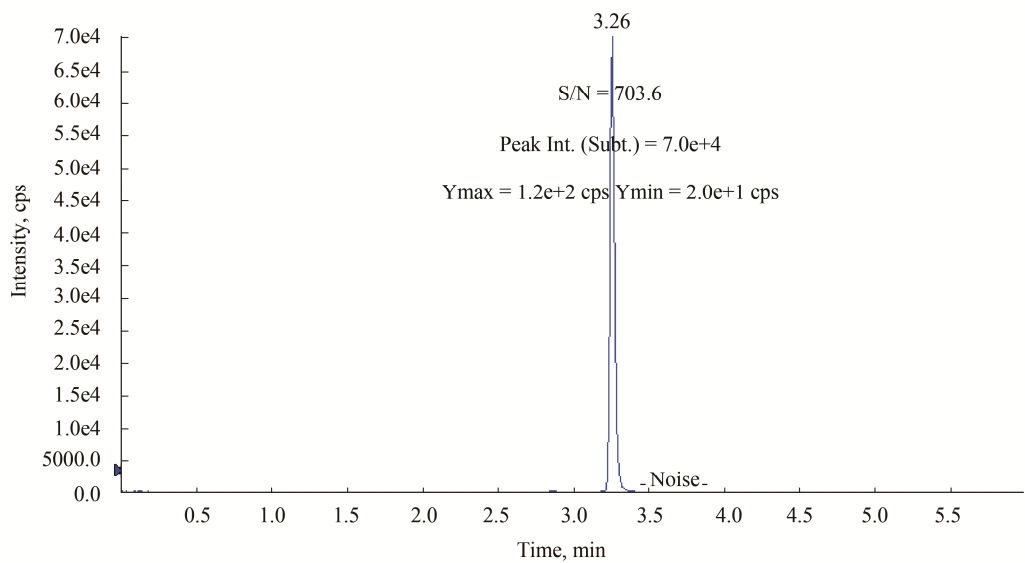


图 6 测定 NANA 标准溶液(50 ng/mL)性噪比的多反应监测色谱图

Fig. 6 MRM chromatogram of NANA (50 ng/mL) for determination the ratio of S/N

表 3 母乳样品中 NANA 的测定结果

Table 3 Analytical results for NANA in breast milk samples

样品	测定值/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	RSD/%
1	189.0 188.0 195.0 190.0 197.0 182.0	190.2	2.8
2	255.0 265.0 266.0 251.0 269.0 250.0	259.3	3.2
3	335.0 343.0 331.0 329.0 347.0 350.0	339.2	2.6
4	291.0 299.0 303.0 296.0 305.0 311.0	300.8	2.3

4 结 论

本研究建立了母乳中 N-乙酰神经氨酸的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法。样品用 0.1%(V:V)盐酸 80 ℃水解 60 min 释放出母乳中的结合态 N-乙酰神经氨酸,采用 C₁₈柱进行分离,以 0.1%甲酸-乙腈溶液和 0.1%甲酸-水溶液作为流动相进行梯度洗脱,电喷雾质谱检测,正离子多反应监测模式(MRM)进行定性和定量分析。所建立的方法操作简单,稳定性好,准确度高,可广泛用于母乳中 N-乙酰神经氨酸的测定。

参考文献

[1] Schauer R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man [J]. Zoology (Jena), 2004, 107(1): 49–64.

[2] Kunz C, Rudloff S. Potential anti-inflammatory and anti-infectious effects of human milk oligosaccharides [J]. Adv Exp Med Bio, 2008, 606: 455–465.

[3] Wang B, Brand J. The role and potential of sialic acid in human nutrition [J]. Eur J Clin Nutr, 2003, 57(11): 1351–1369.

[4] Wang B, Yu B, Karim, *et al.* Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets [J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85(2): 561–569.

[5] Wang B, Janette BM, Patricia M, *et al.* Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas [J]. Am J Clin Nutr, 2001, 74(4): 510–515.

[6] Martin SS, Martin MJ, Garcia-Pardo LA, *et al.* Sialyloligosaccharides in human and bovine milk and in infant formulas: variations with the progression of lactation [J]. J Dairy Sci, 2003, 86(1): 52–60.

[7] Neelima Rao PS, Sharma R. Direct estimation of sialic acid in milk and milk products by fluorimetry and its application in detection of sweet whey adulteration in milk [J]. J Dairy Res, 2012, 79(4): 495–501.

[8] Orozco-Solano MI, Priego CF, Luque de Castro MD. Ultrasound-assisted hydrolysis and chemical derivatization combined to lab-on-valve solid-phase extraction for the determination of sialic acids in human biofluids by μ -liquid chromatography-laser induced fluorescence [J]. Anal Chim Acta, 2013, 766: 69–76.

- [9] Reuter G, Pfeil R, Stoll S, *et al.* Identification of new sialic acids derived from glycoprotein of bovine submandibular gland [J]. *Eur J Biochem*, 1983, 134: 139–143.
- [10] Ortner K, Buchberger W. Determination of sialic acids released from glycoproteins using capillary zone electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(10): 2233–2237.
- [11] 郭守东, 桑慧, 杨娜娜, 等. 液相色谱-串联质谱法检测人血浆及脂蛋白唾液酸的含量[J]. *色谱*, 2014, 32(11): 1197–1200.
- Guo SD, San H, Yang NN, *et al.* Measurement of sialic acid from lipoproteins and human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2014, 32(11): 1197–1200.
- [12] 赖源发, 蔡尽忠, 胡佳, 等. 高效液相色谱-质谱法测定燕窝中唾液酸[J]. *分析试验室*, 2014, 33(5): 558–560.
- Lai YF, Cai JZ, Hu J, *et al.* Determination of sialic acid in edible bird's nest by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2014, 33(5): 558–560.
- [13] 郎昭滨, 马世波. 奶粉中游离唾液酸超高效液相色谱-串联四级杆质谱的检测方法[J]. *中国乳品工业*, 2014, 42(9): 50–52.
- Lang ZB, Ma SB. Milk powder determination of free sialic acid content by UPLC-MS/MS [J]. *Dairy Ind*, 2014, 42(9): 50–52.
- [14] 解鸿蕾, 李春, 刘宁. 超高效液相色谱串联四极杆质谱法分析婴儿奶粉中的唾液酸[J]. *色谱*, 2013, 31(8): 781–785.
- Xie HL, Li C, Liu N. Analysis of sialic acid in infant formulas using ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(8): 781–785.
- [15] 曲斌, 陈蓉, 耿士伟, 等. 液质联用技术在兽药多类别、多组分残留分析中的应用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(5): 1654–1660.
- Qu B, Chen R, Geng SW, *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry in applications of veterinary drugs multi-class and multi-residues analysis [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(5): 1654–1660.
- [16] 唐坤甜, 梁立娜, 蔡亚岐, 等. 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定牛乳及制品中的唾液酸[J]. *分析化学*, 2008, 36(11): 1535–1538.
- Tang KT, Liang LN, Cai YZ, *et al.* Determination of sialic acid in milk and products using high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection [J]. *Chin J Anal Chem*, 2008, 36(11): 1535–1538.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



李秀英, 工程师, 主要研究方向为食品营养分析检测技术。
E-mail: lixiuying@xmu.edu.cn



周之荣, 教授, 硕士生导师, 研究方向为分析化学。
E-mail: zhouzhirong1965@sina.com