

利用 UPLC – TOF – MS 测定成熟母乳及婴幼儿 配方奶粉中主要神经节苷酯含量

翁加玉¹, 张星河¹, 林瑞雪¹, 季国志², 张 莉²,
陈 云², 韦 伟¹, 金青哲¹, 王兴国¹

(1. 江南大学 食品学院, 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122;
2. 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011500)

摘要:建立了超高效液相色谱结合飞行时间质谱法分析成熟母乳中主要神经节苷酯双唾液酸神经节苷酯 GD3 和单唾液酸神经节苷酯 GM3 的含量。通过 C18 柱将不同结构的神经节苷酯进行分离, 并在 ESI 负离子模式下进行分析。用外标法对 GD3 和 GM3 进行了定量, 并对该方法进行方法学验证。结果表明:神经节苷酯 GD3、GM3 分别在 5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.1 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好, 相关系数均大于等于 0.962 0, 神经节苷酯 GD3 和 GM3 的定量限分别为 2.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加标回收率为 92.15% ~ 111.78%, 精密度小于等于 6.07%。成熟母乳中神经节苷酯 GD3 和 GM3 含量分别为 $(9.61 \pm 3.32) \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $(2.08 \pm 1.39) \mu\text{g}/\text{mL}$; 4 种婴幼儿配方奶粉中 GD3 含量略高于成熟母乳, 但未检出 GM3。

关键词:神经节苷酯; 成熟母乳; 婴幼儿配方奶粉; 母乳脂肪

中图分类号: TS201.4; O657 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)11-0132-07

Determination of content of main gangliosides in mature human milk and infant formula by UPLC – TOF – MS

WENG Jiayu¹, ZHANG Xinghe¹, LIN Ruixue¹, JI Guozhi², ZHANG Li²,
CHEN Yun², WEI Wei¹, JIN Qingzhe¹, WANG Xingguo¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;
2. Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Co., Ltd., Hohhot 011500, China)

Abstract: An ultra-performance liquid chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry method was established to analyze the contents of the main gangliosides (disialoganglioside GD3 and monosialoganglioside GM3) in mature human milk. The gangliosides of different molecular species were separated by C18 column and analyzed in ESI negative ion mode. The external standard method was used to quantify GD3 and GM3, and the method was validated. The results showed that gangliosides GD3 and GM3 had a good correlation coefficient ($R^2 \geq 0.9620$) in the range of 5 – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.1 – 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The limits of quantification of gangliosides GD3 and GM3 were 2.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. They also demonstrated reasonable recovery rates (92.15% – 111.78%) and precision (relative standard deviation $\leq 6.07\%$). The contents of gangliosides GD3 and GM3 in mature human milk were $(9.61 \pm 3.32) \mu\text{g}/\text{mL}$ and $(2.08 \pm 1.39) \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The content of gangliosides GD3 in 4 infant formulas was slightly higher than that in mature human milk, but gangliosides GM3 was not detected in all infant formulas.

(9.61 \pm 3.32) $\mu\text{g}/\text{mL}$ and (2.08 \pm 1.39) $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The content of gangliosides GD3 in 4 infant formulas was slightly higher than that in mature human milk, but gangliosides GM3 was not detected in all infant formulas.

Key words: ganglioside; mature human milk; infant formula; human milk fat

收稿日期: 2020-12-04; 修回日期: 2021-06-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31701558)

作者简介: 翁加玉(1997), 女, 在读硕士, 研究方向为食品工程(E-mail) 2430974035@qq.com。

通信作者: 韦 伟, 副教授(E-mail) weiw@jiangnan.edu.cn;
陈 云, 高级工程师(E-mail) chenyun@mengniu.cn。

神经节苷酯是一种酸性鞘糖脂,由疏水神经酰胺核和亲水低聚糖链组成,具有不同数量的唾液酸基。神经酰胺由鞘氨醇和脂肪酸组成,随链长和饱和度而变化^[1-3];唾液酸基如正乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac)通过糖苷键与单糖单位或另一个唾液酸基连接而成(见图1)^[4]。神经节苷酯在神经组织中以较高浓度存在^[5],但在体液和母乳中也存在较低浓度的神经节苷酯^[6-8]。目前已经有很多关于具有特定功能的神经节苷酯的研究。神经节苷酯在记忆形成、稳定神经元回路、突触传递、细胞间信号识别和跨膜信号转导中起重要作用^[9-10]。母乳中的神经节苷酯是新生儿正常神经元发育必不可少的生物活性化合

物,它们可能调节免疫系统,支持肠道成熟,抗肠道病原体黏附,并刺激婴儿肠道中双歧杆菌的增殖^[11-12]。双唾液酸神经节苷酯 GD3 (Neu5Ac - Neu5Ac - galactose - glucose - ceramide) 和单唾液酸神经节苷酯 GM3 (Neu5Ac - galactose - glucose - ceramide) 是乳和乳制品中神经节苷酯组分的主要成分。通常将产后 0 ~ 7 d 分泌的乳汁称为初乳, 7 ~ 14 d 分泌的乳汁称为过渡乳, 15 d 之后分泌的乳汁称为成熟乳。GD3 是人初乳和婴儿配方奶粉中的主要神经节苷酯, 可占神经节苷酯总量的 50% ~ 80%, 而 GM3 则以微量存在。从过渡乳到成熟乳, 母乳中 GM3 含量逐渐增加到 50% 以上, GD3 含量下降^[13]。

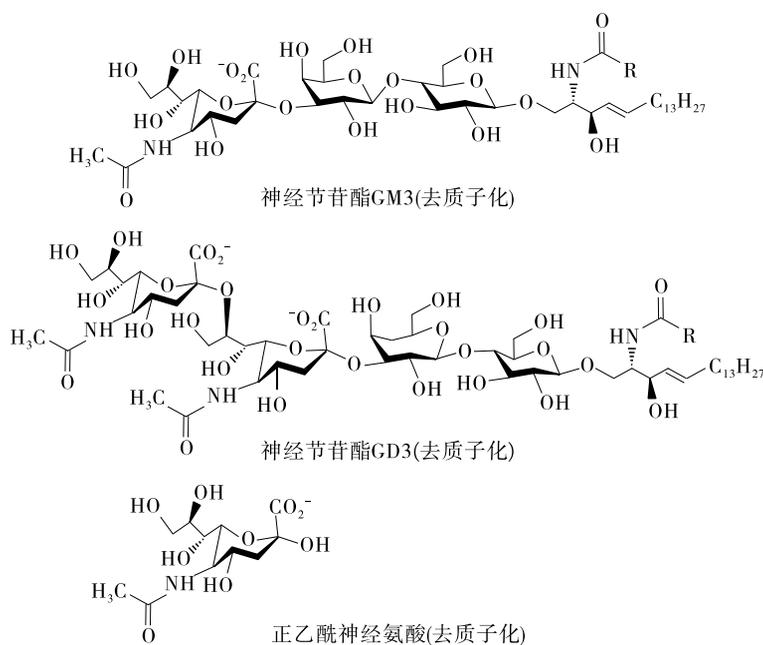


图1 神经节苷酯 GM3 和 GD3 的化学结构

目前液相色谱(LC)或者超高效液相色谱(UPLC)是近年来应用较为广泛的测定神经节苷酯的技术,与薄层层析(TLC)^[1, 14]和高效薄层层析(HPTLC)等^[13, 15-19]传统方法相比,具有更高的灵敏度、选择性和重现性,结合质谱技术的应用^[20-27],使神经节苷酯的分离测定有了很大突破。但母乳中神经节苷酯含量较低且基质成分复杂,从中提取神经节苷酯较为困难,目前并没有关于母乳中神经节苷酯测定的官方方法,故关于母乳中神经节苷酯含量的数据较少^[13, 28]。基于神经节苷酯的生物学功能,对母乳中神经节苷酯进行深入研究具有重要意义。

基于此,本文研究采用超高效液相色谱结合飞行时间质谱法(UPLC-TOF-MS)对成熟母乳和婴

儿配方奶粉中的 GD3 和 GM3 进行快速定量分析,以期为提高婴儿的营养状况以及婴幼儿配方奶粉产业的发展提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

母乳样品均为成熟乳,由国内 9 位健康母亲提供,均为足月生产,样品采集后保存至 -80 °C 冰箱中,24 h 内进行分析检测。婴儿配方奶粉均由相关官方旗舰店购入,基本信息如表 1 所示。

甲醇、氯仿等均为分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司;甲醇、乙酸铵均为色谱纯,美国 Sigma 公司;源于牛乳的 GM3 标准品(纯度 > 98%)、GD3 标准品(纯度 > 98%),瑞典 Larodan 公司。

表1 婴儿配方奶粉基本信息

样品编号	配方中的油脂成分	脂肪含量/(g/100 g)	其他
1	精炼植物油、ARA、DHA	27.0	浓缩乳清蛋白粉
2	植物油、大豆卵磷脂	18.7	浓缩乳清蛋白粉
3	全脂牛乳粉、高油乳清粉(脱盐乳清、稀奶油、植物油、磷脂)、ARA、DHA	25.5	乳清蛋白粉
4	全脂牛乳、稀奶油、植物油、金枪鱼油、ARA	27.0	浓缩乳清蛋白粉

注:ARA为花生四烯酸油脂,DHA为二十二碳六烯酸油脂。

Acquity 超高效液相色谱仪(UPLC)、Synapt TOF-MS 质谱仪,美国 Waters 公司;SE812 型氮吹仪,上海安谱实验科技股份有限公司;TLC 硅胶板(TLC Silica gel 60 F₂₅₄, 20 cm × 20 cm),德国 Merck 公司;Centrifuge 5810 离心机,德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳中神经节苷酯的提取

根据 Fong 等^[29]的方法提取神经节苷酯,并稍作改动。取 0.5 mL 母乳或乳状液于 15 mL 离心管中,其中乳状液由 1 g(精确至 0.000 1 g)婴儿配方奶粉与 10 mL(65 ± 5)℃ 的水混合至完全分散后冷却制成。加入 1 mL 水混合均匀后,在室温下加入 2.70 mL 甲醇和 1.35 mL 氯仿。将该混合物在摇床上轻轻摇动 30 min,然后在 2 000 r/min 下离心 20 min。将上清液转移至 15 mL 离心管中,使用 0.5 mL 水和 2 mL 氯仿-甲醇(体积比 1:2)再次萃取沉淀,混合并离心(2 000 r/min, 20 min)后,合并上清液,弃去沉淀。向上清液中加入 1.3 mL 水并轻轻倒置 3~4 次,然后于 2 000 r/min 下离心 30 min。将上层相转移至 10 mL 离心管中。将 0.5 mL 0.01 mol/L KCl 溶液添加到下层相中,并于 2 000 r/min 下离心 20 min。将上层相合并到 10 mL 离心管中,氮吹至干,加入 0.5 mL 色谱级甲醇复溶,待 UPLC-TOF-MS 分析。

1.2.2 UPLC-TOF-MS 分析条件

Acquity BEH C18 柱(50 m × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相 A 为 1 mol/L 甲醇-乙酸铵溶液(体积比 100:1),流动相 B 为 1 mol/L 甲醇-水-乙酸铵(体积比 85:15:1);梯度洗脱程序为 0 min 100% B, 10 min 100% A, 12 min 100% A, 12.1~15 min 100% B;流速 0.2 mL/min;进样量 2 μL。电喷雾电离(ESI)源;毛细管电压和锥孔电压分别为 3.0 kV 和 35 V;离子源温度和去溶剂化温度分别为 100℃ 和 400℃;碰撞气体为氩气,去溶剂化气体流速 700 L/h。在测量模式下收集 m/z 50~1 500 之间的数据。

1.2.3 神经节苷酯分析方法验证

为了探明基质的影响,采用不同母乳样品对本方法进行验证,评价其线性范围、检出限(LOD)、定量限(LOQ)、加标回收率和精密度。将 GM3 和 GD3 标准品用色谱级甲醇逐级稀释 5 个梯度,分别进样,其中 GD3 标准品溶液的质量浓度分别为 5、10、50、100、200 μg/mL,GM3 标准品溶液的质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μg/mL。将所得的总离子流图上各类神经节苷酯的峰面积对质量浓度作图,绘制标准曲线,计算回归系数。每个样品重复 3 次,取平均值作为最终的峰面积。将 GD3 和 GM3 标准品溶液逐级稀释,在总离子流图上,取信噪比为 3 时对应的质量浓度为 LOD,信噪比为 10 时对应的质量浓度为 LOQ。对 3 个不同质量浓度水平的 GD3 和 GM3 溶液的加标回收率进行了研究。根据前期测得的样品中 GM3、GD3 的含量范围,在同一母乳样品中加入低、中、高水平(10、50、100 μg/mL 的 GD3, 3、5、7 μg/mL 的 GM3)的神经节苷酯标准溶液,另选一份母乳样品作为对照,对加标样品按 1.2.1 方法提取后进样分析。方法的精密度通过对样品重复检测得出,日内精密度由样品平行检测 3 次计算重复性所得,日间精密度通过连续 3 d 检测同一样品所得。

2 结果与讨论

2.1 神经节苷酯的定性

在 ESI⁻ 条件下,溶于甲醇溶液的 GM3 和 GD3 可以产生高丰度的单电荷[M-H]⁻或双电荷[M-2H]²⁻准分子离子。神经节苷酯的质谱图根据神经酰胺部分脂肪酸和鞘氨醇的链长而变化。GM3 和 GD3 的准分子离子在碰撞中可破碎得到 m/z 290 的产物离子,其对应于糖苷键断裂后得到的 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)碎片。母乳中检出了 6 种 GD3(准分子离子 m/z 分别为 721、736、749、763、770 和 777)和 4 种 GM3(准分子离子 m/z 分别为 1 152、1 208、1 236 和 1 264),图 2、图 3 分别为母乳样品中神经节苷酯 GD3-763(准分子离子 m/z 为 763 的 GD3)和 GM3-1236(准分子离子 m/z 为 1 236 的

GM3)的提取离子峰。从图2、图3可以看出,该方法具有良好的分离效果,测定的分子种类的保留时

间在3~7 min范围内,分析时间为15 min,缩短了分析时间,有利于大批量样品的检测。

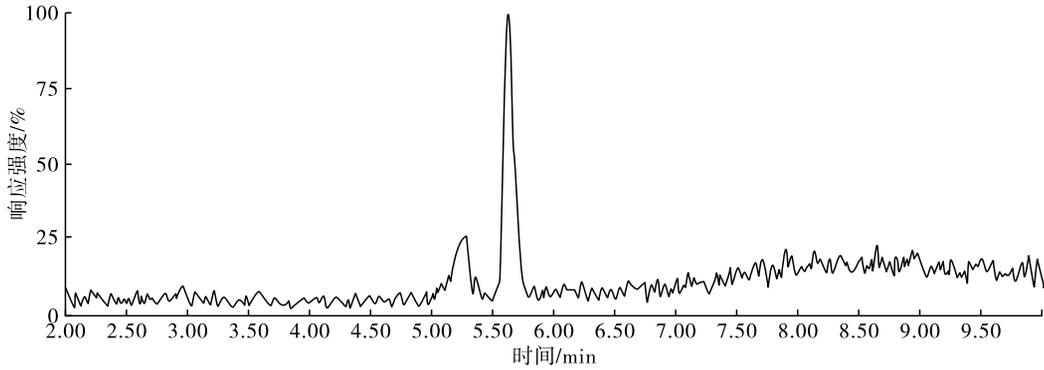


图2 母乳中GD3-763的提取离子色谱图

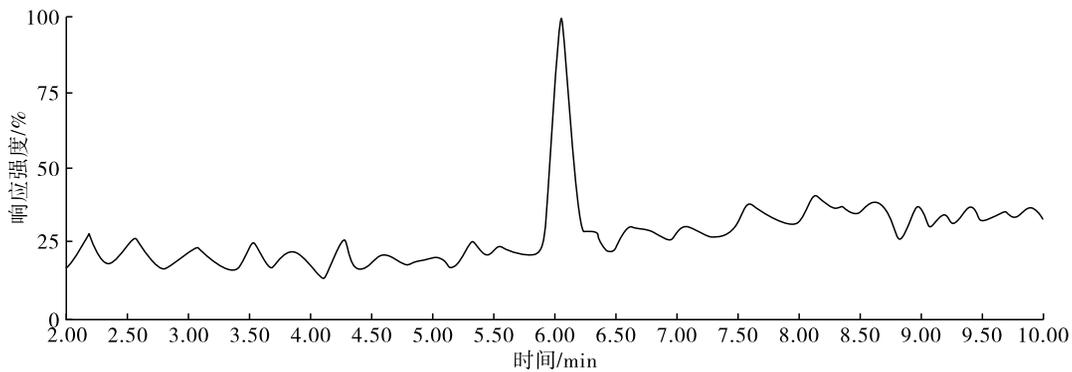


图3 母乳中GM3-1236的提取离子色谱图

2.2 神经节苷酯的定量

神经节苷酯的定量参照 Giuffrida 等^[30]的计算方法。母乳脂肪神经节苷酯的成分复杂,用外标法对其每种神经节苷酯成分进行准确定量很困难,因此GD3或GM3标准品中单个神经节苷酯分子种类的比例是根据总离子流图上所得的各类神经节苷酯的峰面积与所有GM3或GD3分子峰面积之和的比

$$C_{\text{GD3}} = \sum_{n=0}^8 \left(C'_{\text{GD3}(721+7n) \rightarrow 290} \times \frac{A_{\text{GD3}(721+7n) \rightarrow 290}}{\sum_{n=0}^8 A_{\text{GD3}(721+7n) \rightarrow 290}} \times 100\% \right) \quad (1)$$

$$C_{\text{GM3}} = \sum_{n=0}^9 \left(C'_{\text{GM3}(1152+14n) \rightarrow 290} \times \frac{A_{\text{GM3}(1152+14n) \rightarrow 290}}{\sum_{n=0}^9 A_{\text{GM3}(1152+14n) \rightarrow 290}} \times 100\% \right) \quad (2)$$

式中: $A_{\text{GD3}(721+7n) \rightarrow 290}$ 、 $A_{\text{GM3}(1152+14n) \rightarrow 290}$ 分别为各类GD3、GM3分子的提取峰面积; $C'_{\text{GD3}(721+7n) \rightarrow 290}$ 、 $C'_{\text{GM3}(1152+14n) \rightarrow 290}$ 为根据线性回归方程计算出的提取物中神经节苷酯GD3、GM3质量浓度; C_{GD3} 、 C_{GM3} 为提取物中神经节苷酯GD3、GM3的实际质量浓度。

2.3 方法验证

将梯度稀释的GD3标准品溶液和GM3标准品溶液分别进样,以标准品溶液的质量浓度(x)为横坐标,提取离子峰的峰面积(y)为纵坐标进行线性回归分析,线性回归方程如表2所示。

值来计算。根据线性回归方程计算出的神经节苷酯质量浓度,乘以相应的比例可计算得出样品提取物中单个神经节苷酯分子种类的质量浓度。因此,样品提取物中GD3或GM3的总质量浓度为每个神经节苷酯分子种类质量浓度的总和,可根据下式计算。通过适当的浓缩系数计算可得到样品中GD3、GM3的质量浓度。

由表2可知,当GD3在5~200 $\mu\text{g/mL}$ 、GM3在0.1~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围时具有良好的线性关系,相关系数均大于等于0.9620。

将神经节苷酯标准品溶液连续稀释直到信噪比分别达到3和10,用Masslynxv4.1仪器软件分析得到LOD和LOQ。神经节苷酯GD3的LOD和LOQ分别为0.82 $\mu\text{g/mL}$ 和2.75 $\mu\text{g/mL}$,GM3的LOD和LOQ分别为0.02 $\mu\text{g/mL}$ 和0.29 $\mu\text{g/mL}$ 。

分别对3个质量浓度水平的GM3和GD3标准品溶液进行加标回收率的测定,结果见表3。

表2 GM3 和 GD3 的线性回归方程

神经节苷酯	准分子离子 (m/z)	回归曲线方程	相关系数 (R^2)
GD3	721	$y = 2.105 2x - 15.879$	0.989 1
	728	$y = 0.093 0x - 2.775$	0.962 0
	735	$y = 0.322 6x - 4.316 3$	0.973 3
	742	$y = 0.157 3x - 2.918 9$	0.972 3
	749	$y = 1.308 4x - 9.569 9$	0.984 4
	756	$y = 1.777 5x - 7.693 8$	0.993 2
	763	$y = 2.931 4x - 3.635 7$	0.995 5
	770	$y = 3.622 3x - 7.120 1$	0.995 7
	777	$y = 2.917 5x - 13.358$	0.992 7
GM3	1 152	$y = 3.002 8x + 0.092 1$	0.995 2
	1 208	$y = 3.106 0x + 0.015 3$	0.999 1
	1 222	$y = 6.203 8x - 0.003 9$	0.999 8
	1 236	$y = 14.694 0x + 0.043 5$	0.999 2
	1 249.9	$y = 19.725 0x + 1.126 1$	0.999 7
	1 264	$y = 14.358 0x + 0.958 8$	0.999 4
	1 278	$y = 2.739 1x + 0.036 6$	0.998 3

表3 GM3 和 GD3 的加标回收率 %

神经节苷酯	低水平	中水平	高水平
GD3	106.89	92.15	105.89
GM3	111.78	109.17	92.50

由表3可知, GD3 的加标回收率范围为 92.15% ~ 106.89%, GM3 的加标回收率范围为 92.50% ~ 111.78%, 表明该方法加标回收率良好, 可满足样品测定分析的需求。

为评价此方法的精密度, 对 GM3 和 GD3 标准品的日内和日间精密度进行测定, 结果如表4所示。

表4 GM3 和 GD3 标准品的精密度 %

神经节苷酯	日内精密度	日间精密度
GD3	2.84	6.07
GM3	0.20	0.93

由表4可知, GD3 的日内和日间精密度分别为 2.84% 和 6.07%, GM3 的日内和日间精密度分别为 0.20% 和 0.93%, 表明所建立的方法能够满足定量分析的要求。

2.4 成熟母乳及婴儿配方奶粉中神经节苷酯的含量

采用该方法对成熟母乳和婴儿配方奶粉中的神经节苷酯含量进行测定, 结果如表5所示。

表5 成熟母乳和市售婴儿配方奶粉中神经节苷酯的含量 $\mu\text{g/mL}$

样品	GD3	GM3	GD3 + GM3
成熟母乳	9.61 ± 3.32	2.08 ± 1.39	11.69 ± 4.57
婴儿配方奶粉 1	16.94 ± 5.72	-	16.94 ± 5.72
婴儿配方奶粉 2	14.30 ± 0.58	-	14.30 ± 0.58
婴儿配方奶粉 3	10.25 ± 0.75	-	10.25 ± 0.75
婴儿配方奶粉 4	23.55 ± 12.06	-	23.55 ± 12.06

由表5可知, 成熟母乳中的 GD3 和 GM3 含量分别为 $(9.61 \pm 3.32) \mu\text{g/mL}$ 和 $(2.08 \pm 1.39) \mu\text{g/mL}$, 二者总含量为 $(11.69 \pm 4.57) \mu\text{g/mL}$ 。本研究成熟母乳中的 GD3 和 GM3 总含量与文献[31-32]研究结果相比偏低, 其中 GD3 含量与文献结果相近 ($0.9 \sim 20.3 \mu\text{g/mL}$), 但 GM3 含量略低于文献结果 ($4.3 \sim 21.4 \mu\text{g/mL}$)^[21, 30, 33-34]。之前大多数研究中发现, GM3 含量随着哺乳期的延长显著增加, 而 GD3 含量逐渐下降, 在哺乳初期, GD3 含量较高, 之后 GM3 和 GD3 的含量逐渐均衡, 直到最终成熟母乳中 GM3 具有较高的含量^[17, 21, 29-30, 33-37]。但本研究中成熟母乳的 GM3 含量低于 GD3 含量, 原因可能是母亲的个体差异、地理位置、饮食习惯的不同, 对于母乳中神经节苷酯含量随哺乳阶段的变化还需要进一步的研究。

由表5可以看出, 婴儿配方奶粉中神经节苷酯的含量和组成均与成熟母乳存在一定的差异。婴儿配方奶粉中 GD3 含量在 $10.25 \sim 23.55 \mu\text{g/mL}$ 范围内, 略高于成熟母乳中 GD3 含量, 且 4 种婴儿配方奶粉中均未检出 GM3, 可能是因为婴儿配方奶粉中 GM3 含量低于本方法的检出限。目前大多数关于婴儿配方奶粉的研究中发现其神经节苷酯总含量均高于母乳^[13, 19, 36], 其中 GD3 含量通常最丰富, GM3 含量极少或未检出^[21], 与本研究结果相似, 这可能是因为婴儿配方奶粉大多是以牛乳为原料。

3 结论

本文对母乳中最丰富的神经节苷酯 GD3 和 GM3 的定量方法进行了研究, 并应用此方法研究了成熟母乳中神经节苷酯 GD3 和 GM3 的含量, 并与市售婴儿配方奶粉进行了对比。结果表明: 神经节苷酯 GD3、GM3 分别在 $5 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.1 \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 相关系数均大于等于 0.962 0, 神经节苷酯 GD3 和 GM3 的定量限分别为 $2.75 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.29 \mu\text{g/mL}$, 加标回收率为 92.15% ~ 111.78%, 精密度小于等于 6.07%。成熟母乳中的 GD3 和 GM3 含量分别为 $(9.61 \pm 3.32) \mu\text{g/mL}$ 和 $(2.08 \pm 1.39) \mu\text{g/mL}$, 而 4 种婴儿配方奶粉中只检出 GD3, 含量 ($10.25 \sim 23.55 \mu\text{g/mL}$) 高于成熟母乳。本研究分析的母乳均为成熟乳, 样本量较少, 后续可用此方法对不同哺乳阶段、不同地区的母乳和更多的婴儿配方奶粉进行分析, 为婴幼儿配方奶粉更好地模拟母乳提供数据支撑。

参考文献:

- [1] TAKAMIZAWA K, IWAMORI M, MUTAI M, et al. Selective changes in gangliosides of human milk during lactation: a molecular indicator for the period of lactation[J]. Biochim

- Biophys Acta, 1986, 879(1): 73–77.
- [2] HAUTTECOEUR B, SONNINO S, GHIDONI R. Characterization of two molecular species GD3 ganglioside from bovine buttermilk[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 833(2): 303–307.
- [3] BODE L, BEERMANN C, MANK M, et al. Human and bovine milk gangliosides differ in their fatty acid composition[J]. *J Nutr*, 2004, 134(11): 3016–3020.
- [4] SØRENSEN L K. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric approach for the determination of gangliosides GD3 and GM3 in bovine milk and infant formulae[J]. *Rapid Comm Mass Spectr*, 2010, 20(24): 3625–3633.
- [5] TETTAMANTI G, BONALI F, MARCHESINI S, et al. A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides[J]. *Biochim Et Biophys Acta*, 2016, 296(1): 160–170.
- [6] PHAM P H, DUFFY T L, DMYTRASH A L, et al. Estimate of dietary ganglioside intake in a group of healthy Edmontonians based on selected foods[J]. *J Food Compos Anal*, 2011, 24(7): 1032–1037.
- [7] LI S C, CHIEN J L, WAN C C, et al. Occurrence of glycosphingolipids in chicken egg yolk[J]. *Biochem J*, 1978, 173(2): 697–699.
- [8] FONG B Y, MA L, KHOR G L, et al. Ganglioside composition in beef, chicken, pork, and fish determined using liquid chromatography – high – resolution mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(32): 6295–6305.
- [9] PAUL M, NICHOLAS S, JACQUELINE J, et al. Influence of dietary gangliosides on neonatal brain development[J]. *Nutr Rev*, 2009, 67(8): 451–463.
- [10] SONNINO S, MAURI L, CHIGORNO V, et al. Gangliosides as components of lipid membrane domains [J]. *Glycobiology*, 2006, 17(1): 1R–13R.
- [11] BRØNNUM H, SEESTED T, HELLGREN L I, et al. Milk – derived GM3 and GD3 differentially inhibit dendritic cell maturation and effector functionalities[J]. *Scand J Immunol*, 2005, 61(6): 551–557.
- [12] PROKAZOVA N V, SAMOVILOVA N N, GRACHEVA E V, et al. Ganglioside GM3 and its biological functions [J]. *Biochemistry*, 2009, 74(3): 235–249.
- [13] LACOMBA R, SALCEDO J, ALEGRÍA A, et al. Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: a review [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(2): 346–357.
- [14] SÁNCHEZ – DÍAZ A, RUANO M J, LORENTE F, et al. A critical analysis of total sialic acid and sialoglycoconjugate contents of bovine milk – based infant formulas [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1997, 24(4): 405–410.
- [15] NEESER J R, GOLLIARD M, DEL VEDOVO S. Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk – based infant formulas [J]. *J Dairy Sci*, 1991, 74(9): 2860–2871.
- [16] LAGREID A, OTNASS A B K, FUGLESANG J. Human and bovine milk: comparison of ganglioside composition and enterotoxin – inhibitory activity [J]. *Pediatric Res*, 1986, 20(5): 416–421.
- [17] MARTÍN – SOSA S, MARTÍN M J, CASTRO M D, et al. Lactational changes in the fatty acid composition of human milk gangliosides [J]. *Lipids*, 2004, 39(2): 111–116.
- [18] MARTÍN – SOSA S, MARTÍN M J, GARCA – PARDO L A, et al. Distribution of sialic acids in the milk of Spanish mothers of full term infants during lactation [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2004, 39(5): 499–503.
- [19] LACOMBA R N, SALCEDO J, ALEGRÍA A, et al. Effect of simulated gastrointestinal digestion on sialic acid and gangliosides present in human milk and infant formulas [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(10): 5755–5762.
- [20] LEE H, GERMAN J, KJELDEN R, et al. Quantitative analysis of gangliosides in bovine milk and colostrum – based dairy products by ultrahigh performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(40): 9689–9696.
- [21] ZHANG J, REN Y, HUANG B, et al. Determination of disialoganglioside GD3 and monosialoganglioside GM3 in infant formulas and whey protein concentrates by ultra – performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2015, 35(8): 937–946.
- [22] FONG B, NORRIS C, MCJARROW P. Liquid Chromatography – high – resolution mass spectrometry for quantitative analysis of gangliosides [J]. *Int Dairy J*, 2009, 44(9): 867–874.
- [23] IKEDA K, SHIMIZU T, TAGUCHI R. Targeted analysis of ganglioside and sulfatide molecular species by LC/ESI – MS/MS with theoretically expanded multiple reaction monitoring [J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(12): 2678–2689.
- [24] TSUI Z C, CHEN Q R, THOMAS M J, et al. A method for profiling gangliosides in animal tissues using electrospray ionization – tandem mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2005, 341(2): 251–258.
- [25] GIUFFRIDA F, MARMET C, BERTSCHY E, et al. Identification of major gangliosides species in human milk and infant formula [C]//Virtual 2020 AOCS Annual Meeting & Expo. Montreal, Canada: AOCS, 2020.
- [26] LIU Z, LI C, PRYCE J, et al. Comprehensive characterization of bovine milk lipids: phospholipids, sphingolipids, glycolipids, and ceramides [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(24): 6726–6738.
- [27] SALCEDO J, KARAV S, PARC A L, et al. Application of industrial treatments to donor human milk: influence of pasteurization treatments, storage temperature, and time

- on human milk gangliosides [J/OL]. *Npj Sci Food*, 2018, 2(1): 5 [2020 - 12 - 01]. <https://doi.org/10.1038/541538-018-0013-9>.
- [28] SISU E, FLANGEA C, SERB A, et al. High - performance separation techniques hyphenated to mass spectrometry for ganglioside analysis [J]. *Electrophoresis*, 2011, 32(13): 1591 - 1609.
- [29] FONG B, NORRIS C, MCJARROW P. Liquid chromatography-high - resolution electrostatic ion - trap mass spectrometric analysis of GD3 ganglioside in dairy products [J]. *Int Dairy J*, 2011, 21(1): 42 - 47.
- [30] GIUFFRIDA F, ELMELEGY I M, THAKKAR S K, et al. Longitudinal evolution of the concentration of gangliosides GM3 and GD3 in human milk [J]. *Lipids*, 2014, 49(10): 997 - 1004.
- [31] MCJARROW P, RADWAN H, LIN M, et al. Human milk oligosaccharide, phospholipid, and ganglioside concentrations in breast milk from United Arab Emirates mothers: results from the MISC cohort [J/OL]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2400 [2020 - 12 - 01]. <https://doi.org/10.3390/nu11/02400>.
- [32] MOLONEY C, O'CONNOR D, O'REGAN J. Polar lipid, ganglioside and cholesterol contents of infant formulae and growing up milks produced with an *alpha* lactalbumin - enriched whey protein concentrate [J/OL]. *Int Dairy J*, 2020, 107: 104716 [2020 - 12 - 01]. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104716>.
- [33] MA L, ALASTAIR K H M, HAMID J B J M. Determination of ganglioside concentrations in breast milk and serum from Malaysian mothers using a high performance liquid chromatography - mass spectrometry - multiple reaction monitoring method [J]. *Int Dairy J*, 2015, 49: 62 - 71.
- [34] FRANCESCA G, CRISTINA C H, EMMANUELLE B, et al. Temporal changes of human breast milk lipids of Chinese mothers [J/OL]. *Nutrients*, 2016, 8(11): 715 [2020 - 12 - 01]. <https://doi.org/10.3390/nu8110715>.
- [35] XIAO L P, IZUMI T. Chronological changes in the ganglioside composition of human milk during lactation [J]. *Early Human Develop*, 1999, 55(1): 1 - 8.
- [36] XIAO L P, IZUMI T. Variation of the ganglioside compositions of human milk, cow's milk and infant formulas [J]. *Early Human Develop*, 2000, 57(1): 25 - 31.
- [37] MA L, LIU X. Lactational changes in concentration and distribution of ganglioside molecular species in human breast milk from Chinese mothers [J]. *Lipids*, 2015, 50(11): 1145 - 1154.

(上接第 131 页)

以芦丁作为质控指标,对不同地区的亚麻荠种子进行测定,发现相同地区的亚麻荠种子芦丁成分含量接近,不同地区的芦丁含量有差异,其中甘肃和政的亚麻荠种子芦丁含量明显高于其他 3 个地区,这可能与各地的生长环境不同有关。同时,对 12 批亚麻荠种子指纹图谱进行研究,确定了指纹图谱的检测方法,采用“中药指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)”进行相似度评价,得到 16 种共有成分,不同批次 16 个共有成分的相对峰面积的 RSD 大于 15% 的成分有 12 个,各样品的共有成分在含量上存在一定差异,可能与亚麻荠种子的产地及采集时间有很大关系。12 批亚麻荠种子的指纹图谱相似度均在 0.97 以上,从指纹图谱的峰差异及整体性评价可以看出,不同来源亚麻荠种子样品之间既有较好的相关性,又有区别。本文首次将 HPLC - DAD 方法应用于亚麻荠种子的指纹图谱研究,方法学各项考察结果均符合指纹图谱研究的技术要求,结合指纹图谱方法控制亚麻荠种子的质量,可为亚麻荠种子全面质量评价和有效性研究提供依据。

参考文献:

- [1] 邓曙东,张青文. 亚麻荠种植和利用的研究现状 [J]. *植物学通报*, 2004, 21(3): 376 - 382.
- [2] 邓乾春,黄凤洪,黄庆德,等. 一种高利用价值油料作物亚麻荠的研究进展 [J]. *中国油料作物学报*, 2009, 31(4): 551 - 559.
- [3] 李飞飞,于立芹,魏悦,等. 亚麻荠种子的营养成分分析 [J]. *中国油脂*, 2019, 44(2): 90 - 93.
- [4] 苑丽霞,郝敬云,周广航,等. 新型能源作物亚麻荠及种子油脂合成调控研究进展 [J]. *山西农业科学*, 2015, 43(5): 634 - 638, 642.
- [5] 谢光辉,秦烁,薛帅,等. 亚麻荠作为生物柴油原料树种的研究现状与前景分析 [J]. *中国农业大学学报*, 2012, 17(6): 239 - 246.
- [6] 韩英华,秦元璋. 芦丁研究现状 [J]. *山东中医杂志*, 2003, 22(10): 635 - 637.
- [7] 占今舜,钟小军,杨群,等. 芦丁的生物活性功能及其在反刍动物生产中的应用 [J]. *动物营养学报*, 2019, 31(7): 2952 - 2957.
- [8] OLIVEIRA V M, CARRARO E, AULER M E, et al. Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. [J]. *Braz J Biol*, 2016, 76(4): 1029 - 1034.
- [9] 王丽,张丽,康文艺,等. 芦丁清除 DPPH 自由基分光光度法与微量法抗氧化活性研究 [J]. *中成药*, 2009, 31(11): 1785 - 1787.
- [10] 丁冶春,夏侯国论,王家智,等. 稀土芦丁配合物的合成表征及抗肿瘤活性研究 [J]. *光谱实验室*, 2011, 28(2): 614 - 617.
- [11] GANESHPURKAR A, SALUJA A K. Protective effect of rutin on humoral and cell mediated immunity in rat model [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 273: 154 - 159.