2013 年 8 月
August 2013

色 谱
Chinese Journal of Chromatography

Vol. 31 No. 8
781 ~ 785

技术与应用

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2012.12051

超高效液相色谱-串联四极杆质谱法分析婴儿乳粉中的唾液酸

解鸿蕾[1,2], 李 春[1*], 刘 宁[1,2*]

(1. 东北农业大学食品学院, 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030;
2. 国家乳业工程技术研究中心, 黑龙江省乳品工业技术开发中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定婴儿配方乳粉中唾液酸含量的分析方法。利用酸水解方法释放出婴儿配方乳中的唾液酸,经 HLB 反相色谱固相萃取柱净化,采用 BEH HILIC 色谱柱分离,以 0.1% 甲酸水溶液和 100% 乙腈溶液作为流动相进行梯度洗脱,流速为 0.25 mL/min,进样体积 5 μL,柱温 30 ℃,电喷雾质谱检测,正离子多反应监测模式进行定性和定量分析。结果表明:唾液酸在 0.05 ~ 5.0 mg/L 范围内与唾液酸峰面积的线性关系良好(R^2 = 0.998 9);以 0.1、0.5、2.5 和 5.0 mg/L 4 个添加水平进行添加回收试验,唾液酸的平均回收率为 84.3% ~ 98.9%,相对标准偏差为 4.9% ~ 8.2%;唾液酸的检出限为 0.01 mg/L。该方法简单、快速、重复性好、灵敏度高,可广泛用于奶粉、牛奶及母乳中唾液酸含量的分析测定。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱;唾液酸;婴儿配方乳

中图分类号:O658　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-8713(2013)08-0781-05

Analysis of sialic acid in infant formulas using ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

XIE Honglei[1,2], LI Chun[1*], LIU Ning[1,2*]

(1. College of Food Sciences, Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Harbin 150030, China; 2. National Dairy Engineering & Technical Research Center, Heilongjiang Dairy Industry Technical Development Center, Harbin 150086, China)

Abstract: The method for analysing sialic acid in infant formulas by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) has been established. Sialic acid in milk was released via acid hydrolysis, and purified by an HLB solid phase extraction cartridge. The UPLC separation was performed on an ACQUITY UPLC™ BEH HILIC column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) utilizing a gradient elution program of acetonitrile and water (containing 0.1% formic acid) as the mobile phases at a flow rate of 0.25 mL/min. Injection volume and column temperature were set at 5 μL and 30 ℃, respectively. The identification and quantification were achieved by using electrospray ionisation (ESI)-MS/MS in positive ion mode and multiple reaction monitoring (MRM) mode. The linear range was from 0.05 to 5.0 mg/L for sialic acid and the correlation coefficient (R^2) was greater than 0.99. The average recoveries spiked at the four concentration levels of 0.1, 0.5, 2.5 and 5.0 mg/L ranged between 84.3% and 98.9% with the relative standard deviations from 4.9% to 8.2%. The limit of detection was 0.01 mg/L. Therefore, this method has the characteristics of simple operation, high reproducibility and sensitivity. It can be widely applied to determine the total contents of sialic acid in infant formula, cow milk and human milk.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); sialic acid; infant formula

* 通讯联系人. E-mail: spxylch@126.com(李春); E-mail: ningliu6666@yahoo.com.cn(刘宁).

基金项目:"十二五"国家科技支撑课题(2011BAD09B0304).

收稿日期:2012-12-28

万方数据

唾液酸(sialic acid, SA)是指一系列含 9 个碳原子的羧基化单糖酰化衍生物的统称,化学命名为 5-氨基-3,5-二脱氧-D-甘油-D-半乳壬酮糖。人乳(human milk)中部分低聚糖的末端黏附有高浓度的唾液酸,参与人脑组织中神经节苷脂和糖蛋白的构成,有助于增强神经突触发生和促进神经系统发育[1,2]。所有哺乳动物(包括人)的肝脏都具有由单糖合成唾液酸的能力,但是人类新出生婴儿的这种能力相对不成熟,满足不了神经系统快速生长发育的需要[3,4]。在人乳和婴儿配方乳中,它分别以游离、低聚糖结合和蛋白质结合的形式存在;人乳低聚糖结合唾液酸约占 73%,婴儿配方乳蛋白结合唾液酸约占 70%,所结合的唾液酸主要是 *N*-乙酰神经氨酸(*N*-acetylneuraminic acid, Neu5Ac);通常所指的唾液酸即指 Neu5Ac[5](结构见图 1)。牛乳和婴儿配方乳中唾液酸含量都很低[5,6]。目前,国内市场已有婴儿配方乳添加唾液酸,使其更接近人乳含量。随着添加唾液酸食品的增加,食品质量监督部门与生产企业质量控制需要也不断增多,势必要求更加准确和快速的检测方法。

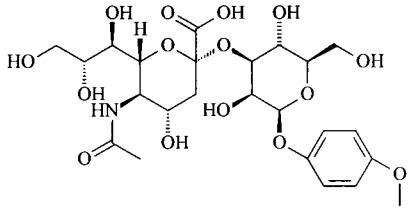

图 1 *N*-乙酰神经氨酸的结构

Fig. 1 Structure of *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac)

用于唾液酸分析的方法很多,如酶反应、抗体、凝集素以及病毒等已经用于确定总唾液酸含量或检测特定类型的唾液酸;苔黑酚、间苯二酚、硫代巴比妥酸比色法和分光光度法多年来也已广泛应用于唾液酸的检测[7,8]。这些方法的共同局限是它们无法区分唾液酸的类型并且要求样品净化。而比色法和色谱光度测定法等传统方法则是用离子交换柱纯化酸水解样品后的唾液酸,采用这种方法时样品中的唾液酸损失较大,影响检测的准确性。关于食品中唾液酸的检测方法有高效液相色谱法(HPLC),采用 HPLC 对人乳中 Neu5Ac 的检出限为 0.02 μmol/L[9],对婴儿配方乳中 Neu5Ac 的检出限为 0.03 mg/L[10,11]。这些方法都较为灵敏。但因为大多数的糖类化合物没有发色基团,唾液酸也不例外,所以采用 HPLC 分析需要对唾液酸进行衍生后测定,因而增加了实验的复杂性和可能的干扰因素。虽然也有报道采用 HPLC-MS/MS 分析奶粉中唾液酸含量的检出限为 0.06 mg/L[12],但缺乏系统性和实用性。还有对其他生物样品中唾液酸进行分析的报道[13-15],但这些方法也不适用于乳粉中唾液酸的分析。

随着色谱柱填料技术的发展,基于 1.7 μm 小颗粒填料技术的超高效液相色谱(UPLC)比传统的 HPLC 具有更高的分离能力,与质谱联用能够进行相对分子质量的精确测定。本研究分别对样品中 3 种形式的唾液酸进行提取,用 HLB 固相萃取柱对提取物淋洗过滤,建立了灵敏度更高、更快速的 UPLC-MS/MS 检测婴幼儿配方乳中唾液酸的方法,实际样品检测效果明显。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

超高效液相色谱-质谱联用仪,包括 ACQUITY Ultra Performance 超高效液相色谱仪、XEVO TQ 电喷雾串联四极杆质谱仪、Masslynx v 4.1 数据处理软件(美国 Waters 公司); Milli-Q® Gradient 超纯水净化器(美国 MILLIPORE 公司);超速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); HLB 固相萃取柱(3 mL/60 mg,北京振翔公司)。

唾液酸标准品(纯度 95%, A0812, synthetic; Sigma 公司);乙腈(色谱纯,Fisher 公司);盐酸、甲酸和三氯乙酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);实验用水均为超纯水;婴幼儿配方乳粉均购买于各大型超市。

储备液的制备:精确称取 *N*-乙酰神经氨酸标准品 0.025 g 于 50 mL 容量瓶中,用乙腈-水(8∶2, v/v)溶液定容至刻度,得到质量浓度为 500 mg/L 的单标准储备液,于 -20 ℃下储存备用。

标准工作液的制备:准确移取一定量的标准储备液于容量瓶中,用 0.1% 甲酸溶液-乙腈(10∶90, v/v)混合溶液定容至刻度,逐级稀释成 5.0、1.0、0.5、0.2、0.1 和 0.05 mg/L 的唾液酸标准工作液,于 4 ℃下储存备用。

1.2 UPLC-MS/MS 分析

1.2.1 UPLC 条件

色谱柱:Waters ACQUITY Ultra BEH HILIC 超高效液相色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);柱温:30 ℃;样品室温度:30 ℃;进样量:5 μL。流动相 A:乙腈;流动相 B: 0.1% 甲酸水溶液。梯度洗脱程序:0 ~ 0.2 min, 90% A; 0.2 ~ 0.4 min, 90% A ~ 12% A; 0.4 ~ 1.8 min, 12% A; 1.8 ~ 2.2 min, 12% A ~ 90% A。流速:0.25 mL/min。

万方数据

1.2.2 MS/MS 条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子(ESI^+)扫描;检测方式:多反应监测(MRM);毛细管电压:3.0 kV;锥孔电压:45 V;源温度:150 ℃;脱溶剂温度:450 ℃;脱溶剂气(氮气)流量:650 L/h;锥孔反吹气流量:50 L/h;碰撞气(氩气)流量:0.24 mL/min;光电倍增器电压:650 V。

1.3 样品前处理

1.3.1 游离和低聚糖结合的唾液酸的提取

称取 1.0 g 婴幼儿配方乳粉,加入 8 mL 20% 三氯乙酸溶液至完全溶解以沉淀蛋白质。取上清液分别置于 4 个 2 mL 的离心管中,均在 4 ℃、15 000 r/min 条件下离心 10 min,合并上清液备用。

1.3.2 蛋白质结合的唾液酸的提取

在 1.3.1 节处理后的沉淀中加入 2 mL 0.1% 盐酸溶液,放入 80 ℃水浴锅中水解 1 h,取出后冷却,在 4 ℃、15 000 r/min 条件下离心 10 min。

将 1.3.1 节及 1.3.2 节中得到的两部分提取物溶液混合后,调节 pH 值至 2.5 ~ 3,用乙腈定容至 20 mL 容量瓶中,用 0.22 μm 有机滤膜过滤,滤液待净化。

1.3.3 净化

HLB 固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 超纯水预处理,然后加入上样液。先用 4 mL 超纯水淋洗小柱,于负压下抽干 30 s,用氨水-甲醇(25∶75, v/v)溶液 3 mL 洗脱;收集全部洗脱液,于 50 ℃下用氮气吹到近干;用 1 mL 初始流动相溶解并定容,过孔径为 0.22 μm 的有机滤膜,滤液供 UPLC-ESI-MS/MS 测定。

1.4 方法学验证

通过添加回收率试验进行方法学验证,验证的效能指标包括线性范围、回收率、精密度和检出限。方法验证遵循工业生物分析方法的验证指南[16]。

2 结果与讨论

2.1 质谱分析条件的选择及参数的优化

取唾液酸的标准溶液(质量浓度为 0.5 mg/L)分别在 ESI^- 与 ESI^+ 条件下对母离子进行全扫描。得到不同离子源下唾液酸的母离子棒状图。结果表明:唾液酸在 ESI^+ 条件下母离子棒状图的丰度远比在 ESI^- 条件下高,因此本实验选用 ESI^+ 方式电离。

在 ESI^+ 模式下对唾液酸的标准溶液(质量浓度为 0.5 mg/L)进行母离子全扫描,确定各种唾液酸的准分子离子并分别优化锥孔电压(cone voltage, CV),确定最终的锥孔电压为 45 V;然后以其准分子离子(m/z 310.1)为母离子,对其子离子进行全扫描,选择碎片离子中丰度较高的两个离子(m/z 274.1 和 m/z 292.1)作为定性、定量特征离子,其中 m/z 274.1 为定量离子。最后以正离子多反应监测模式优化各种质谱调谐参数,其中碰撞能为 5 eV(m/z 310.1/292.1)和 8 eV(m/z 310.1/274.1),最大程度地提高检测灵敏度。质量浓度为 1.0 mg/L 的唾液酸标准溶液的定性、定量离子的色谱图见图 2。

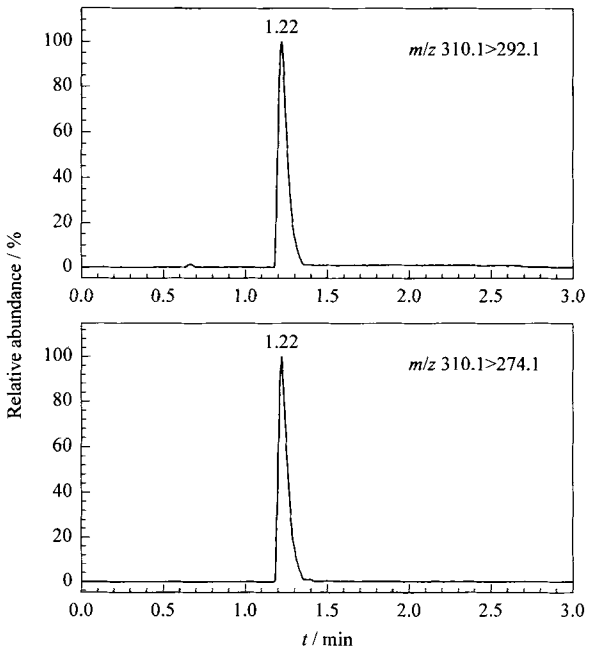

图 2　唾液酸标准溶液(1.0 mg/L)的 MRM 色谱图

Fig. 2　MRM chromatograms of sialic acid standard solution (1.0 mg/L)

2.2 色谱分离条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

结合唾液酸的理化性质及唾液酸在色谱柱的分配特性,分别选用基于 1.7 μm 小颗粒填料技术的 BEH HILIC 柱(50 mm × 2.1 mm 和 100 mm × 2.1 mm)、BEH C_{18} 和苯基柱 4 种色谱柱对唾液酸进行分离,结果表明唾液酸的保留时间有较大的差异。采用 BEH C_{18} 和苯基柱进行分离,在优化条件下唾液酸的保留时间分别为 0.51 min 和 0.60 min,保留时间太短;标准品和样品检测时,信号强度差别较大,样品灵敏度均低,不适于样品检测。采用 BEH HILIC 柱(100 mm × 2.1 mm),在优化条件下唾液酸的保留时间为 2.15 min,保留时间较合理,但峰形拖尾,色谱行为不理想,灵敏度较低。采用 BEH HILIC 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)进行分析,发现此柱对唾液酸具有良好的分离效果和较高的灵敏度,保留时间为 1.22 min,也较合适。故本实验最

万方数据

终选择 BEH HILIC 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)进行分离,采用该柱分析空白样品和加标样品的色谱图见图 3。

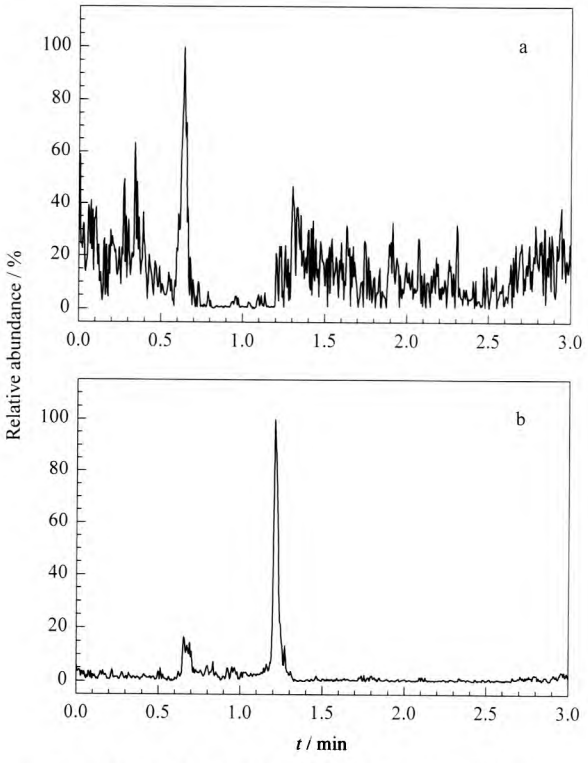

图 3 (a)空白奶粉样品和(b)添加唾液酸标准品奶粉样品的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of (a) a blank infant formula sample and (b) the infant formula sample spiked with sialic acid

2.2.2 流动相的选择

唾液酸是一种碳水化合物,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。分别考察了以 5 mmol/L 甲酸氨溶液-乙腈、水-乙腈、0.1% 甲酸溶液-乙腈(体积比均为 10∶90)为流动相对 1.0 mg/L 唾液酸标准溶液的色谱分离效果,结果表明 0.1% 甲酸溶液-乙腈(10∶90, v/v)作流动相时的信号最强,色谱行为较好,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,与水和醇无限互溶,并且可以改善色谱峰的峰形。在 0.1% 甲酸水溶液和乙腈流动相体系下,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。最终确定了 1.2.1 节的流动相及梯度洗脱程序。在 0.1% 甲酸水溶液和乙腈流动相体系下,唾液酸具有较高的离子化效率,因而增强了检测的灵敏度。

2.3 前处理条件的优化

2.3.1 提取条件的优化

从不同原料中分离提取唾液酸的方法各有不同,唾液酸释放后,多数采用离子交换层析和凝胶过滤层析分离和 HPLC 纯化等[17]。由于本实验选用了分离效果较好的色谱柱,前处理采用了水解后高速离心的处理方式,因此本方法简便、有效。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。研究表明,在 80 ℃条件下用 0.1% 盐酸水解 1 h,能够使所有的唾液酸链断裂并使这些残基脱酰、脱羧化,能保证唾液酸的完全水解[17]。

2.3.2 净化条件的优化

由于乳粉中的成分比较复杂,离心后的上清液需进行固相萃取以除去样品提取液中的杂质。目前乳粉类的样品常用的固相萃取方法主要采用反相色谱和离子交换 SPE 柱,还有 HLB 固相萃取柱。研究表明,采用聚合物填料的 HLB 固相萃取柱净化,可以使样品达到良好的净化效果,且方法简单、重现性好。将样品溶液加载到 Oasis HLB 固相萃取小柱中,采用超纯水作为淋洗液,氨水-甲醇(25∶75, v/v)溶液作为洗脱液,其中 4 mL 淋洗液和 3 mL 洗脱液即可满足净化要求。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性关系

选取不含待测组分的空白奶粉样品,按前处理方法处理制备空白基质液,并在其中添加适量的唾液酸标准品储备液,配成质量浓度依次为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 和 5.0 mg/L 的基质标准溶液。上机测定,记录峰面积。根据唾液酸的定量离子峰面积(Y)与唾液酸的质量浓度(X, mg/L)进行线性回归,绘制标准曲线,经 Masslynx v 4.1 数据处理软件分析处理,在 0.05 ~ 5.0 mg/L 范围内,唾液酸的线性回归方程为 $Y = 8\,114.5X - 811.09$, $R^2 = 0.998\,9$。

2.4.2 回收率、精密度和检出限

称取 1.0 g 未知唾液酸含量的婴儿乳粉样品,按照建立的方法处理后进行测定;另称取 1.0 g 样品在前处理基础上,取约 7 mL 的上清液,并加入质量浓度为 5.0 mg/L 标准品溶液,用乙腈定容在 10 mL 的容量瓶中,上机测定,得到未知样品中唾液酸的含量。依次在原含量样品的基础上分别添加 0.1、0.5、2.5 和 5.0 mg/L 的唾液酸标准品溶液,检测后扣除空白值,计算方法的回收率。结果(见表 1)表明,本方法的平均添加回收率为 84.3% ~ 98.9%, RSD 为 4.9% ~ 8.2%,回收率和精密度良好。在本方法的线性范围下限 0.05 mg/L 时其 $S/N > 10$,故确定本方法的定量限为 0.05 mg/L;以 $S/$

万方数据

$N=3$ 计算方法的检出限,得到唾液酸的检出限为 0.01 mg/L,表明所建立的方法具有较高的灵敏度。

表 1　婴儿乳粉样品中唾液酸的添加回收率和精密度($n=3$)

Table 1　Recovery and precision of sialic acid spiked in an infant formula ($n=3$)

Spiked/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
0.1	85.7	5.7
0.5	84.3	8.2
2.5	90.8	4.9
5.0	98.9	6.9

2.4.3　实际样品的确证分析

取 3 份不同品牌的婴幼儿配方乳粉样品 A1、B2、C3 各 1.0 g,按照建立的方法处理后每个样品平行测定 3 次,以基质匹配曲线进行定量,得到 3 份不同样品中唾液酸的含量分别为 107.7、72.9 和 55.8 μg/g。与现行方法[8,9]的测定结果进行比较,验证按本文建立的方法测定样品中唾液酸的含量在合理的范围内。

3　结论

本文建立了超高效液相色谱-串联质谱测定婴幼儿配方乳中唾液酸含量的方法,操作方便简单,避免了复杂样品前处理过程中唾液酸的损失,提高了回收率;而且能够提供一级和二级质谱信息,为检测唾液酸的确证提供定性依据。与普通的液相色谱-串联质谱法相比,该方法分析迅速、灵敏度高、重现性好、确证能力强,能满足国内外对婴幼儿配方乳粉中唾液酸确证分析的要求,可广泛用于奶粉、牛奶及母乳中唾液酸含量的测定。

参考文献:

[1] Wang B, Brand-Milleret J. Eur J Clin Nutr, 2003, 57(11): 1351

[2] Wang B, McVeagh P, Petocz P, et al. Am J Clin Nutr, 2003, 78(5): 1024

[3] Carlson S E. Am J Clin Nutr, 1985, 41: 720

[4] Kikuchi H, Kikuchi H, Tsuiki S. Biochim Biophys Acta, 1971, 252(2): 357

[5] Wang B, Brand-Milleret J, McVeagh P, et al. Am J Clin Nutr, 2001, 74(4): 510

[6] Martin-Sosa S, Martin M J, Garcia-Pardo L A, et al. J Dairy Sci, 2003, 86(1): 52

[7] Zhang X M. Foreign Medical Sciences: Section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine (张秀明. 国外医学:临床生物化学与检验学分册), 1995, 16(2): 75

[8] Huang H J, Xi X L, Wu H Z, et al. Journal of Instrumental Analysis (黄华军, 奚星林, 吴宏中, 等. 分析测试学报), 2006, 25(4): 129

[9] Chen H J, Wang P, Chen Y, et al. Food Science (陈海娇, 王萍, 陈跃, 等. 食品科学), 2011, 32(16): 308

[10] Salcedo J, Lacomba R, Alegría A, et al. Food Chem, 2011, 127(4): 1905

[11] Spichtig V, Michaud J, Austin S. Anal Biochem, 2010, 405(1): 28

[12] Li H, Jin Y B, Liu H X, et al. Journal of Instrumental Analysis (栗晖, 金一宝, 刘红霞, 等. 分析测试学报), 2008, 27(Suppl): 193

[13] Tebani A, Schlemmer D, Imbard A, et al. J Chromatogr B, 2011, 879(31): 3694

[14] van der Ham M, de Koning T J, Lefeber D, et al. J Chromatogr B, 2010, 878(15/16): 1098

[15] van der Hama V, Prinsen B H C M T, Huijmans J G M, et al. J Chromatogr B, 2007, 848(2): 251

[16] Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. (2001-03). http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm

[17] Sinha D, Chatterjee M, Mandal C. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2000, 12(63): 17

万方数据