

超高效液相色谱-串联质谱法测定燕窝中唾液酸的含量

侯向昶¹, 朱丽萍¹, 刘春生¹, 王斌¹, 王莉¹, 韩婉清¹, 赖富饶², 柯振华¹

(1. 广州市质量监督检测研究院, 广东广州 510110) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究建立了燕窝中唾液酸含量的超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 测定方法。经磷酸水解后, 燕窝中的唾液酸从与唾液酸糖蛋白的结合状态中游离出来, 吸取上清液过 Oasis HLB 柱, 用水淋洗固相萃取柱并弃去全部流出液, 用真空泵在 40~60 kPa 负压下抽干 Oasis HLB 固相萃取柱, 再用甲醇洗脱被测物, 洗脱液 40 °C 水浴中氮气吹干, 用流动相溶液定容, 采用负离子模式和多反应监测模式超高效液相色谱-串联质谱法检测。方法的线性范围在 0.1~50 mg/L 之间, 相关系数 0.999, 检出限为 0.02 mg/kg, 定量限为 0.1 mg/kg, 样品平均加标回收率为 93.5%, 相对标准偏差 1.52%。该方法前处理简单、重复性好、灵敏度高, 可应用于燕窝中唾液酸含量的测定。

关键词: 燕窝; 唾液酸(N-乙酰神经氨酸); 超高效液相色谱-串联质谱; 测定

文章编号: 1673-9078(2013)7-1706-1709

Determination of Sialic Acid in Edible Bird's Nest Using UPLC-MS/MS

HOU Xiang-Chang¹, ZHU Li-Ping¹, LIU Chun-Sheng¹, WANG Bin¹, WANG Li¹, HAN Wan-Qing¹, LAI Fu-Rao², KE Zhen-Hua¹

(1. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou Guangdong 510110, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A simple and sensitive UPLC-MS/MS method was developed and validated for the quantification of sialic acid (*N*-Acetylneuraminic acid) in edible bird's nest. After acid hydrolysis, sialic acid in edible bird's nest was released from the combination state of glycoprotein sialic acid. The supernate was further cleaned up using Oasis HLB SPE, followed by washed with water. The Oasis HLB SPE was drained by vacuum pump at 40~60 kPa prior to be eluted by methanol. The eluate was concentrated by nitrogen at 40 °C water bath, and then settled to permit by mobile phase. UPLC-MS/MS in negative-ion and multiple reaction monitor mode was used to detect the sialic acid. Validation results indicated that the limit of detection was 0.02 mg/kg and the limit of quantification was 0.1 mg/kg. The assay showed a linear range of 0.1-50 mg/L and gave a correlation coefficient (*r*) of 0.999. The average recovery was 93.5% with relative standard deviations (RSD) of 1.52% (*n*=6). The method showed good reproducibility and high sensitivity, suitable for analysis of sialic acid in edible bird's nest.

Key words: edible bird's nest; sialic acid (*N*-Acetylneuraminic acid); UPLC-MS/MS; determination

燕窝是雨燕科动物金丝燕及同属多种金丝燕用唾液和少量羽毛混合黏结所筑成的巢窝, 含有丰富的蛋白质、糖类和矿物质, 其特征成份是唾液酸糖蛋白^[1]。燕窝价格昂贵, 一些不法商人利用掺假燕窝及其制品牟取暴利。目前燕窝品质的鉴别研究多采用经验鉴别、显微鉴别及理化鉴别方法。随着市场上燕窝商品来源的日趋复杂以及燕窝深加工产品的出现, 仅凭物理特征已难以达到鉴别目的, 为了保护消费者利益, 维护市场秩序, 需要开发更为科学有效的方法鉴别燕窝品

收稿日期: 2013-06-27

基金项目: 广州市科研条件建设项目 ([2011]233-34); 广州市科技计划项目 (11C13190775); 广州市质量技术监督局科技计划项目 (2012kj05)

作者简介: 侯向昶 (1971-), 男, 高级工程师, 从事产品质量检验工作

质。

唾液酸 (sialic acid, SA, 见图1) 是一族神经氨酸 (neuraminic acid) 的衍生物, 是构成细胞膜上糖蛋白和糖脂的重要成分, 广泛存在于脊椎动物、哺乳动物及多种植物组织中。由于在大部分哺乳动物组织中发现的唾液酸主要是N-乙酰神经氨酸, 所以通常将N-乙酰神经氨酸称为唾液酸^[2]。研究表明, 唾液酸是一种天然的大脑营养素, 它能增强婴儿的记忆力和促进智力的发育^[3]。现有研究结果综合表明^[2,4], 不同来源的燕窝中唾液酸含量范围基本一致, 可将唾液酸含量 7.0~11.0% 作为燕窝初级产品质量初步鉴别的指标。猪皮、银耳、动物骨胶、琼脂、淀粉、海洋藻类植物成分及鱼鳔等物质常用于燕窝掺假, 或在劣质燕窝表面

涂上胶粉、面粉、鸡蛋、树胶、浆糊等。因掺假成分不含唾液酸或唾液酸含量很低,假冒燕窝的唾液酸含量难以达到正常燕窝初级产品的水平^[5]。因此,唾液酸的测定可以作为鉴别燕窝真伪的重要指标之一。

目前,测定唾液酸的方法主要有化学比色法^[6]、高效液相色谱法^[7-12]、气相色谱法^[13-14]、胶束电动色谱法^[15]、毛细管区带电泳法^[16]等。比色法操作相对简便,但方法较费时且灵敏度欠佳;高效液相色谱一般需要对唾液酸进行衍生,前处理时间较长,而且残留的衍生试剂对测定结果也存在一定的影响;气相色谱法需要耗费大量的时间来对分析样品进行衍生;毛细管区带电泳法较简单,但检出限较高。本实验采用超高效液相色谱-串联质谱法对燕窝中的唾液酸含量进行定量测定。该法具有灵敏度高、检出限低、定量准确、方便快捷等特点。可广泛应用于燕窝及燕窝制品中唾液酸含量的测定。

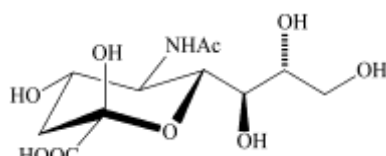


图1 唾液酸的化学结构式

Fig.1 Chemical structure of sialic acid

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

美国Waters液质联用仪;超高效液相色谱(UPLC)系统, XEVO TQ MS质谱仪, Masslynx 4.1工作站。涡旋振荡器,德国IKA公司;高速离心机, Sigma;恒温水浴摇床;搅拌器; Waters Oasis HLB固相萃取柱(60 mg, 3 mL);氮气吹干仪, BERLIN;真空泵;天平,梅特勒,瑞士;超纯水系统, Millipore, 美国;具塞离心管; 0.45 μm滤膜。

N-乙酰神经氨酸(N-acetyl neuraminic acid, 纯度99%), CAS号: 131-48-6, 购自Sigma公司, 甲酸、甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为超纯水, 磷酸为分析纯。

对照品储备液的配制: 准确称取100.0 mg唾液酸对照品于100.0 mL容量瓶中, 用超纯水溶解并定容, 配制成浓度为1 mg/mL的标准储备液, 于4 °C保存, 一个月内使用。

燕窝为马来西亚白燕盏、血燕盏。

1.2 色谱-质谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC HSS T3柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 0.1%甲酸水溶液:乙腈=90:10 (V/V), 等度洗脱; 流速: 0.4 mL/min; 进样量2 μL。

采用负离子模式, 离子源温度150 °C, 电离电压3 kV, 脱溶剂气温度500 °C, 雾化气流速800 L/h, 采用多反应监测模式(MRM), 监测离子对308.02>86.86、308.02>170.12, 定量离子对308.02>86.86。锥孔电压20 V, 碰撞电压15 V, 滞留时间0.022s。唾液酸标准品溶液的多反应监测(MRM)色谱图见图2。

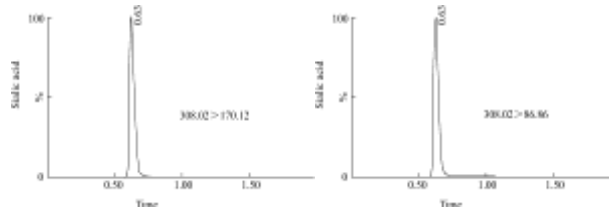


图2 唾液酸标准品溶液的多反应监测(MRM)色谱图

Fig.2 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of sialic acid

1.3 样品前处理

将燕窝样品研磨粉碎成细粉, 混匀, 准确称取100.0 mg, 置于100 mL具塞锥形瓶中, 加入100 mL 1.0%磷酸, 放入恒温水浴摇床中80 °C水解40 min, 在水解过程中使用搅拌器以防止燕窝粉末挂壁。

样品水解后冷却至室温, 吸取上清液过已活化的Oasis HLB柱, 待样液全部通过固相萃取柱后, 用5 mL水淋洗固相萃取柱, 弃去全部流出液。用真空泵在40~60 KPa负压下抽干Oasis HLB固相萃取柱, 再用5 mL甲醇洗脱被测物, 洗脱液全部收集并于40 °C水浴中氮气吹干, 用1 mL流动相溶液定容。定容液过0.45 μm滤膜, 滤液供超高效液相色谱-串联质谱测定。

2 结果与讨论

2.1 水解条件的选择

表1 因素水平表

Table 1 Factor and level table

水平	A (磷酸溶液浓度/%)	B (水解时间/min)	C (水解温度/°C)
1	0.5	20	60
2	1.0	30	80
3	1.5	40	100

唾液酸分析的重点和难点是将唾液酸从低聚糖和糖蛋白中释放出来。常见的释放方法有酶解法和酸解法。本实验采用酸解法, 利用酸水解断开连接、去乙酰基、去碳酸基, 唾液酸释放较为彻底, 而且适应性好, 无特异性。合适的水解条件是决定唾液酸是否释放完全的关键, 因此本实验重点对磷酸溶液浓度、水解时间、水解温度进行了优化试验。按三因素三水平L₉(3⁴)设计正交试验, 方案见表1, 结果见表2, 以唾液酸的含量为指标进行比较。唾液酸的含量测定, 以峰

面积按外标法计算。

表2 正交试验表

Table 2 Orthogonal test table

试验 编号	水平因子			唾液酸 含量/%
	A	B	C	
1	1	1	1	6.36
2	1	2	2	6.05
3	1	3	3	6.86
4	2	1	2	7.29
5	2	2	3	6.33
6	2	3	1	7.04
7	3	1	3	6.79
8	3	2	1	6.74
9	3	3	2	6.85
T ₁	19.27	20.44	20.14	T=60.31
T ₂	20.66	19.12	20.19	
T ₃	20.38	20.75	19.98	
\bar{x}_1	6.42	6.81	6.71	
\bar{x}_2	6.89	6.37	6.73	
\bar{x}_3	6.79	6.92	6.66	
极差 R	0.47	0.55	0.07	
主次顺序			B>A>C	
优水平	A ₂	B ₃	C ₂	
优组合			A ₂ B ₃ C ₂	

用直观分析法和极差分析法优选最佳水解条件为A₂B₃C₂，影响显著性为B>A>C，即水解时间为最显著的影响因素，其次为磷酸溶液的浓度，最后是水解温度的影响。通过正交试验确定燕窝样品的最佳水解条件为：用1.0%磷酸100 mL，于80℃水解40 min（底物用量为100.0 mg）。需要指出的是，燕窝样品的细度对水解效果也有影响，颗粒太粗水解将不充分，因此水解前需要将燕窝样品研磨成细粉。

2.2 仪器分离条件的优化

由于唾液酸结构中发色基团很少，紫外检测波长偏低，为192 nm。所以需要衍生化后才能用HPLC、GC分离测定，实验复杂，且可能引入一些干扰因素。如采用邻苯二氨盐酸盐为衍生化试剂，方法的前处理步骤繁琐，经实验比较后发现，邻苯二氨盐酸盐对测定结果存在着较大的干扰。本方法最终采用的是液相色谱-串联质谱法，最大优点是无需衍生，可以获得较好的重现性与准确性，避免了衍生化试剂的干扰。

唾液酸的亲水能力较强，试验比较了唾液酸在Acquity UPLC BEH C₁₈色谱柱和Acquity UPLC HSS T3色谱柱上的分离效果。发现唾液酸在BEH C₁₈色谱柱上保留较弱，而在HSS T3色谱柱上的分离效果良好，因

此选用HSS T3色谱柱。

由于唾液酸可以和固定相中的硅羟基等相互作用，导致峰型拖尾。为改善峰型，抑制唾液酸中羧基质子的电离，将流动相中的水调节为弱酸性。在流动相的选择方面，经比较，发现以0.1%甲酸水溶液+乙腈（90+10）为流动相可达到良好的分离效果。

2.3 线性关系考察

在上述仪器条件下测定，精密吸取系列对照品溶液（0.1~50 mg/L）各2 μL进样分析，以峰面积（Y）为纵坐标、溶液质量浓度(X)为横坐标，绘制标准曲线。结果表明，唾液酸浓度在0.1~50 mg/L范围内，线性回归方程为Y=340 X-244，线性相关系数达0.999。

2.4 精密度和稳定性试验

取唾液酸对照品溶液重复进样测定6次，RSD为1.10%，表明方法精密度良好。考察了10 mg/L唾液酸水解前后的浓度变化。唾液酸在前处理前后的浓度变化小于5%，表明唾液酸不受酸水解影响。取同一份样品溶液，按最佳水解条件处理，分别于0、1、2、4、8、10、12 h测定其峰面积，其RSD为1.30%，表明该样品溶液至少在12 h内保持稳定。

2.5 重复性试验

精密称取同一份燕窝样品细粉6份，按最佳水解条件处理后进样，结果的RSD为1.75%，表明本方法重复性较好。

2.6 最低检测限

取唾液酸标准品溶液，加水并逐步稀释，用液相色谱串联质谱仪记录峰面积及信噪比，唾液酸的最低检测限（S/N=3）为0.02 mg/kg，定量限为0.1 mg/kg。

2.7 加标回收试验

表3 唾液酸回收率

Table 3 Recovery rate of sialic acid

样品中唾液酸的含量/mg	加入唾液酸的质量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
6.59	7.35	13.39	92.5		
6.59	7.31	13.29	91.7		
6.59	7.28	13.35	92.9	93.5	1.52
6.59	7.35	13.59	95.2		
6.59	7.29	13.43	93.8		
6.59	7.33	13.56	95.1		

称取已测定含量的燕窝（唾液酸含量为6.59%）样品6份，每份均为100.0 mg，加入一定量的唾液酸对照品溶液，按本方法测定。用外标法计算含量，回收率结果见表3。

2.8 样品测试

取5份不同种类的燕窝样品，测定其中的唾液酸

含量。测得唾液酸含量分别为 6.59%、7.09%、8.11%、6.98%、7.25%。结果显示, 5 份燕窝样品中的唾液酸含量在 6.0~8.5% 之间, 其中一份燕窝样品的 MRM 色谱图如图 3 所示。王慧^[2]等采用 HPLC-UV 法检测官燕、血燕、毛燕共 9 个样品的唾液酸, 含量在 7.1~10.4% 之间。姜水红^[4]等采用 HPLC 检测了马来西亚白燕盏、印尼血燕盏等 10 个样品的唾液酸, 含量在 7.09~10.79% 之间。以上文献报导结果与本文测试数据基本接近, 相关差异可能源于燕窝品种及来源的不同。

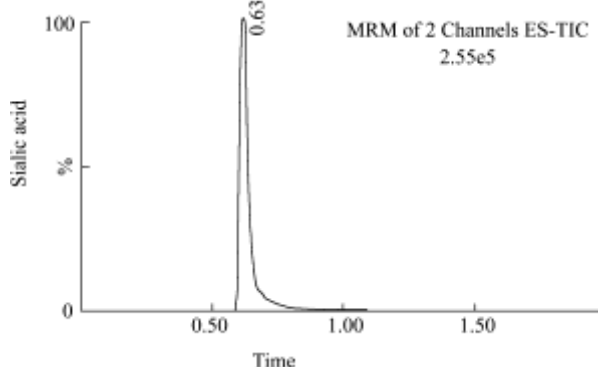


图3 燕窝样品的多反应监测(MRM)色谱图

Fig.3 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of edible bird's nest

3 结论

本研究建立了应用超高效液相色谱-串联质谱法测定燕窝中唾液酸含量的方法。方法在流动相中采用高比例水相并采用T3色谱柱, 解决了极性化合物唾液酸在C₁₈柱上不保留或者需要通过衍生化的方式进行测定的问题。方法省去了唾液酸衍生化的过程, 简化了实验流程。本方法具有前处理简单、准确性高、重复性好、测定速度快等显著优点, 可以广泛应用于燕窝及燕窝制品中唾液酸含量的测定。

参考文献

- [1] 查圣华,姜水红,张宏.燕窝及其伪品鉴定方法研究[J].食品科技,2010,35(4):281-283
Zha S H, Jiang S H, Zhang H. Study on method to identify true or false edible bird's nest [J]. Food Science and Technology, 2010, 35(4): 281-283
- [2] 王慧,倪坤仪,王玉.燕窝中唾液酸的含量测定[J]. 药物分析杂志,2006,26(9):1251-1253
Wang H, Ni K Y, Wang Y. Determination of sialic acid in Edible bird's nest [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2006, 26(9): 1251-1253
- [3] 黄华军,奚星林,吴宏中,等.奶粉中唾液酸的测定方法[J].分析测试学报,2006,25(4):129-131
Huang H J, Xi X L, Wu H Z, et al. Determination of Sialic Acid in milk powder [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2006, 25(4): 129-131
- [4] 姜水红,查圣华,谢丽芬,等.燕窝中唾液酸含量测定方法的研究[J].中国生化药物杂志,2009,30(5):315-317
Jiang S H, Zha S H, Xie L F, et al. Study on the determination of sialic acid in edible bird's nest [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2009, 30(5): 315-317.
- [5] 杨国武,张世伟,黄秀丽,等.唾液酸检测研究现状及其用于燕窝产品质控评析[J].检验检疫学刊,2010,20(2):70-73
Yang G W, Zhang S W, Huang X L, et al. The research situation of sialic acids detection and comment on its application in quality control of edible bird's nest products [J]. Inspection and Quarantine Science, 2010, 20(2): 70-73
- [6] Neelima Rao P S, 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]. Journal of Dairy Research, 2012, 79(4): 495-501
- [7] Orozco-Solano M I, Priego-Capote F, Luque de Castro M D. 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]. Analytica Chimica Acta, 2013, 766: 69-76
- [8] Hurum D C, Rohrer J S. Determination of sialic acids in infant formula by chromatographic methods: A comparison of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and ultra-high-performance liquid chromatography methods [J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(3): 1152-1161
- [9] 华永有,杨艳,林美华.高效液相色谱法测定燕窝类保健品中唾液酸[J].中国卫生检验杂志,2010,20(10):2454-2456
Hua Y Y, Yang Y, Lin M H. Determination of sialic acid in bird's nest healthy products by high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 20(10): 2454-2456
- [10] ANUMULA K R. Rapid quantitative determination of sialic acid in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with a sensitive fluorescence detection [J]. Analytical Biochemistry, 1995, 230: 24-30
- [11] KARAMAN N K, WIKSTROM B, ANTONOPOULOS C A. Determination of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids in glycoconjugates by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. J Chromatogr,

- 1990, 503: 421-429
- [12] Bing W, Janette B M, Patricia M V, et al. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas [J]. *Am J Clin Nutrition*, 2001, 74(4): 510-515
- [13] 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
- [14] 李波, 芦菲, 田素玉. 气相色谱法同时测定多糖中的中性糖、糖醛酸、氨基糖和唾液酸[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(9): 208-211
- Li B, Lu F, Tian S Y. Simultaneous determination of neutral sugar, uronic acid, amino sugar and sialic acid of polysaccharides by gas chromatography [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(9): 208-211
- [15] 贾丽, 周维, 潘瑛. 在线富集胶束电动色谱法测定唾液中的唾液酸[J]. *分析测试学报*, 2004, 23(6): 69-72
- Jia L, Zhou W, Pan Y. On-line concentration and determination of sialic acid in saliva using micellar electrokinetic chromatography [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2004, 23(6): 69-72
- [16] 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