

高效液相色谱-荧光检测法测定 发酵红肉制品中 Neu5Gc

晏印雪¹, 朱秋劲^{*1,2}, 梁美莲¹, 周樱子¹, 常瑞¹,
李洪英¹, 徐阿奇¹, 刘春丽¹, 曾雪峰^{1,2}

(1. 贵州大学 酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省农畜产品贮藏与加工重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 基于高效液相色谱-荧光检测(HPLC-FLD)技术,建立红肉发酵及制品中 N-羟乙酰神经氨酸(N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)的定量分析方法。成功搭建了以酸水解释放试样中的 Neu5Gc, 4,5-亚甲二氧基-1,2-邻苯二胺盐(4,5-methylenedioxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride, DMB)为衍生化试剂,并采用安捷伦 ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱等系列条件的 HPLC-FLD 分析检测方法。该方法经验证: Neu5Gc 在 25~400 $\mu\text{mol/L}$ 范围内与 Neu5Gc 峰面积的线性关系良好, $R^2=0.999\ 41$; 样品加标平均回收率在 96.4%~99.07% 之间; RSD 为 1.2%, 重复性的 RSD 为 1.5%; 仪器检出限为 0.001 $\mu\text{mol/L}$, 定量限为 0.003 $\mu\text{mol/L}$ 。检测发酵红肉样品中 Neu5Gc 的质量分数在 9.59~20.08 $\mu\text{g/g}$ 之间, 不同的发酵红肉制品 Neu5Gc 的含量之间均存在显著性差异($p<0.05$)。本方法能有效分离 Neu5Gc 目标峰(分离度 $R>1.5$)、操作简单、重复性好、灵敏度和精密度高, 可广泛用于发酵红肉制品中 Neu5Gc 的定量测定。

关键词: N-羟乙酰神经氨酸; 红肉; 发酵肉制品; 荧光高效液相色谱; 食品安全

中图分类号: TS 25.5 文章编号: 1673-1689(2019)05-0066-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.05.010

Determination of Neu5Gc in Fermented Red Meat Products by HPLC-FLD

YAN Yinxue¹, ZHU Qiujin^{*1,2}, LIANG Meilian¹, ZHOU Yinzi¹, CHANG Rui¹,
LI Hongyin¹, XU Aqi¹, LIU Chunli¹, ZENG Xuefeng^{1,2}

(1. School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Province Key Laboratory of Agricultural and Livestock Products Storage and Processing, Guiyang 550025, China)

Abstract: The establishment of quantitative analysis method of N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) based on HPLC-FLD technique has become the key to explore the mechanism of Neu5Gc reduce or increase in red meat fermentation and fermented meat products. We released the Neu5Gc

收稿日期: 2017-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660496); 贵州省高层次创新型人才培养项目(黔科合平台人才[2016]5662); 贵州省研究生工作站项目(黔教研合 JYSZ 字[2015]009); 贵州省科技支撑农业攻关项目(黔科合支撑[2016]2579 号); 贵州省科学技术基金(黔科合基础[2016]1046 号)。

*** 通信作者:** 朱秋劲(1969—), 男, 博士, 教授, 主要从事食品营养与安全 and 畜产品加工研究。E-mail: ls.qjzhu@gzu.edu.cn

引用本文: 晏印雪, 朱秋劲, 梁美莲, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定发酵红肉制品中 Neu5Gc[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(05): 66-72.

in the sample by acid hydrolysis and used 4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride (DMB) as a derivatization agent. The chromatographic separation was accomplished using an Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 column, etc. The results showed that the proposed method showed a good linearity between the ratio of Neu5Gc peak area and the mass concentration of Neu5Gc in the range of 25~400 $\mu\text{mol/L}$, $R^2=0.999\ 41$; The recovery of spiked samples was between 96.4%~99.07%; RSD was 1.2%; the instrumental had a limit of detection (LOD) of 0.001 $\mu\text{mol/L}$, and the limit of quantitation (LOQ) was 0.003 $\mu\text{mol/L}$. The Neu5Gc content of fermented red meat samples was detected to be in the range of 9.59~20.08 $\mu\text{g/g}$, with significant differences existing among these samples ($p<0.05$). The method can effectively separate the target peaks of Neu5Gc (resolution $p>1.5$) with simple operation, good repeatability, high sensitivity and precision, which can be widely used for the determination of Neu5Gc in fermented red meat products.

Keywords: N-glycolylneuraminic acid, red meat, fermented meat, HPLC-FLD, food safety

红肉一般指红色肌肉纤维比白色肌肉纤维多的动物肉。2015年10月26日,国际癌症研究机构将红肉列为“可能对人类致癌”(2A类)致癌物质^[1-3]。

红肉中非人类唾液酸 Neu5Gc 被报道为特有的致癌物质,外源性的 Neu5Gc 主要通过摄食红肉制品而在人体富集,继而机体产生抗 Neu5Gc 抗体,从而促发炎症和增加致癌风险^[4]。Neu5Gc 是唾液酸 (Sialic acid, Sia) 的一种,唾液酸又叫酰化神经氨酸,是一类具有 9 碳骨架的酸性糖类。大多数哺乳动物包括与人类相近的类人猿都可以自身合成 Neu5Gc,但人类由于缺失可将 CMP-Neu5Ac 转化为 CMP-Neu5Gc 的 CMAH 羟化酶,所以健康的人体不能合成^[4-6]。Neu5Gc 通过代谢进入人体组织,含 Neu5Gc 的糖基复合物能够被 Hanganutziu-Deicher (H-D) 抗体特异性识别^[7]。因此,Neu5Gc 已成为食品安全检测与肿瘤诊断的新靶标,同时红肉及红肉加工制品中的 Neu5Gc 日益备受关注^[8-13]。目前发酵红肉及制品主要研究微生物发酵降解胆固醇、杂环胺、亚硝酸盐以及其抗氧化性的特性^[14-17],而对于红肉中特异性风险物质 Neu5Gc 研究鲜见报道。

迄今,对于唾液酸的检测方法常用的有:基于比色法的间苯二酚法、硫代己比妥酸 (2-Thiobarbituric acid, TBA) 法;基于色谱法的高效液相色谱法 (RP-HPLC)、荧光高效液相色谱法 (HPLC-FLD) 等,传统的分光光度法只能检测总的唾液酸含量,有效检测 Neu5Gc 含量的方法有高效液相色谱法、HPLC-FLD 和液相色谱-质谱法 (LC-MS/MS) 等,但主要针对在生鲜红肉^[2,18-19]、动物内脏^[18,20]、乳及乳制品^[12,21-23]中 Neu5Gc 的含量,目前关于

红肉在发酵环节和发酵制品中 Neu5Gc 含量测定未见报道。搭建发酵红肉及制品中 Neu5Gc 的检测方法对考察红肉发酵过程与 Neu5Gc 的消长规律具有重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冷鲜猪肉、宣威火腿、广式香肠、川味香肠、美式火腿:购于贵阳市花溪区合力超市;传统土家特色酸鲜肉、接种发酵酸鲜肉:均为实验室自制。

Neu5Gc 标准品 (GC, $\geq 99\%$)、DMB (GC, $\geq 99\%$)、 β -巯基乙醇 (色谱纯):Sigma 公司产品;甲醇 (色谱纯):德国 applichem 公司产品。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (配有荧光检测器和自动进样器):美国安捷伦科技有限公司产品;LiChrosorb RP-18 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm):默克集团产品;ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm)、ZORBAX 300Extend-C18 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm):美国安捷伦科技有限公司产品;CTFD-12S 冷冻干燥机:青岛永合创信电子科技有限公司产品;S825-12DT 超声清洗器:上海冠特超声仪器有限公司产品;DY89-II 电动玻璃匀浆机:上海安亭科学仪器厂产品;AR224CN 电子分析天平:奥豪斯仪器 (贵州) 有限公司产品;TG16-WS 高速冷冻离心机:上海卢湘仪仪器有限公司产品;XMTD203 数显恒温油浴锅:江苏科析仪器有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 Neu5Gc 标准溶液配制 精确称量 0.0825 g Neu5Gc 标准品,用超纯水溶解于烧杯中,随后转移至 250 mL 容量瓶中,定容至刻度,即为 1 mmol/L Neu5Gc 标准品溶液。吸取 1 mmol/L Neu5Gc 标准品溶液配制成 10、25、50、100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$ 等一系列浓度梯度的 Neu5Gc 标准溶液,待衍生。

1.3.2 样品溶液制备 取发酵红肉制品(我国传统酸鲜肉、发酵香肠、火腿等),根据发酵红肉制品的原料形状不同,分为块状及肉糜状发酵红肉制品。

1)肉糜状发酵红肉制品:剥去肠衣,精确称取 1 g 肉糜,用 10 mL 质量分数 30%的饱和硫酸铵溶液匀浆以沉淀蛋白,并冷冻干燥去除硫酸铵。为使 Neu5Gc 游离出来,将冻干后的样品加入 10 mL 质量分数 2 mol/L 冰乙酸于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水解 3 h,以 12 000 r/min 的转速离心 10 min 取上清液,用 0.45 μm 膜过滤后进行二次冻干除去冰乙酸。冻干粉溶解于 1 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,用 0.45 μm 膜过滤制得样品溶液,待衍生^[24]。

2)块状发酵红肉制品:选取块状发酵红肉制品的精瘦肉部分,取 1 cm 以下的中间肉样 1 g,制备方法同上。

1.3.3 DMB 衍生剂溶液的配制及衍生反应 参考 Martín 等^[25]介绍的方法配制 8 mmol/L DMB、1.5 mol/L 冰乙酸、0.25 mol/L 硫代硫酸钠、0.25 mol/L 亚硫酸钠、0.8 mmol/L β -巯基乙醇。

准确吸取 900 μL 的样品溶液或 Neu5Gc 标准溶液,加入 100 μL DMB 衍生试剂,于水浴锅中 50 $^{\circ}\text{C}$ 避光衍生 2.5 h 后放入冰水混合液中快速冷却,用 0.22 μm 膜过滤后待测。

1.3.4 高效液相色谱条件的选择优化 采用默克 LiChrosorb RP-18 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm)、安捷伦 ZORBAX 300Extend-C18 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm)和安捷伦 ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm),荧光检测器激发波长 373 nm、发射波长 448 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流量为 0.9 mL/min,进样体积 10 μL 。以甲醇-水、甲醇-乙腈-水、乙腈-水为流动相,优化流动相配比。

2 结果与分析

2.1 色谱柱及流动相的确定

根据已报道的色谱条件^[19,24]进行预实验,试验

结果表明:现有的 Neu5Gc 检测方法只适用于鲜肉、牛奶、鸡蛋等未经发酵的食品中的 Neu5Gc 浓度检测,而不适用于发酵红肉制品中 Neu5Gc 浓度检测。如图 1 所示,经微生物发酵后的肉制品,因微生物发酵分解有机物,并产生代谢产物,在流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙腈}):V(\text{水})=8:7:85$ 条件下,发酵红肉样品的目标峰的峰形不对称并向左偏移,加标后目标峰的峰形向 Neu5Gc 标准品保留时间方向偏移,由此可知在 Neu5Gc 目标峰出峰时间内有杂质干扰,无法对发酵红肉制品中 Neu5Gc 的浓度进行测定。

随后分别选择默克 LiChrosorb RP-18 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm)、安捷伦 ZORBAX 300Extend-C18 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm)和安捷伦 ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm),以甲醇-水、甲醇-乙腈-水、乙腈-水等流动相体系的不同体积配比,对样品的液相色谱检测条件进行优化。

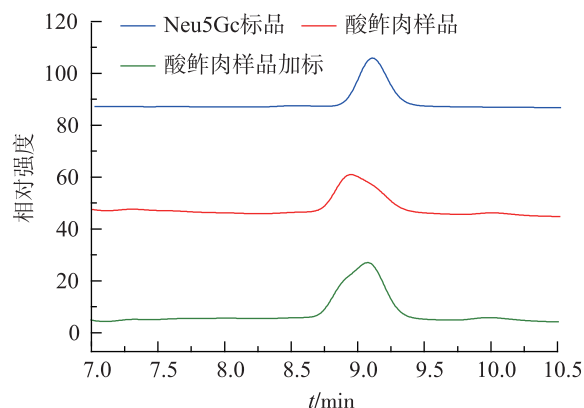


图 1 流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙腈}):V(\text{水})=8:7:85$ 的 HPCL 色谱图

Fig. 1 HPCL chromatogram of methanol-acetonitrile-water(8:7:85, V/V)

通过不同色谱柱分离效果对比,发现使用安捷伦 ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm)分离效果最佳。通过初步流动相体系筛选,选用甲醇-水作为流动相体系,并对不同流动相体积分数配比进行优化,结果如图 2 所示。实验表明:当流动相 A 为超纯水,B 为甲醇溶液,体积比为 80:20 洗脱,能使 Neu5Gc 杂质的峰与主成分峰分离有效分离(分离度 $R>1.5$),如图 3 所示;且峰形良好,Neu5Gc 的保留时间为 14.484 min,如图 4 所示。并且采用梯度洗脱能显著降低检测时间,提高检测

效率,梯度洗脱程序如表 1 所示。

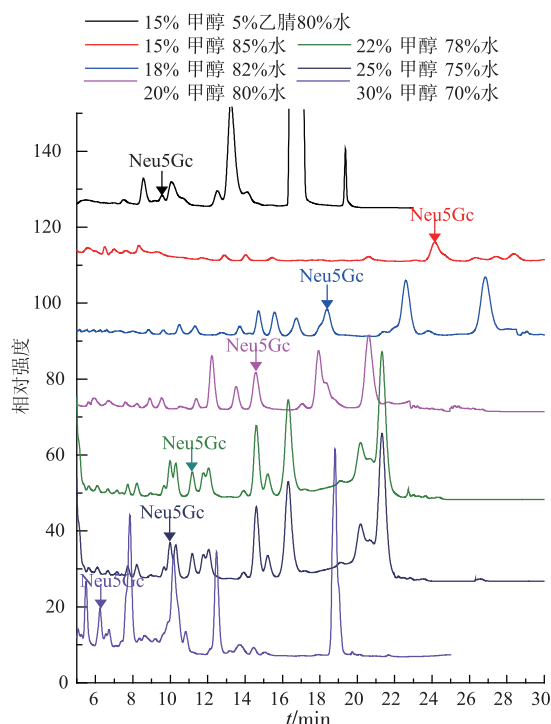


图 2 不同流动相比比例 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of different mobile phase ratio

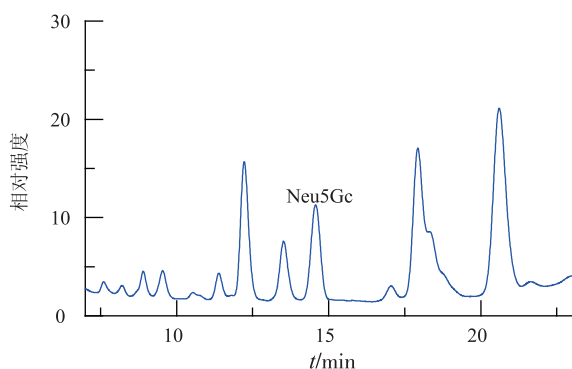


图 3 传统发酵 30 d 酸鲜肉样品中 Neu5Gc 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of Neu5Gc in traditional fermented 30-day Suanzharou

2.2 标准曲线的绘制

取 10、25、50、100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$ 等一系列浓度梯度的 Neu5Gc 标准溶液,衍生后进样检测,不同浓度标准品溶液平行测定 3 次。以标准品浓度为横坐标,对应的色谱峰面积的平均值为纵坐标,绘制线性标准曲线,如图 5 所示。结果表明,在 10~400 $\mu\text{mol/L}$ 线性范围内,Neu5Gc 峰面积与浓度呈现良好的线性关系,符合测定要求。

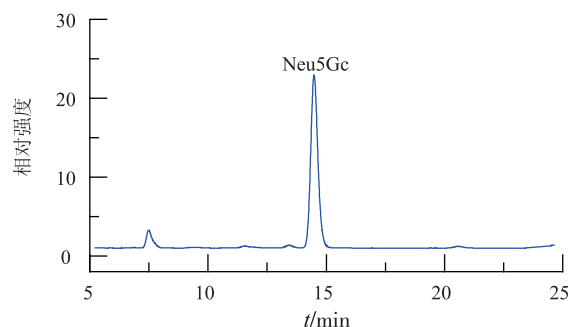


图 4 Neu5Gc 标准样品 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of Neu5Gc standard

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Conditions for mobile phase by gradient elution

t/min	体积分数/%		流量/(mL/min)
	流动相 A	流动相 B	
0	80	20	0.9
18	80	20	0.9
18.1	0	100	0.9
21	0	100	0.9
21.1	80	20	0.9
28	80	20	0.9

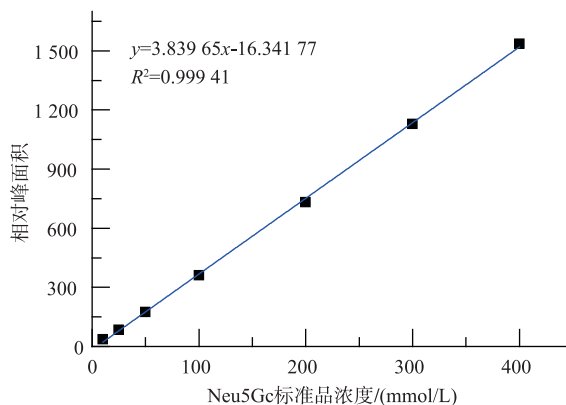


图 5 Neu5Gc 标准曲线

Fig. 5 Neu5Gc standard curve

2.3 检出限、定量限

取 1 mmol/L Neu5Gc 标准品溶液倍数稀释后衍生测定。实验结果表明: $R_{\text{SN}}=3$ 时,最低检出限(LOD)为 0.001 $\mu\text{mol/L}$,高于 LC-MS / MS 测定 Neu5Gc 的最低检测限 0.3 $\mu\text{mol/L}$ [13]; $R_{\text{SN}}=10$ 时,定量限(LOQ)为 0.003 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.4 重复性、精密度

取同一发酵肉样,按照 1.3.2 样品溶液制备方法制备平行样品溶液 5 份,衍生后,依次进样检测。5 份样品 Neu5Gc 浓度的 RSD 值为 1.5%;取同一待测样品溶液连续进样 6 次,测得 Neu5Gc 峰面积的

RSD 为 1.2%。结果显示,本实验方法具有良好的精密度和重现性。

2.5 Neu5Gc 加标回收率测定

取 3 份已知 Neu5Gc 浓度样品,分别加入 1、5、

10 $\mu\text{mol/mL}$ 3 个浓度的 Neu5Gc 标准溶液进行加标回收实验,结果如表 2 所示,平均回收率在 96.4%~99.07%之间。

表 2 Neu5Gc 加标回收率的测定

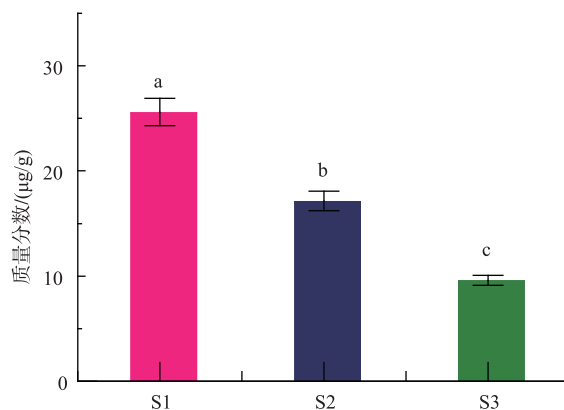
Table 2 Recovery of Neu5Gc in samples

编号	原始样品 Neu5Gc 浓度/ $(\mu\text{mol/mL})$	Neu5Gc 标准品浓度/ $(\mu\text{mol/mL})$	总 Neu5Gc 浓度/ $(\mu\text{mol/mL})$	回收率/%	平均回收率/%
1	4.287 43	1	5.192 13	100.47	99.07
		5	9.201 46	98.28	
		10	14.132 42	98.45	
2	4.673 18	1	5.589 13	91.60	96.65
		5	9.613 68	98.81	
		10	14.328 74	96.56	
3	5.187 43	1	6.023 77	93.63	96.40
		5	10.002 8	96.31	
		10	15.113 18	99.26	

2.6 样品检测结果

Varki 等^[25]检测得到生鲜猪肉中 Neu5Gc 质量分数为 25.25 $\mu\text{g/g}$,而 Chen 等^[20]测得生鲜猪肉中的 Neu5Gc 质量分数仅有 5.6 $\mu\text{g/g}$ 。实验检测结果由图 6 可知,鲜肉原料 (S1) 的 Neu5Gc 质量分数为 (25.61 ± 1.31) $\mu\text{g/g}$,传统发酵 30 d 酸鲜肉 (S2) 的 Neu5Gc 质量分数为 (17.14 ± 0.92) $\mu\text{g/g}$,接种发酵 30 天酸鲜肉 (S3) 的 Neu5Gc 质量分数为 (9.59 ± 0.47) $\mu\text{g/g}$;Suna、Annie 等^[18,26]分别测定了生长 3、38、180 d 猪的新鲜猪肉、猪脾、猪腰、猪肺、猪心和猪肝和经过不同的加工方式加工的红肉制品中 Neu5Gc 质量分数,发现与猪肉相比,各个器官中 Neu5Gc 的质量分数较高,而不同的物理加工方式均显著改变了 Neu5Gc 质量分数以及 Neu5Gc 结合态与游离态的比例,其中有增加也有降低。对比鲜肉原料、传统发酵 30 d 酸鲜肉与接种发酵 30 d 酸鲜肉中的 Neu5Gc 质量分数可知,在发酵酸鲜肉与鲜肉原料之间 Neu5Gc 的质量分数存在显著性差异 ($p < 0.05$),发酵可显著降低红肉中 Neu5Gc 的质量分数,且接种微生物发酵酸鲜肉中 Neu5Gc 质量分数最低;目前还没有微生物发酵降解 Neu5Gc 的研究,推测可能的原因:1)微生物发酵产生代谢产物,对 Neu5Gc 有降解作用,如乳酸等。蒋芸等^[27]研究表明猪肉在添加乳酸的情况下,60.0%以上唾液酸被降解;2)Neu5Gc 是一类具有 9 碳骨架的酸性糖类,

通常附着于细胞表面和分泌的糖蛋白和糖脂的糖链的外端^[4],可能作为碳源被微生物利用进入代谢途径发生分解从而导致 Neu5Gc 在红肉中的质量分数降低。



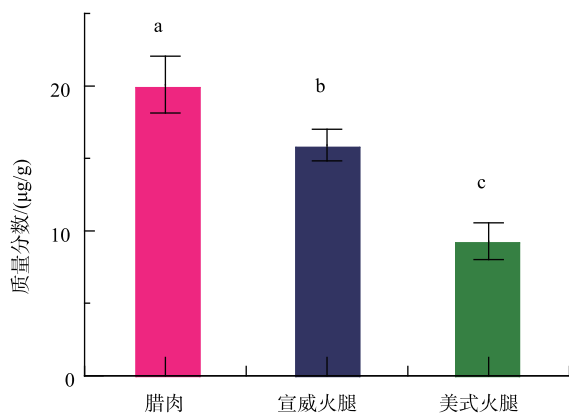
注:字母不同表示差异显著 ($p < 0.05$)

图 6 不同方式发酵的红肉制品中 Neu5Gc 的质量分数 ($n=3$)

Fig. 6 Content of Neu5Gc in fermented red meat products by different ways ($n=3$)

由图 7 和图 8 可知,肉糜状发酵肉制品中的 Neu5Gc 质量分数普遍低于块状发酵红肉制品中 Neu5Gc 质量分数,对两组样品 (包括 3 个平行样) 进行 t 检验分析得在置信区间 95%内 p 值为 0.03 (< 0.05),即不同形态的红肉发酵制品中的 Neu5Gc 存在显著性差异。其中腊肉的 Neu5Gc 质量分数最

高,萨拉米香肠质量分数最低。如果微生物发酵降解 Neu5Gc 质量分数的推测成立,据此推断肉糜状的红肉更有利于增大红肉与微生物的接触面积,从而使发酵更充分,提高 Neu5Gc 的降解效率。



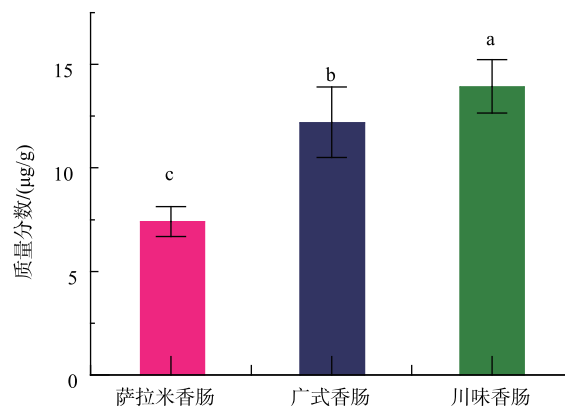
注:字母不同表示差异显著($p<0.05$)

图 7 块状发酵红肉制品中 Neu5Gc 质量分数 ($n=3$)

Fig. 7 Content of Neu5Gc in block fermented red meat products ($n=3$)

3 结 语

采用酸水解,4,5-亚甲基二氧基-1,2-邻苯二胺盐(DMB)衍生的荧光高效液相色谱(HPLC-FLD)检测发酵红肉制品中 Neu5Gc 质量分数。该方法分离度良好($R>1.5$),平均回收率在 96.4%~99.07%之间,最低检出限为 0.001 $\mu\text{mol/L}$,Neu5Gc 保留时间



注:字母不同表示差异显著($p<0.05$)

图 8 肉糜状发酵肉制品中 Neu5Gc 质量分数 ($n=3$)

Fig. 8 Content of Neu5Gc in minced fermented red meat products ($n=3$)

为 14.484 min,且峰形对称无漂移无拖尾。此方法分辨率、灵敏度、精密度和回收率较高,能够满足发酵红肉制品中 Neu5Gc 的测定,弥补了对发酵红肉制品中 Neu5Gc 的研究手段的缺失。

采用该方法测得的不同种类的发酵红肉制品 Neu5Gc 的质量分数在 9.59~20.08 $\mu\text{g/g}$ 之间,不同的发酵红肉制品 Neu5Gc 的含量之间均存在显著性差异($p<0.05$),且低于未发酵红肉样 Neu5Gc 的含量 26.87 $\mu\text{g/g}$ 。目前,尚未有微生物发酵对红肉中 Neu5Gc 影响的研究,进一步研究旨在阐释微生物发酵对 Neu5Gc 的降解机制。

参考文献:

- [1] FAN Xingdan, LI Hongwei. Progress in studies on relationship between red meat intake, N-glycolylneuraminic acid and cancer risk[J]. *Food Science*, 2014, 35(15): 326-329. (in Chinese)
- [2] INTERNATIONAL A F R O. Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat [J]. *International Agency for Research on Cancer and World Health Organisation, Lyon, France*, 2015.
- [3] SHIGETA S. Recent progress in antiviral chemotherapy for respiratory syncytial virus infections [J]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2000, 9(2): 221-235.
- [4] VARKI A. Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution[J]. *American Journal of Physical Anthropology*, 2001, 116(S33): 54-69.
- [5] HEDLUND M, TANGVORANUNTAKUL P, TAKEMATSU H, et al. N-glycolylneuraminic acid deficiency in mice: implications for human biology and evolution[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(12): 4340-4346.
- [6] IRIE A, KOYAMA S, KOZUTSUMI Y, et al. The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(25): 15866-15871.
- [7] ALISSON-SILVA F, KAWANISHI K, VARKI A. Human risk of diseases associated with red meat intake: Analysis of current theories and proposed role for metabolic incorporation of a non-human sialic acid[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2016, 51: 16-30.

- [8] HEDLUND M, PADLER-KARAVANI V, VARKI N M, et al. Evidence for a human-specific mechanism for diet and antibody-mediated inflammation in carcinoma progression [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2008, 105(48):18936-18941.
- [9] INOUE S, SATO C, KITAJIMA K. Extensive enrichment of N-glycolylneuraminic acid in extracellular sialoglycoproteins abundantly synthesized and secreted by human cancer cells[J]. **Glycobiology**, 2010, 20(6):752-762.
- [10] LACOMBA R, SALCEDO J, ALEGRIA A, et al. Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: A review[J]. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2010, 51(2):346-357.
- [11] FENG Jun, LI Hongji, HAN Liqiang, et al. Determination of the contents of sialic acid in milk powder by HPLC[J]. **China Dairy Industry**, 2008(6):62-64.(in Chinese)
- [12] FENG Jun, YANG Guoyu, LI Hongji, et al. Determination of contents of free and Oligosaccharide-bound sialic acid in milk by HPLC[J]. **Food Science**, 2008(5):355-357.(in Chinese)
- [13] VAN DER HAM M, PRINSEN B H, HUIJMANS J G, et al. Quantification of free and total sialic acid excretion by LC-MS/MS [J]. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 2007, 848(2):251-257.
- [14] YUN Yueying, MA Yunan, WANG Wenlong. Cholesterol-degrading characteristics of lactic acid bacteria from natural fermented meat products in vitro[J]. **China Brewing**, 2018, 37(1):125-128.(in Chinese)
- [15] XIE Yangyang, WANG Xiaoxi, YAN Wenjie, et al. Research progress of heterocyclic aromatic amines in meat products[J]. **Food Research and Development | Food Res Dev**, 2017(15):199-205.(in Chinese)
- [16] LI Peijun, KONG Baohua, ZHENG Dongmei. Microbial fermentation as an alternative to nitrite addition for colorizing cured meat products: a review[J]. **Food Science**, 2010(17):388-391.(in Chinese)
- [17] QIN Chunjun, LI Xiang, DENG Feng, et al. Study advancement of antioxidation in fermented meat [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2010(7):122-126.(in Chinese)
- [18] JI S, WANG F, CHEN Y, et al. Developmental changes in the level of free and conjugated sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in different organs of pig: a LC-MS/MS quantitative analyses[J]. **Glycoconjugate Journal**, 2017, 34(1):21-30.
- [19] LI H, FAN X. Quantitative analysis of sialic acids in Chinese conventional foods by HPLC-FLD[J]. **Open Journal of Preventive Medicine**, 2014, 4(2):57.
- [20] CHEN Y, PAN L, LIU N, et al. LC-MS/MS quantification of N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid and ketodeoxynonulosonic acid levels in the urine and potential relationship with dietary sialic acid intake and disease in 3-to 5-year-old children[J]. **British Journal of Nutrition**, 2014, 111(2):332-341.
- [21] CAO C, WANG W J, HUANG Y Y, et al. Determination of sialic acids in liver and milk samples of wild-type and CMAH knock-out mice[J]. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, 2017(125).
- [22] WANG Lei, LI Xiaodong. Determination of total sialic acid content in infant formula by HPLC-FLD[J]. **China Dairy Industry**, 2013, 41(5):52-55.(in Chinese)
- [23] CHEN Haijiao, WANG Ping, CHEN Yue, et al. Determination of total sialic acid content in human milk by HPLC-FLD [J]. **Food Science**, 2011(16):308-311.(in Chinese)
- [24] MARTIN M J, VAZQUEZ E, RUEDA R. Application of a sensitive fluorometric HPLC assay to determine the sialic acid content of infant formulas[J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2007, 387(8):2943-2949.
- [25] VARKI A. Sialic acids in human health and disease[J]. **Trends in Molecular Medicine**, 2008, 14(8):351-360.
- [26] SAMRAJ A N, PEARCE O M, LAUBLI H, et al. A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2015, 112(2):542-547.
- [27] JIANG Yun, FU Hao, FENG Changyu, et al. Effects of different treatments on N-glycolylneuraminic acid dissociation in red meat [J]. **Meat Research**, 2015(12):52-57.