

DMBA衍生/超高效液相色谱法测定 鱼肉中唾液酸含量

李佩佩^{1,2,3*}, 严忠雍^{1,2}, 陈 荫³, 何鹏飞^{1,2}, 黄丽英^{1,2}, 方 益^{1,2}

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316021; 2. 浙江省海洋渔业资源可持续利用技术研究重点实验室, 浙江 舟山 316021; 3. 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心, 浙江 舟山 316021)

摘要:建立了同时检测鱼肉中N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)、N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)和酮基-脱氧壬酮糖酸(KDN)3种核心唾液酸的超高效液相色谱-荧光检测(UPLC-FLD)方法。冷冻干燥后的样品在8 mL 0.6 mol/L 盐酸溶液中80 °C酸解20 min, 采用4, 5-二甲基-1, 2-苯二胺(DMBA)衍生试剂进行衍生。前处理后的样品经Waters Acquity UPLC BEH C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)分离, 以纯水-乙腈为流动相梯度洗脱, 荧光检测器检测。结果表明, Neu5Ac、Neu5Gc和KDN在0.02 ~ 5.0 μg/mL范围内呈良好的线性关系($r^2 > 0.999$), 定量下限($S/N = 10$)分别为0.20、0.20、0.10 μg/g; 加标回收率为90.8% ~ 103%, 相对标准偏差(RSD)为2.8% ~ 5.0%。该方法分析时间短, 4 min内可完成3种唾液酸的分离, 分离效果好, 且方法灵敏度高、准确度高, 适用于鱼肉中唾液酸的测定。

关键词: 唾液酸; 超高效液相色谱; 衍生; 鱼肉

中图分类号: O657.7; TS201.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2022)11-1684-06

Determination of Sialic Acid in Fish by Ultra High Performance Liquid Chromatography with DMBA Derivatization

LI Pei-pe^{1,2,3*}, YAN Zhong-yong^{1,2}, CHEN Yin³, HE Peng-fei^{1,2},
HUANG Li-ying^{1,2}, FANG Yi^{1,2}

(1. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316021, China; 2. Key Lab of Sustainable Utilization of Technology Research for Fishery Resource of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China; 3. Marine Biomedical Products Engineering Technology Research Center of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China)

Abstract: An ultra high performance liquid chromatography – fluorescence detection (UPLC – FLD) method was developed for the simultaneous determination of 3 core kinds of sialic acids (SAs) including N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) and 2-keto-3-deoxynononic acid (KDN) in fish. The freeze-dried samples were acid hydrolyzed with 8 mL 0.6 mol/L hydrochloric acid solution for 20 min at 80 °C, followed by derivatization with 4, 5-dimethylbenzene-1, 2-diamine (DMBA). The derivative conditions for DMBA were optimized by single factor test. All the target compounds were separated on an Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) by gradient elution, using pure water and acetonitrile as eluents, then detected by UPLC – FLD. Under the optimized conditions, there were good linear relationships for Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in the range of 0.02 – 5.0 μg/mL ($r^2 > 0.999$), with their limits of quantitation ($S/N = 10$) of 0.20 μg/g, 0.20 μg/g and 0.10 μg/g, respectively. The spiked recoveries for three SAs at three levels ranged from 90.8% to 103%, with relative standard deviations (RSDs) of 2.8% – 5.0%. The analysis was rapid, and it could be achieved within 4 min with good separation and sharp peak shapes. With the characteristics of high accuracy and good precision, the method was suitable for the simultaneous determination of Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in fish.

Key words: sialic acids; ultra performance liquid chromatography; derivatization; fish

唾液酸(SAs)是一类酸性氨基糖, 为神经氨酸的N-或O-取代衍生物。其主体结构是由9个碳原子

收稿日期: 2022-04-29; 修回日期: 2022-06-07

基金项目: 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心开放基金

* 通讯作者: 李佩佩, 博士, 高级工程师, 研究方向: 水产品质量安全与水产资源综合利用, E-mail: liwanzhao999@163.com

和氧原子构成的带 1 个环外侧链的六元环, 在 C1 处有 1 个羧基, C4、C7、C8、C9 处各有 1 个羟基^[1]。唾液酸种类多样, 自然界中已发现 80 余种^[2], 一般根据 C5 取代基团的不同(N-乙酰基、N-羟乙酰基和羟基)将唾液酸分成 3 种核心结构: N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)、N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)和酮基-脱氧壬酮糖酸(KDN)。其他唾液酸均为上述 3 种结构的乙酰化、甲基化、巯基化或酯化等的衍生物^[3-4]。3 种核心结构的唾液酸如图 1 所示。

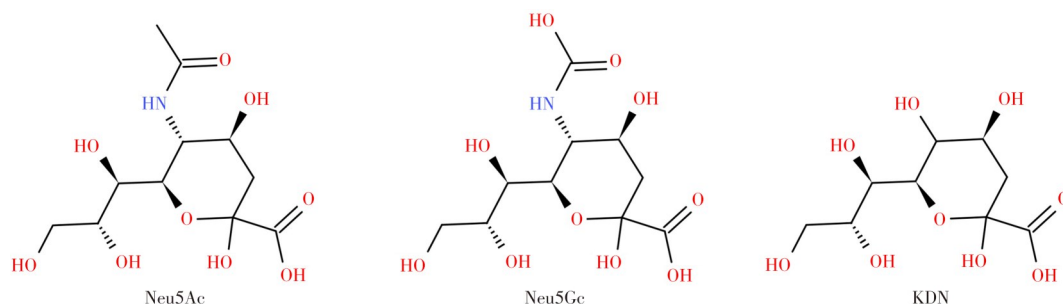


图 1 唾液酸的 3 种基本结构形式

Fig. 1 Structures of the three basic forms of sialic acid

作为生物糖家族中的一大类, 唾液酸主要以结合态广泛存在于各类生物组织及少量微生物中, 是糖蛋白、低聚糖和糖脂的重要成分^[5-6]。发生在 C4、C7、C8、C9 位点上乙酰基、磺酸基、乳酰基、磷酸基等活性基团的取代使得唾液酸具有丰富多样的结构和复杂重要的生理功能: 参与细胞间相互作用、细胞粘附与分化、细胞间的信息传导以及免疫应答等过程^[7-8]; 作为一种天然的大脑营养素, 促进人体神经系统成长发育, 促进婴幼儿大脑发育和提高记忆力^[9]; 调节大量生理病理过程, 在抗炎、抗病毒、抗肿瘤等方面发挥重要作用^[10-13]。由于唾液酸多糖本身结构复杂且性质不稳定, 通常样本量很小, 因此对分析方法的要求很高, 研究唾液酸和唾液酸多糖时, 需要建立高效适用的检测方法。目前应用最广泛的检测方法为色谱法^[14-15]。唾液酸主要以结合态形式存在, 一般需先通过水解将其从糖链的末端释放出来, 再采用化学衍生手段获得稳定的结构。

目前唾液酸的检测对象涉及燕窝^[16-17]、乳及乳制品^[18-19]、牛奶^[20]、血浆^[21-22]、畜禽动物组织^[23-24]等, 对鱼肉基质研究较少。研究表明猪、牛、羊肉等红肉中含有 Neu5Ac 和 Neu5Gc, 而鱼肉、鸡肉等白肉中仅含有 Neu5Ac^[25]。Neu5Gc 属于外源性唾液酸, 进入人体后会刺激炎症的发生, 增大患癌风险^[26]。因此, 目前很多研究更重视红肉中 Neu5Gc 的解离, 对居民日常消费量同样很高的鱼肉研究相对较少; 在含量测定方面多集中于对 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的测定, 缺乏对 KDN 的测定; 检测一般采用普通的高效液相色谱仪, 出峰时间长。为了解不同品种鱼肉中的唾液酸含量, 本文采用超高效液相色谱建立了水产品中常见唾液酸 Neu5Ac 和 Neu5Gc 以及含量较低的 KDN 的检测方法, 前处理中采用 4, 5-二甲基-1, 2-苯二胺(DMBA)衍生法代替 4, 5-亚甲二氧基-1, 2-邻苯二胺盐(DMB)衍生反应, 并应用建立的方法测定了不同品种鱼肉中的唾液酸含量, 有助于了解膳食中唾液酸的摄入比例以及对人体健康的影响。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Acquity™ Ultra Performance 超高效液相色谱仪(配备荧光检测器, 美国 Waters 公司); MS2 漩涡混合器(德国 IK 公司); Avanti JXN-30 智能型低温超高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Centrivap® 真空冷冻干燥机(美国 Labconco 公司); ZD-85A 气浴恒温振荡器(常州市国旺仪器制造有限公司); Milli-Q Gradient 超纯水净化器(美国 Millipore 公司); N-EVAP112 氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

N-乙酰神经氨酸(CAS 号: 131-48-6, 纯度大于 95%), N-羟乙酰神经氨酸(CAS 号: 1113-83-3, 纯度大于 95%), 酮基-脱氧壬酮糖酸(CAS 号: 153666-19-4, 纯度大于 98%)均购自 Sigma 公司。

4, 5-亚甲二氧基-1, 2-邻苯二胺盐、4, 5-二甲基-1, 2-苯二胺, 购自阿拉丁试剂(上海)有限公司; 盐酸、乙酸、氢氧化钠、连二亚硫酸钠均为分析纯, β -巯基乙醇为生化试剂, 均购自上海国药集团化学试剂有限公司; 乙腈(色谱纯)购自德国 Merck 公司; 实验用水为 Milli-Q 制备超纯水(电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 标准溶液的配制: 准确称取 3 种标准品各 10.00 mg, 分别用水溶解并定

容至10 mL,得到质量浓度均为1.00 mg/mL的单一标准储备液。实验中根据需要用水稀释成不同质量浓度的混合标准工作溶液。

DMB衍生溶液的配制:准确称取29.3 mg DMB、24.4 mg连二亚硫酸钠,加入528 μL β -巯基乙醇、859 μL 乙酸,用水溶解并稀释定容至10 mL。所得衍生溶液中各组分浓度为:13 mmol/L DMB、1.5 mol/L 乙酸、14 mmol/L 连二亚硫酸钠、0.75 mol/L β -巯基乙醇。

DMBA衍生溶液的配制:准确称取67.6 mg DMBA,加入2.29 mL 乙酸,用水溶解并稀释定容至10 mL。所得衍生溶液中各组分浓度为:49 mmol/L DMBA、4.0 mol/L 乙酸。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 将鱼去鳞、去皮,沿脊背取肌肉切成不大于0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm的小块后混匀,充分匀浆,−18 $^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻保存备用。

称取5.0 ~ 10 g 匀质样品置于真空冷冻干燥机中冻干,研磨成粉末。称取1.0 g 粉末于15 mL 离心管中,加入2 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min,加入8 mL 0.6 mol/L 盐酸溶液,80 $^{\circ}\text{C}$ 酸解20 min,冰水浴冷却至室温。停止反应后以13 000 r/min 离心10 min,收集上清液进行衍生反应。

1.2.2 衍生反应 DMB衍生反应:取酸解后的样品上清液或某一浓度的标准溶液100 μL ,与100 μL 衍生化试剂溶液混匀,50 $^{\circ}\text{C}$ 振荡避光衍生90 min,冷却至室温,经0.22 μm 滤膜过滤后待测。

DMBA衍生反应:取酸解后的样品上清液或某一浓度的标准溶液100 μL ,与100 μL 衍生化试剂溶液混匀,60 $^{\circ}\text{C}$ 振荡避光衍生60 min,冷却至室温,经0.22 μm 滤膜过滤后待测。

1.2.3 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);进样量为10 μL ;样品室温度为10 $^{\circ}\text{C}$,柱温为40 $^{\circ}\text{C}$ 。荧光检测器,DMB衍生物:激发波长为373 nm,发射波长为448 nm;DMBA衍生物:激发波长为379 nm,发射波长为432 nm。流动相:A为纯水,B为乙腈,梯度洗脱条件为:0 ~ 1.5 min, 92% A; 1.5 ~ 2.5 min, 92% ~ 91% A; 2.5 ~ 4.0 min, 91% A; 4.0 ~ 4.1 min, 91% ~ 85% A; 4.1 ~ 8.0 min, 85% A; 8.0 ~ 8.3 min, 85% ~ 92% A; 8.3 ~ 11.0 min, 92% A。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

唾液酸具有较强的极性且不稳定,因此需通过衍生以稳定其结构,加强其在 C_{18} 色谱柱上的保留,同时提高检测灵敏度和改善色谱分离度。Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)具有柱效高和分离时间短的特点,实验选择纯水和乙腈作为流动相,通过改进梯度洗脱条件以获得尖锐对称的色谱峰形和最佳的分离度。与糖类衍生物类似,流动相组成对唾液酸衍生物在 C_{18} 柱上的保留影响十分明显。流动相中有机相和水相的比例稍微发生变化均会影响3种唾液酸的出峰时间和分离度。因此梯度洗脱的前4 min 流动相比比例变化缓慢,待3种唾液酸全部出峰后,再提高乙腈比例以快速冲洗杂质,缩短分离时间。通过优化梯度洗脱程序可使Neu5Ac、Neu5Gc和KDN实现良好分离,在4 min 内完全出峰,分离良好,峰形尖锐,且响应值较高。3种唾液酸混合标准溶液(0.02 $\mu\text{g/mL}$)的色谱图如图2所示。

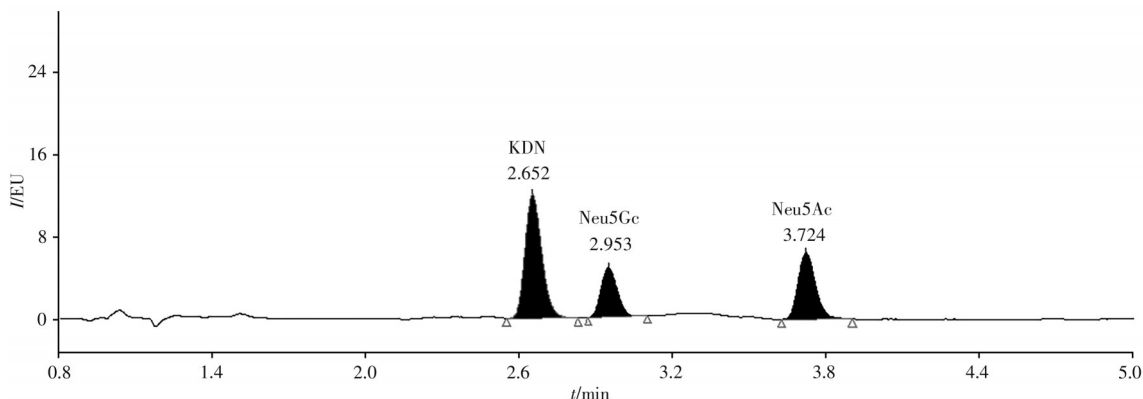


图2 3种唾液酸混合标准溶液(0.02 $\mu\text{g/mL}$)的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of 3 SAs mixed standard solution(0.02 $\mu\text{g/mL}$)

2.2 前处理条件的选择

2.2.1 酸解条件的优化 研究表明酸水解唾液酸的作用强于酶解, 且耗时更短, 其中盐酸的水解效果较好^[27-28]。盐酸酸解的一般条件是在 0.1 mol/L 盐酸中 80 °C 水解 2 h, Ye 等^[19]研究表明, 奶粉样品中唾液酸水解的最佳条件为 0.6 mol/L 盐酸 80 °C 水解 14 min。因此实验以草鱼肉为基质, 以 3 种唾液酸含量为指标, 比较了唾液酸在 80 °C 下 0.1 mol/L 盐酸水解 2 h 以及 80 °C 下 0.6 mol/L 盐酸分别水解 14、20、30、50 min 5 种条件下的水解效率。向处理好的草鱼样品中加入 30 μg/g 标准溶液, 每个酸解条件做 3 个平行。结果表明, 草鱼肉经 0.6 mol/L 盐酸水解 20 min 后 3 种唾液酸的含量达到最大, 随着时间延长, 唾液酸的含量明显降低, 表明 20 min 时唾液酸已降解完全, 而反应时间过长会使得单体结构不稳定的唾液酸发生降解。因此, 选择酸解条件为 80 °C 下 0.6 mol/L 盐酸水解 20 min。

2.2.2 衍生条件的优化 唾液酸的衍生试剂包括邻苯二胺类、苯胺类、甲基化试剂碘甲烷、烷基胺类试剂等。其中邻苯二胺类试剂 DMB 具有荧光信号强、灵敏度高优势, 但 DMB 衍生方法也存在缺点^[29]: DMB 及其衍生物具有光敏感性, 暴露在空气中易被氧化变色, 自然光室温下超过 24 h 即不稳定, 必须避光-20 °C 冷冻保存, 不利于大批量样品的检测和储存, 因此配制衍生试剂中常会加入连二亚硫酸钠和 β-巯基乙醇等还原剂使其稳定。但 β-巯基乙醇具有较强烈的刺激性气味, 连二亚硫酸钠有毒, 对眼睛、呼吸道黏膜有刺激性, 导致 DMB 衍生试剂具有非常刺激的气味, 不利于人体健康。DMBA 与 DMB 同属邻苯二胺类衍生试剂^[30], 但前者更稳定, 无需还原试剂辅助, 且在唾液酸异构体的分离方面具有更好优势^[31]。本实验选择 DMBA 作为衍生试剂, 以草鱼肉样品为考察对象, 3 种物质的含量为指标, 考察了样品溶液和 DMBA 衍生溶液的体积比(9:1、3:1、2:1、1:1、1:2)、衍生反应温度(50、60、70 °C)和衍生时间(30、60、90、120 min)3 个因素对 DMBA 衍生效果的影响(图 3)。

如图 3 所示, 优化后选择的衍生条件为: 样品溶液和 DMBA 衍生溶液的体积比为 1:1, 反应温度为 60 °C, 反应时间为 60 min。在该条件下的衍生效果与 DMB 的衍生效果相近。

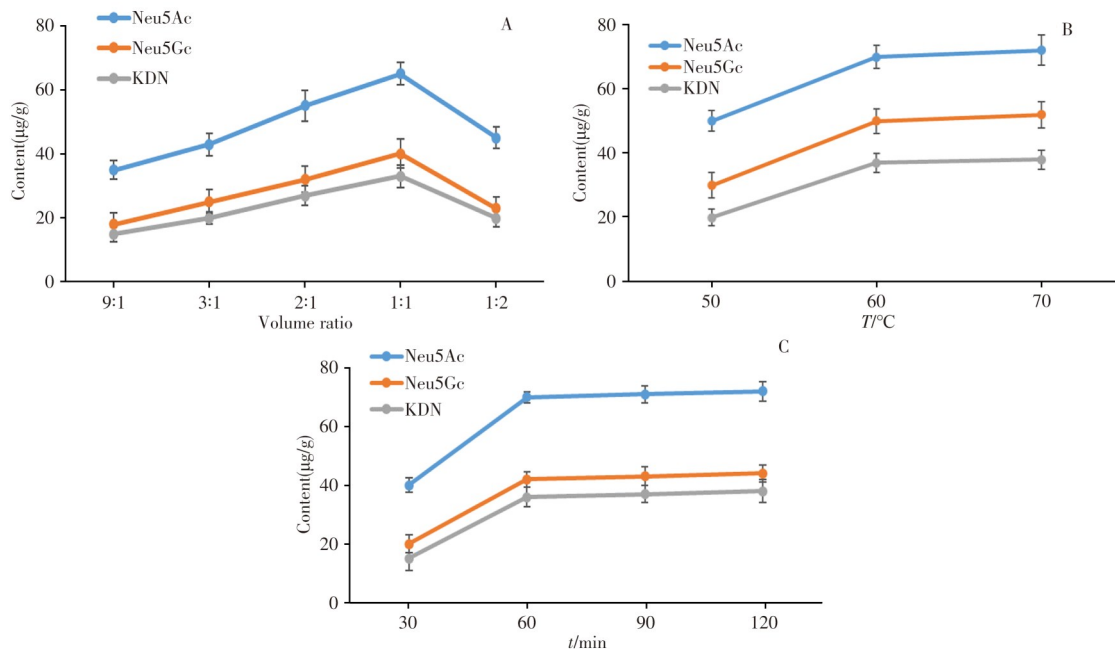


图 3 样品溶液和 DMBA 衍生试剂的体积比(A)、衍生反应温度(B)、衍生反应时间(C)对唾液酸释放量的影响

Fig. 3 Effects of volume ratio of sample solution to DMBA derived reagent(A), derivative reaction temperature(B) and derivative reaction time(C) on sialic acid release

2.3 线性范围与定量下限

将 3 种分析物的混合标准溶液配制成质量浓度分别为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 μg/mL 的标准工作溶液, 采用本方法进行衍生和测定, 以 3 种物质的色谱峰面积(y)对其质量浓度(x, μg/mL)进行线性回归, 绘制标准曲线。结果表明, Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 在 0.02 ~ 5.0 μg/mL 范围内线性良好, 相关系数(r^2)均大于 0.999(见表 1)。因鱼肉中 KDN 的含量比其他 2 种物质低 1 个数

量级^[24-25], 为得到更加准确的含量, 实际样品检测和含量计算中 Neu5Ac、Neu5Gc 的测定以 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作溶液绘制标准曲线; KDN 的测定以 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作溶液绘制标准曲线。将 3 种唾液酸混合标准溶液稀释并衍生化后进行测定, 以 10 倍信噪比计算得到 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 的定量下限(LOQ)分别为 0.20、0.20、0.10 $\mu\text{g/g}$ 。

表 1 3 种唾液酸的线性关系、回收率和相对标准偏差($n=5$)
Table 1 Linear relations, recoveries and RSDs of 3 sialic acids($n=5$)

Analyte	Linear equation	Correlation coefficient (r^2)	Spiked ($\mu\text{g/g}$)	Grass carp(草鱼)		Larimichthys crocea(大黄鱼)	
				Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)
Neu5Ac $y = 2.26 \times 10^7 x + 2.38 \times 10^5$		0.999 86	0.2	91.5	3.5	96.4	4.0
			1.0	90.8	4.0	91.7	3.8
			5.0	98.5	2.8	103	2.9
Neu5Gc $y = 1.07 \times 10^7 x + 9.21 \times 10^3$		0.999 95	0.2	93.7	3.9	99.8	4.2
			1.0	98.4	4.1	95.2	4.3
			5.0	99.5	3.2	98.7	5.0
KDN $y = 1.33 \times 10^7 x + 9.03 \times 10^4$		0.999 91	0.1	95.7	5.0	92.8	3.9
			0.5	96.3	3.5	96.7	4.7
			2.5	102	3.9	98.9	4.1

2.4 方法回收率与相对标准偏差

分别以草鱼和大黄鱼空白样品为基质, 加入低、中、高 3 个浓度水平的混合标准溶液, 酸解后衍生, 进行加标回收实验(表 1)。结果表明, 3 种唾液酸的平均回收率为 90.8%~103%, 相对标准偏差(RSD)为 2.8%~5.0%, 方法精密度和准确度可满足检测要求。

2.5 实际样品分析

应用建立的方法测定了草鱼、鲫鱼、青鱼、黄姑鱼、鲈鱼、大黄鱼等常见淡水和海水鱼的 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 含量。结果显示, 所测鱼肉中 Neu5Ac 的含量均较高, 且远高于 KDN 的含量; Neu5Gc 未检出。其中青鱼样品的 Neu5Ac 含量最高(见表 2), 色谱图见图 4。

表 2 实际样品中 3 种唾液酸的含量
Table 2 Contents of 3 SAs in practical samples

Analyte	Content($\mu\text{g/g}$)					
	Grass carp(草鱼)	Crucian(鲫鱼)	Piceus(青鱼)	Nibea albiflora(黄姑鱼)	Perch(鲈鱼)	Larimichthys crocea(大黄鱼)
Neu5Ac	37.3	42.0	61.1	33.0	42.7	41.5
Neu5Gc	—*	—	—	—	—	—
KDN	0.47	—	—	0.30	0.53	0.47

*not detected

3 结 论

本文建立了 DMBA 衍生/超高效液相色谱测定鱼肉中 3 种核心唾液酸的方法, 前处理中选择 DMBA 作为衍生试剂代替 DMB, 并对衍生条件进行了优化。该方法测定时间短, 灵敏度高, 精密度好, 线性良好, 已成功应用于鱼肉中唾液酸的测定。研究结果可为今后开展唾液酸的乙酰化、甲基化等多种同分异构体的分离和鉴定提供基础。

参考文献:

- [1] Angata T, Varki A. *Chem. Rev.*, **2002**, 102(2): 439–470.
- [2] Schauer R, Kamerling J P. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **2018**, 75: 1–213.
- [3] Varki A, Cummings R D, Esko J D. *Essentials of Glycobiology*. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2009**: 784.
- [4] Yu H, Chokhawala H A, Huang S, Chen X. *Nat. Protoc.*, **2006**, 1(5): 2485–2492.
- [5] Varki A, Schnaar R L, Schauer R. *Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids*. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2022**: 179–195.

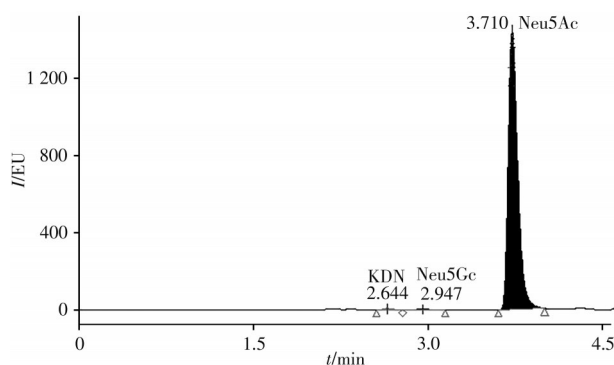


图 4 青鱼样品的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of a black carp sample

- [6] Fong B Y, Ma L, Khor G L, Yvonne V D D, Rowan A, Mcjarrow P, Macgibbon A K H. *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, 64(32): 6295 – 6305.
- [7] Nie H, Li Y, Sun X L. *J. Proteomics*, **2012**, 75(11): 3098 – 3112.
- [8] Varki A, Gagneux P. *Ann. Ny. Acad. Sci.*, **2012**, 1253(1): 16 – 36.
- [9] Wang B, Brand – Miller J. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **2003**, 57(11): 1351 – 1369.
- [10] Rajaram S, Danasekaran B, Venkatachalapathy R, Vishnu P K, Rajaram S. *Dent. Res. J. (Isfahan)*, **2017**, 14(1): 267.
- [11] Goodarzi M T, Shafiei M, Nomani H, Shahriarahmadi A. *Iran. J. Basic. Med. Sci.*, **2015**, 30(3): 124 – 127.
- [12] Krishnan K, Balasundaram S. *J. Clin. Diagn. Res.*, **2017**, 11(3): ZC25 – ZC27.
- [13] Zhou X, Yang G, Guan F. *Cells*, **2020**, 9(2): 273.
- [14] Cheeseman J, Kuhnle G, Daniel S I R, Osborn H M I. *Bioorgan. Med. Chem.*, **2021**, 30(1): 115882.
- [15] Lacomba R, Salcedo J, Alegria A, Jesús L M, Barberá R, Matencio E. *J. Pharm. Biomed.*, **2010**, 51(2): 346 – 357.
- [16] Feng T Y, Xue C H, Sun T, Cui H B, Xu J. *Food Sci.* (冯婷玉, 薛长湖, 孙通, 崔宏博, 徐杰. 食品科学), **2010**, 31(8): 233 – 236.
- [17] Lai Y F, Hu J, Wang Y P, Wu Z J, Zhang Q G. *China Food Addit.* (赖源发, 胡佳, 王鋈萍, 吴振洁, 张启国. 中国食品添加剂), **2015**, 4: 185 – 189.
- [18] Xie H L, Li C, Liu N. *Chin. J. Chromatogr.* (解鸿蕾, 李春, 刘宁. 色谱), **2013**, 31(8): 781 – 785.
- [19] Ye L Y, Mu L, Li G, Yi B B. *J. Food Compos. Anal.*, **2020**, 87(7): 103393.
- [20] Feng J, Yang G Y, Li H J, Han L Q, Lin M W. *Food Sci.* (冯君, 杨国宇, 李宏基, 韩立强, 林茂旺. 食品科学), **2008**, 29(5): 355 – 357.
- [21] Priego – Capotea F, Orozco – Solanoa M I, Calderón – Santiagoa M, Luque de Castroab M D. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1346: 88 – 96.
- [22] Yu H Z, Li Y H, Huang A S. *Talanta*, **2021**, 232: 122434.
- [23] Zhao F, Chen B Y, Li K F, Wang X. *Food Sci.* (赵非, 陈宝英, 李克峰, 王旭. 食品科学), **2021**, 42(4): 313 – 318.
- [24] Ji S N, Wang F, Chen Y, Zhang P, Zhang X, Troy F A, Wang B. *Glycoconjugate J.*, **2017**, 34(1): 21 – 30.
- [25] Wang M M. *Establishment and Optimization of Method for Sialic Acid Detection from Animal-originated Foods and the High-throughput Method for Sialylated Conjunction Extraction*. Nanjing: Nanjing Agricultural University (王毛毛. 膳食中唾液酸测定及唾液酸复合物高通量提取方法研究), 南京: 南京农业大学, **2015**.
- [26] Samraj A N, Laubli H, Varki N, Varki A. *Front. Oncol.*, **2014**, 33(4): 1 – 13.
- [27] Nkeonye O L, Sallau A B, Ihuoma O, Ameh D A, Okpe O, Arekemase I S O. *J. Biochem. Cell Biol.*, **2015**, 4(1): 1 – 9.
- [28] Yang Y, Jiao S L, Zhu M Q, Gao W Y. *Chem. Eng.* (杨阳, 焦淑玲, 朱美旗, 高文运. 化学工程师), **2020**, 9: 51 – 56.
- [29] Du J J, Zhang Q W, Li J J, Zheng Q. *Anal. Methods*, **2020**, 17: 2221 – 2227.
- [30] Zhang Q W, Zheng Q. *Chin. J. Chromatogr.* (张启伟, 郑琦. 色谱), **2019**, 37(12): 1261 – 1267.
- [31] Du J J. *Structural Identification of Natural Sialic Acid Isomers and the Study and Application of its Relative Quantitative Analysis Method*. Wuhan: Jiangnan University (杜俊杰. 天然唾液酸同分异构体的结构鉴定及相对定量分析方法的研究与应用), 武汉: 江汉大学, **2020**.

(责任编辑: 丁 岩)