

Research Article**Development and validation of a hydrophilic liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of N-glycolyl neuraminic acid and N-acetyl neuraminic acid in edible bird's nest and related products**

Nguyen Van Khoa^{1*}, Nguyen Quang Hung¹, Mac Thi Thanh Hoa¹, Le Thi Kim Anh¹,
Nguyen Anh Tuyet¹, Mac Quynh Chi¹, Vuong Thi Tam¹, Cao Cong Khanh²

¹National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

²Vietnam Food Administration, Hanoi, Vietnam

(Received: 10 Jul 2026; Revised: 27 Sep 2026; Accepted: 28 Sep 2026)

Abstract

This study developed and validated a hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HILIC-LC-MS/MS) method for the simultaneous determination of N-acetyl neuraminic acid (NANA) and N-glycolyl neuraminic acid (NGNA) in edible bird's nest and bird's nest products. Samples were hydrolyzed with 0.1 M hydrochloric acid at 90°C for 1 h to release bound sialic acids prior to analysis. Chromatographic separation was performed on an XBridge HILIC column (150 × 4.6 mm, 3.5 μm) using a mobile phase consisting of ammonium formate/formic acid and acetonitrile under gradient elution. The analytes were detected by tandem mass spectrometry in positive electrospray ionization (ESI+) mode using multiple reaction monitoring (MRM). The method showed good linearity over the concentration range of 25 – 5000 ng/mL, with a correlation coefficient ($r \geq 0.999$). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.37 and 1.23 mg/kg, respectively. The precision and recovery of the method met the AOAC validation requirements. The method was applied to the simultaneous determination of NANA and NGNA in edible bird's nest and bird's nest product samples. The results showed that NANA was the predominant sialic acid component, whereas NGNA was detected only at low levels in some samples. The application results demonstrated that the developed method met the requirements for the simultaneous determination of NANA and NGNA in edible bird's nest and bird's nest products.

Keywords: NANA, NGNA, Sialic acid, bird's nest, HILIC-LC-MS/MS.

*Corresponding author: Nguyen Van Khoa (E-mail: khoanv@nifc.gov.vn)

<https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4761>

Copyright © 2026 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](#)

Xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng ưa nước ghép nối khối phổ hai lần xác định đồng thời N-glycolyl neuraminic acid và N-acetyl neuraminic acid trong tổ yến và các sản phẩm từ tổ yến

**Nguyễn Văn Khoa¹, Nguyễn Quang Hùng¹, Mạc Thị Thanh Hoa¹, Lê Thị Kim Anh¹,
Nguyễn Ánh Tuyết¹, Mạc Quỳnh Chi¹, Vương Thị Tâm¹, Cao Công Khánh²**

¹*Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam*

²*Cục An toàn thực phẩm, Bộ Y tế, Hà Nội, Việt Nam*

Tóm tắt

Nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng ưa nước ghép nối khối phổ hai lần (HILIC-LC-MS/MS) để xác định đồng thời N-glycolyl neuraminic acid (NGNA) và N-acetyl neuraminic acid (NANA) trong tổ yến và các sản phẩm từ tổ yến. Mẫu được thủy phân bằng dung dịch acid hydrochloric 0,1 M ở 90°C trong 1 giờ nhằm giải phóng các acid sialic liên kết trước khi phân tích. Quá trình phân tách sắc ký được thực hiện trên cột XBridge HILIC (150 × 4,6 mm) kích thước hạt nhỏ 3,5 µm với pha động gồm amoni format/acid formic và acetonitril theo chương trình rửa giải gradient; các chất phân tích được phát hiện bằng khối phổ hai lần ở chế độ ion hóa phun điện từ dương (ESI+) với chế độ theo dõi đa phản ứng (MRM). Phương pháp có độ tuyến tính tốt trong khoảng nồng độ 25 – 5000 ng/mL, với hệ số tương quan (r) $\geq 0,999$. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) lần lượt là 0,37 mg/kg và 1,23 mg/kg. Độ chụm và độ thu hồi của phương pháp đáp ứng các yêu cầu thẩm định của AOAC. Phương pháp được áp dụng để xác định đồng thời NANA và NGNA trong các mẫu tổ yến và sản phẩm từ tổ yến. Kết quả phân tích cho thấy NANA là thành phần acid sialic chiếm ưu thế, trong khi NGNA chỉ được phát hiện ở hàm lượng thấp trong một số mẫu. Kết quả ứng dụng cho thấy phương pháp đáp ứng yêu cầu xác định đồng thời NANA và NGNA trong tổ yến và các sản phẩm từ tổ yến.

Từ khóa: NANA, NGNA, Sialic acid, tổ yến, HILIC-LC-MS/MS.

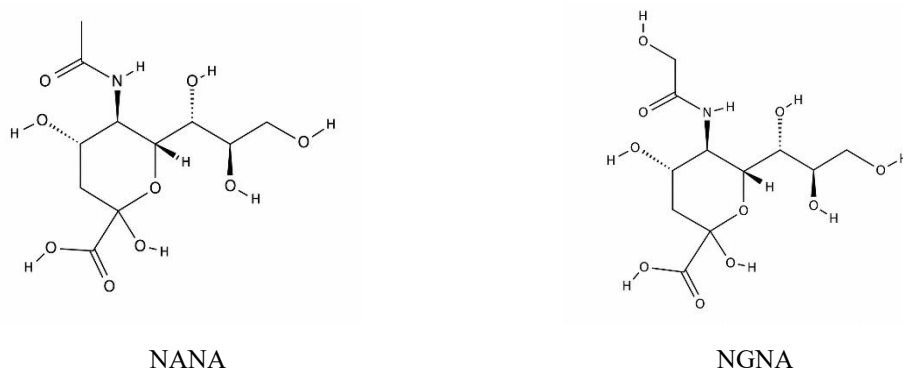
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tổ yến là thực phẩm nổi tiếng vì giá trị dinh dưỡng và mang lại nhiều lợi ích kinh tế, được hình thành chủ yếu từ glycoprotein do chim yến tiết ra. Trong thành phần của tổ yến, acid sialic được xem là một trong những hợp chất đặc trưng, có vai trò quan trọng trong các hoạt động sinh học như nhận diện tế bào, điều hòa đáp ứng miễn dịch và phát triển hệ thần kinh [1]. Trong đó, N-acetyl neuraminic acid (NANA) là dạng acid sialic chiếm nhiều trong tổ yến, còn N-glycolyl neuraminic acid (NGNA) thường chỉ hiện diện ở hàm lượng rất thấp hoặc không phát hiện được. Vì vậy, hàm lượng và thành phần acid sialic được xem là yếu tố cơ bản khi đánh giá chất lượng và tính xác thực về nguồn gốc của tổ yến cũng như các sản phẩm chế biến từ tổ yến.

Hiện nay, thị trường có nhiều sản phẩm tổ yến với tỷ lệ tổ yến và thành phần công bố rất khác nhau, trong khi việc kiểm soát chất lượng chủ yếu dựa trên thông tin ghi nhãn và chưa có chỉ tiêu hóa học đặc trưng được áp dụng rộng rãi. Việc xác định chính xác hàm lượng acid sialic có ý nghĩa quan trọng trong đánh giá chất lượng nguyên liệu, kiểm soát hàm lượng tổ yến thực tế trong sản phẩm và hỗ trợ phát hiện gian lận thương mại. Hàm lượng acid sialic, đặc biệt là NANA, có tiềm năng phản ánh sự hiện diện và mức độ sử dụng nguyên liệu tổ yến trong sản phẩm. Tuy nhiên, việc định lượng chính xác nhóm chất này gặp nhiều thách thức do nền tổ yến giàu glycoprotein, acid sialic tồn tại chủ yếu ở dạng liên kết trong các chuỗi glycan và cần được giải phóng trước khi phân tích. Đồng thời, hàm lượng NGNA thấp hơn nhiều so với NANA đòi hỏi phương pháp phải có độ nhạy và độ chọn lọc phù hợp để có thể xác định đồng thời hai chất trong cùng một quy trình phân tích.

NANA và NGNA là hai monosaccharide thuộc nhóm acid sialic, trong cấu trúc chứa nhiều nhóm hydroxyl và nhóm carboxyl nên có độ phân cực cao và khả năng hòa tan tốt trong nước. Cấu trúc chất phân tích được thể hiện trong **Hình 1**. Đặc điểm hóa lý này đặt ra yêu cầu lựa chọn cơ chế lưu giữ phù hợp nhằm đảm bảo khả năng lưu giữ, phân tách và phát hiện các chất phân tích trong quá trình phát triển phương pháp sắc ký. Hiện nay, nhiều kỹ thuật đã được áp dụng để xác định acid sialic, bao gồm phương pháp so màu, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), điện di mao quản và sắc ký lỏng ghép nối đầu dò khối phổ (LC-MS/MS) [2 – 4]. Để phù

hợp với việc phân tích các chất ở hàm lượng thấp trong nền mẫu thực phẩm phức tạp, LC-MS/MS là phương pháp có độ chọn lọc cao và khả năng phát hiện, định lượng ở những mức hàm lượng thấp.



Hình 1. Cấu trúc NANA và NGNA

Tại Việt Nam, Nguyễn Thị Hồng Ngọc và cộng sự (2019) đã xây dựng phương pháp LC-MS/MS sử dụng cột C18, chế độ ion hóa ESI(−) và quá trình thủy phân bằng acid formic để xác định NANA và NGNA trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) và nước yến [12]. Nghiên cứu này cho thấy khả năng ứng dụng của LC-MS/MS kết hợp sắc ký pha đảo trong phân tích acid sialic. Tuy nhiên, nhược điểm của sắc ký pha đảo trong trường hợp này là cơ chế lưu giữ dựa trên tương tác kỵ nước, trong khi NANA và NGNA có tính kỵ nước thấp. Do đó, khả năng lưu giữ của hai chất trên pha tĩnh C18 bị hạn chế, làm tăng khả năng đồng rửa giải với các thành phần phân cực của nền mẫu. Điều này có thể dẫn đến hình dạng pic sắc ký bị giãn rộng, kéo đuôi và tăng mức độ ảnh hưởng nền đối với tín hiệu khối phổ.

Sắc ký tương tác ưa nước (HILIC) là một lựa chọn phù hợp hơn về mặt cơ chế lưu giữ đối với các hợp chất có độ phân cực cao. HILIC sử dụng pha tĩnh phân cực kết hợp với pha động có hàm lượng dung môi hữu cơ cao. Trong điều kiện này, một lớp nước được hình thành trên bề mặt pha tĩnh, các chất phân cực như NANA và NGNA được lưu giữ chủ yếu thông qua sự phân bố giữa pha động giàu dung môi hữu cơ và lớp nước này, đồng thời có thể tham gia các liên kết hydro với bề mặt pha tĩnh. Cơ chế này làm tăng mức độ tương tác giữa chất phân tích và pha tĩnh, qua đó cải thiện khả năng lưu giữ, hình dạng pic sắc ký và độ chọn lọc đối với các hợp chất phân cực. Bên cạnh sự phù hợp về cơ chế tương tác pha tĩnh, pha động HILIC thường chứa tỷ lệ acetonitril cao, thuận lợi cho quá trình bay hơi dung môi và ion hóa trong nguồn ESI khi ghép nối với detector khối phổ, làm tăng độ nhạy khi phân tích [15]. Do đó, việc lựa chọn HILIC trong nghiên cứu này không chỉ dựa trên khả năng tương tác phù hợp hơn giữa pha tĩnh phân cực và NANA, NGNA mà còn dựa trên khả năng tương thích tốt với hệ LC-MS/MS.

Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng và thẩm định phương pháp HILIC-LC-MS/MS sử dụng chế độ ion hóa ESI(+) để xác định đồng thời NANA và NGNA trong tổ yến và các sản phẩm từ tổ yến, đồng thời khảo sát có hệ thống các điều kiện thủy phân nhằm tối ưu quá trình giải phóng acid sialic khỏi nền mẫu. Nghiên cứu không chỉ thiết lập các điều kiện phân tích thích hợp mà còn đánh giá một cách hệ thống hiệu năng của phương pháp thông qua các thông số thẩm định, làm rõ tính phù hợp và đánh giá khả năng của HILIC kết hợp với LC-MS/MS đối với phân tích đồng thời các acid sialic trong nền tổ yến. Qua đó cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển và ứng dụng các phương pháp định lượng NANA và NGNA trong kiểm nghiệm chất lượng và đánh giá thành phần của tổ yến và các sản phẩm liên quan.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, 2 chất phân tích NANA và NGNA là đối tượng được xác định trong phương pháp phân tích trên đối tượng nền mẫu là tổ yến và sản phẩm từ tổ yến bao gồm yến chưng, nước yến.

2.2. Hóa chất, dụng cụ

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị sắc ký lỏng kết nối với detector khối phổ 2 lần (LC-MS/MS), model H-class - Xevo TQD của hãng

Waters (Mỹ) là thiết bị chính được sử dụng trong nghiên cứu này. Phần pha tĩnh sử dụng trên hệ thống HPLC là cột sắc ký XBridge HILIC (150 mm × 4,6 mm, 3,5 μm) có sử dụng tiền cột. Ngoài ra các dụng cụ thí nghiệm và các thiết bị phụ trợ cơ bản như máy đồng nhất mẫu, cân kỹ thuật, cân phân tích, bể điều nhiệt, ... phù hợp với yêu cầu phòng thí nghiệm được sử dụng trong quá trình chuẩn bị mẫu phân tích.

2.2.2. Mẫu nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu là mẫu tổ yến tinh chế, mẫu yến chưng, mẫu nước uống bổ sung yến.

Mẫu trắng được sử dụng trong nghiên cứu là hỗn hợp được pha chế từ nước, đường, gelatin. Mẫu trắng được sử dụng để thêm chuẩn tại các mức trong quá trình thẩm định phương pháp.

2.2.3. Hóa chất

Hai chất chuẩn tương ứng với 2 chất phân tích được sử dụng là chất chuẩn N-acetyl neuraminic acid, hàm lượng nguyên trạng 99,60%, Lot 0319-RA-0004 (CATO) và chất chuẩn N-glycolyl neuraminic acid, hàm lượng nguyên trạng 100%, Lot 7-XJZ-42-1 (TRC-Canada). Các hóa chất khác như: Acetonitril (ACN), acid formic (HCOOH), acid hydrochloric (HCl), acid acetic (CH₃COOH), amoni format (HCOONH₄), nước cất phòng thí nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu đều đáp ứng yêu cầu về tinh khiết sắc ký.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp xử lý mẫu

- Tổ yến tinh chế được xay nghiền và trộn đều bằng máy đồng nhất mẫu.
- Các mẫu sản phẩm tổ yến ở dạng lỏng được xay và lắc đều để đồng nhất mẫu.

Quá trình giải phóng các acid sialic được thực hiện thông qua phương pháp thủy phân bằng acid trong môi trường nhiệt độ cao. Sau khi tham khảo tài liệu [5, 6, 12] quy trình xử lý mẫu dự kiến như sau: Mẫu được đồng nhất, sau đó cân chính xác từ 0,5 – 1 g đối với mẫu tổ yến tinh chế, 1 – 5 g đối với nền mẫu sản phẩm từ tổ yến vào ống ly tâm 50 mL, bổ sung dung môi thủy phân và ủ thủy phân bằng bể điều nhiệt trong 1 giờ, lắc đều mẫu 15 phút/1 lần, làm nguội đến nhiệt độ phòng và ly tâm tốc độ 6000 vòng/phút trong 3 phút. Lấy phần dịch, định mức 50 mL bằng nước. Lọc mẫu qua màng 0,2 μm và pha loãng đến nồng độ thích hợp trước khi phân tích.

Phương pháp tối ưu đơn biến được sử dụng để khảo sát các thông số trong quá trình chuẩn bị mẫu trên nền mẫu sản phẩm tổ yến, theo trình tự thu hẹp dần phạm vi khảo sát. Trình tự khảo sát được lựa chọn dựa trên cơ chế thủy phân, trong đó acid là tác nhân trực tiếp thúc đẩy quá trình cắt liên kết glycosidic, do đó việc xác định loại và nồng độ acid phù hợp được thực hiện trước. Tiếp đó, nhiệt độ được khảo sát nhằm xác định mức độ gia nhiệt thích hợp cho quá trình giải phóng acid sialic. Cuối cùng, thời gian thủy phân được khảo sát để xác định thời gian đủ để giải phóng acid sialic nhưng hạn chế kéo dài quá mức quá trình xử lý. Cách tiếp cận này phù hợp với các nghiên cứu đã sử dụng thủy phân acid kết hợp kiểm soát nhiệt độ và thời gian để giải phóng acid sialic trước phân tích [1, 8, 11, 12]. Các thông số được khảo sát cụ thể như sau.

Dung môi thủy phân: Các dung môi được khảo sát gồm HCl 1 M, HCl 0,1 M, HCOOH 1 M, HCOOH 0,1 M, CH₃COOH 1 M, CH₃COOH 0,1 M. Điều kiện cho kết quả phân tích phù hợp nhất được lựa chọn làm điều kiện cố định cho bước khảo sát nhiệt độ.

Nhiệt độ thủy phân: Sau khi đã lựa chọn được dung môi thủy phân phù hợp, tiến hành thay đổi nhiệt độ ở các mức 60°C, 80°C, 90°C, 100°C trong khi các điều kiện khác được giữ cố định. Nhiệt độ cho hiệu suất giải phóng acid sialic phù hợp nhất được lựa chọn và cố định cho bước khảo sát thời gian.

Thời gian thủy phân: Sử dụng đồng thời loại acid và nhiệt độ đã được lựa chọn, tiến hành khảo sát thời gian thủy phân 30 phút, 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ. Thời gian thủy phân có kết quả phân tích phù hợp nhất được lựa chọn làm điều kiện thủy phân cho nghiên cứu.

2.3.2. Phương pháp phân tích LC-MS/MS

Phương pháp sắc ký lỏng kết nối detector khối phổ hai lần (LC-MS/MS) được sử dụng để phân tích đồng thời 2 chất NANA và NGNA (hoạt chất thuộc nhóm acid sialic) trong mẫu tổ yến và các sản phẩm từ tổ yến. Đây là phương pháp phân tích hiện đại, có độ nhạy, độ chính xác và độ chọn lọc cao, phù hợp cho mục tiêu nghiên cứu.

2.3.3. Phương pháp thẩm định

Tiến hành thẩm định phương pháp sau khi xây dựng được thông qua các thông số sau: Độ đặc hiệu; đường chuẩn; Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ); Độ chụm (tiến hành trên các nền mẫu: tổ yến, yến chưng và nước yến bổ sung yến); Độ đúng/Độ thu hồi (phân tích mẫu thêm chuẩn tại 3 mức nồng độ, mỗi mức thêm chuẩn được tiến hành độc lập và lặp lại 6 lần theo quy trình xử lý mẫu) [7].

LOD và LOQ được thực hiện trên các mẫu thêm chuẩn ở hàm lượng thấp và phân tích lặp lại 10 lần. Giá trị LOD, LOQ được tính theo công thức: $LOD = 3 \times SD$; $LOQ = 10 \times SD$; Trong đó, SD là độ lệch chuẩn của mẫu thử. Đánh giá LOD tính được qua hệ số $R = x_{tb}/LOD$. Nếu $4 \leq R \leq 10$ thì nồng độ dung dịch thử là phù hợp và LOD tính được là đáng tin cậy. Nếu $R < 4$ thì cần dung dịch thử có nồng độ cao hơn. Nếu $R > 10$ thì cần dùng dung dịch thử có nồng độ thấp hơn [7].

Phương pháp được đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu thông qua thực hiện phân tích lặp lại 3 lần mẫu trắng thêm chuẩn và dung dịch chuẩn ở mức nồng độ tương ứng LOQ. Giá trị ảnh hưởng nền (ME%) [7] được xác định bằng công thức sau:

$$ME\% = \frac{S_m - S_s}{S_s} \times 100$$

Trong đó: S_m – tín hiệu trung bình mẫu trắng thêm chuẩn;

S_s – tín hiệu trung bình dung môi thêm chuẩn.

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm MassLynx trên thiết bị LC-MS/MS của hãng Waters được sử dụng để tính toán kết quả hàm lượng NANA và NGNA. Các kết quả tính toán % thu hồi, độ lệch chuẩn và các xử lý thống kê khác được thực hiện trên phần mềm Microsoft Excel 2019.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả tối ưu điều kiện thực hiện LC-MS/MS

3.1.1. Điều kiện MS

NANA và NGNA là các hợp chất bản chất acid yếu do sự hiện diện của nhóm carboxyl trong cấu trúc, tồn tại chủ yếu ở dạng anion tích điện âm trong môi trường có pH > 2,6 dẫn đến hiệu suất proton hóa trực tiếp tạo ion $[M+H]^+$ rất kém, chất phân tích có xu hướng dễ tạo các ion cộng kiềm (Na^+ , K^+) gây phân tán tín hiệu và giảm độ nhạy khi phân tích chế độ ESI(+) [6]. Do đó chế độ ion hóa ESI(-) thường được ưu tiên lựa chọn trong nhiều quy trình phân tích để xác định hai hợp chất này [1, 3, 12]. Tại Việt Nam, Nguyễn Thị Hồng Ngọc và cộng sự (2019) đã xây dựng phương pháp LC-MS/MS sử dụng cột C18 kết hợp chế độ ESI(-) để xác định đồng thời NANA và NGNA trong TPBVSK và nước yến [12]. Tuy nhiên, chế độ ion hóa dương ESI(+) cũng đã được chứng minh là một phương pháp ổn định trong định lượng acid sialic, đặc biệt khi kết hợp với hệ thống sắc ký tương tác ưa nước (HILIC) và pha động thích hợp. Điển hình, Shi và cộng sự (2015) đã triển khai phân tích acid sialic trên LC-MS/MS ở chế độ ESI(+) để định lượng Neu5Ac trong huyết tương người với độ nhạy và độ chọn lọc tốt [13]. Trong điều kiện ESI(+), NANA tạo ra ion phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 310 và chuyển mảnh đặc trưng sang ion con m/z 274. Việc sử dụng pha động giàu acetonitril cùng các chất điện ly dễ bay hơi trong HILIC có thể hỗ trợ quá trình ion hóa, qua đó cải thiện đáp ứng đối với NANA và NGNA, đồng thời khắc phục những hạn chế của ESI(+) khi phân tích.

Trong nghiên cứu này, chế độ ion hóa được khảo sát và lựa chọn đồng thời với quá trình tối ưu điều kiện sắc ký HILIC. Kết quả cho thấy, với hệ pha động gồm acetonitril, dung dịch ammonium formate và acid formic, chế độ ESI(+) cho tín hiệu ổn định, đáp ứng các yêu cầu về độ nhạy, độ lặp lại và các chỉ tiêu thẩm định theo hướng dẫn AOAC. Vì vậy, chế độ ion hóa ESI(+) được lựa chọn cho phương pháp phân tích.

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [8, 13] và cấu trúc của chất phân tích, các điều kiện MS/MS được khảo sát với kỹ thuật ion hóa phun điện từ ESI(+) và được quét ở chế độ theo dõi đa phản ứng (MRM), bằng cách tiêm trực tiếp vào hệ thống khối phổ lần lượt các dung dịch chuẩn của từng chất phân tích với nồng độ 1000 ng/mL. Các điều kiện phân mảnh ion, năng lượng bắn phá phân mảnh được tối ưu hóa tự động theo thiết bị khối phổ. Các ion con có tín hiệu cao nhất và cao thứ hai lần lượt được lựa chọn là mảnh định lượng và mảnh định tính. Điều kiện ion mẹ, ion con và các thông số tối ưu cho từng mảnh được trình bày ở **Bảng 1**.

Bảng 1. Giá trị mảnh phổ khối được lựa chọn để theo dõi tín hiệu NANA và NGNA

Chất phân tích	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Năng lượng va chạm (eV)
NANA	310,0	273,9*/120,7	18
NGNA	326,1	289,9*/308,0	20

* Mảnh ion sử dụng để định lượng

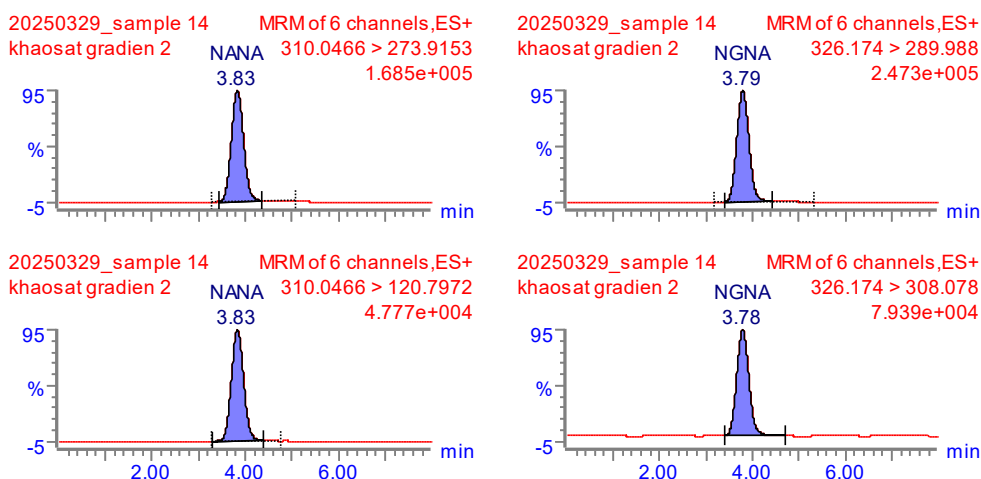
3.1.2. Điều kiện sắc ký

Để hỗ trợ quá trình ion hóa ở chế độ ESI(+), hệ dung môi pha động đã được bổ sung thêm NH_4^+ bằng cách sử dụng hệ đệm $\text{HCOONH}_4/\text{HCOOH}$ [2, 4, 9, 12, 13]. Điều kiện sắc ký phân tích NANA và NGNA bao gồm: cột sắc ký XBridge HILIC (150 mm $\times$ 4,6 mm, 3,5 μm), detector MS, thể tích tiêm 5 μL , hệ pha động được lựa chọn gồm hỗn hợp đệm amoni format/acid formic và ACN theo chương trình rửa giải gradient trình bày ở **Bảng 2**.

Bảng 2. Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (mL/phút)	HCOONH_4 5 mM/ HCOOH 0,2% trong ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$) (1:1) (%)	HCOONH_4 30 mM/ HCOOH 0,2% trong ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$) (1:1) (%)
0,00	0,50	100	0
1,00	0,50	100	0
1,50	0,50	0	100
3,00	0,50	100	0
8,00	0,50	100	0

Trong nghiên cứu này, cột XBridge HILIC được lựa chọn nhằm khảo sát một cơ chế lưu giữ phù hợp với đặc tính phân cực của NANA và NGNA và xây dựng điều kiện sắc ký tương thích với hệ thống LC-MS/MS. Cơ chế lưu giữ của HILIC dựa trên sự phân bố của chất phân tích giữa lớp nước hấp phụ trên bề mặt pha tĩnh và pha động giàu acetonitril, kết hợp với các liên kết hydro, tương tác lưỡng cực và tương tác tĩnh điện. Ngoài ra, việc sử dụng pha động chứa tỷ lệ acetonitril cao giúp tăng hiệu quả bay hơi trong nguồn ion hóa ESI(+). Kết quả khảo sát cho thấy hệ pha động sử dụng amoni format, acid formic và acetonitril trên cột XBridge HILIC cho diện tích pic lớn, hệ số đối xứng gần 1, tỷ lệ tín hiệu/nhiều cao và số đĩa lý thuyết lớn, vì vậy được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. **Hình 2** là sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp NANA và NGNA thu được với chương trình gradient pha động nêu trên. Hệ đệm amoni format/acid formic vừa cho thấy sự tương thích với kỹ thuật phân tích trên thiết bị LC-MS/MS do đây là hệ đệm bay hơi, tương thích với LC-MS/MS vừa hỗ trợ tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình proton hóa của các acid sialic. Cơ sở lựa chọn này phù hợp với các nghiên cứu trước đây của Shi và cộng sự [13], Karunanithi và cộng sự [5] cũng như Tebani và cộng sự [8].



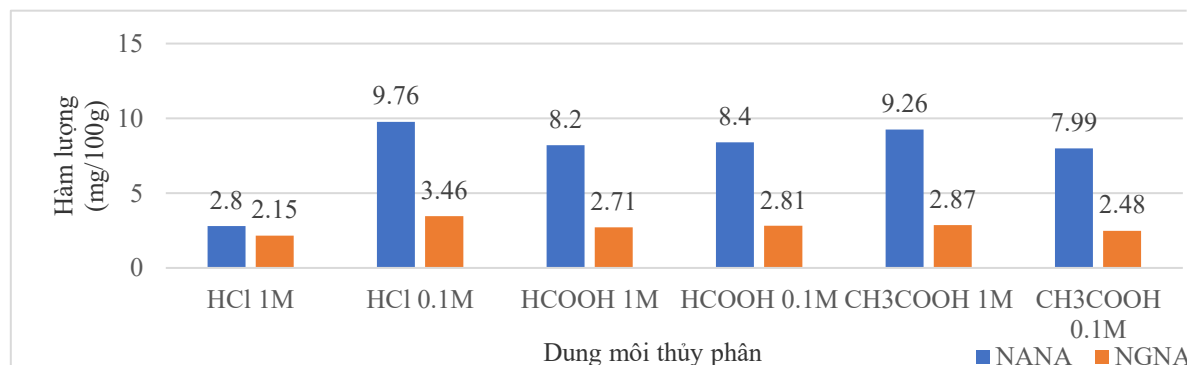
Hình 2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn NANA và NGNA sử dụng chương trình gradient

3.2. Kết quả khảo sát điều kiện xử lý mẫu

3.2.1. Dung môi thủy phân

Thực tế, về bản chất cấu trúc cả NANA và NGNA đều tồn tại dưới dạng là mắt xích cuối của các chuỗi glycan trên glycoprotein và glycolipid do đó dễ hoàn toàn giải phóng dưới dạng tự do tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình định tính, định lượng thì NANA và NGNA cần được thủy phân khỏi chuỗi glycan. Hai quá trình thủy phân thường được áp dụng để giải phóng chất phân tích trong các nghiên cứu trước đây là thủy phân acid hoặc thủy phân enzyme. Cụ thể, khi sử dụng phương pháp thủy phân acid, ưu điểm thu được là tiết kiệm chi phí nhưng hiệu quả thủy phân vẫn đảm bảo, tuy nhiên điều kiện thủy phân cần được tối ưu nhằm đảm bảo giải phóng hoàn toàn acid sialic khỏi dạng liên hợp, đồng thời hạn chế sự phân hủy của các chất phân tích dưới tác động của môi trường acid và nhiệt độ.

Trên cơ sở đó, nghiên cứu tiến hành khảo sát các dung môi thủy phân gồm HCl 1 M; HCl 0,1 M; HCOOH 1 M; HCOOH 0,1 M; CH₃COOH 1 M; CH₃COOH 0,1 M. Mẫu được thủy phân ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 1 giờ. Các điều kiện khác của quy trình xử lý mẫu được giữ cố định. Kết quả được thể hiện trong **Hình 3**.



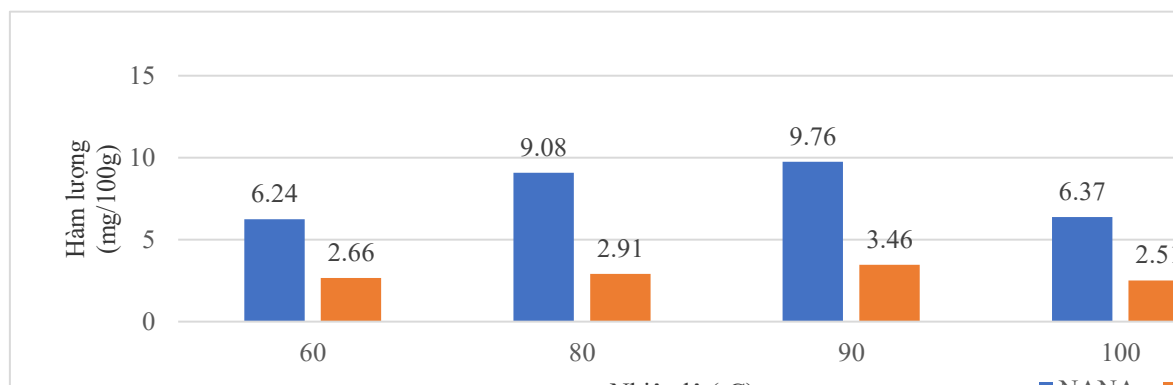
Hình 3. Kết quả khảo sát dung môi thủy phân

Kết quả khảo sát cho thấy HCl 0,1 M cho hàm lượng NANA và NGNA cao nhất trong các điều kiện khảo sát. Ở nồng độ acid cao hơn (HCl 1 M), tín hiệu của cả hai chất đều giảm, cho thấy môi trường acid mạnh có thể thúc đẩy quá trình phân hủy acid sialic sau khi được giải phóng khỏi glycoprotein. Đối với HCOOH và CH₃COOH, hiệu suất thủy phân thấp hơn tại thời gian thủy phân 1 giờ. Tuy nhiên, kết quả này chỉ phản ánh hiệu quả của các điều kiện đã khảo sát và không được sử dụng để khẳng định rằng HCOOH có khả năng thủy phân kém hơn HCl về bản chất. Thời gian thủy phân dài hơn có thể được xem xét trong các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá đầy đủ hơn khả năng sử dụng HCOOH. Trong nghiên cứu này, HCl 0,1 M được lựa chọn do cho đáp ứng cao đối với cả NANA và NGNA trong phạm vi điều kiện khảo sát. Sau khi tối ưu hóa, điều kiện thủy phân này được sử dụng trong quy trình và cho kết quả thẩm định đáp ứng các yêu cầu về độ đúng, độ chính xác và độ nhạy của phương pháp. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Allen (2022) và Tebani và cộng sự (2011), trong đó HCl loãng được sử dụng như một điều kiện thích hợp để giải phóng acid sialic từ các cấu trúc liên kết [6, 8].

Mặc dù điều kiện này cho hiệu quả thủy phân tối ưu nhất trong phạm vi khảo sát và mẫu đã được pha loãng nhiều lần để nằm trong khoảng tuyến tính của phương pháp trước khi phân tích, quá trình này cũng đồng thời đưa thêm ion Cl⁻ vào dịch chiết, gây ra nguy cơ nhiễm bẩn thiết bị và thay đổi hiệu suất ion hóa, ảnh hưởng đến độ nhạy của thiết bị MS. Do đó khi áp dụng phương pháp này việc đánh giá ảnh hưởng của hiệu ứng nền lên thiết bị là bắt buộc để đảm bảo độ tái lập của phép phân tích.

3.2.2. Nhiệt độ thủy phân

Nhiệt độ là một trong những yếu tố làm ảnh hưởng tới khả năng thủy phân chất phân tích. Nhiệt độ quá thấp thì có thể chưa xảy ra quá trình thủy phân. Ngược lại, nhiệt độ quá cao có thể khiến chất phân tích bị phân hủy. Vì vậy, tiến hành khảo sát các nhiệt độ thủy phân khác nhau, với nồng độ HCl được cố định ở 0,1 M và thời gian thủy phân là 1 giờ, kết quả được thể hiện trong **Hình 4**.

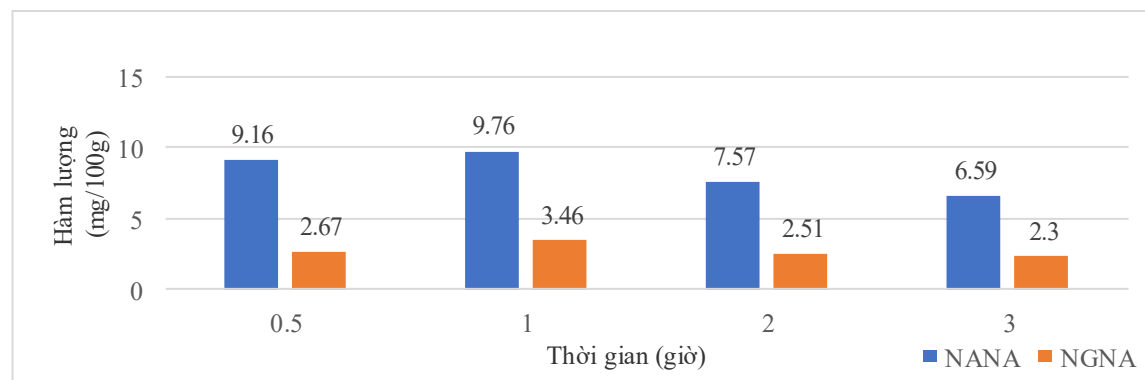


Hình 4. Kết quả khảo sát nhiệt độ thủy phân

Trong quá trình gia nhiệt từ 60 đến 90°C, động năng phân tử tăng làm tăng tốc độ cắt liên kết glycosid của glycoprotein nên lượng acid sialic được giải phóng tăng dần. Tuy nhiên, ở 100°C, tín hiệu giảm rõ rệt, chứng tỏ tốc độ phân hủy acid sialic trong môi trường acid đã lớn hơn tốc độ giải phóng. Điều này phản ánh sự cân bằng giữa hiệu suất thủy phân và độ bền nhiệt của NANA, NGNA [2].

3.2.3. Thời gian thủy phân

Thời gian thủy phân cũng là yếu tố ảnh hưởng đến lượng chất phân tích. Thời gian quá ngắn thì chất phân tích chưa được giải phóng hoàn toàn. Ngược lại, thời gian quá dài sẽ tốn thời gian hoặc gây ra sự phân hủy chất phân tích. Vì vậy, tiến hành khảo sát thủy phân mẫu ở các thời gian khác nhau, với nồng độ HCl được cố định ở 0,1 M và nhiệt độ thủy phân là 90°C, kết quả khảo sát được thể hiện ở **Hình 5**.



Hình 5. Kết quả khảo sát thời gian thủy phân

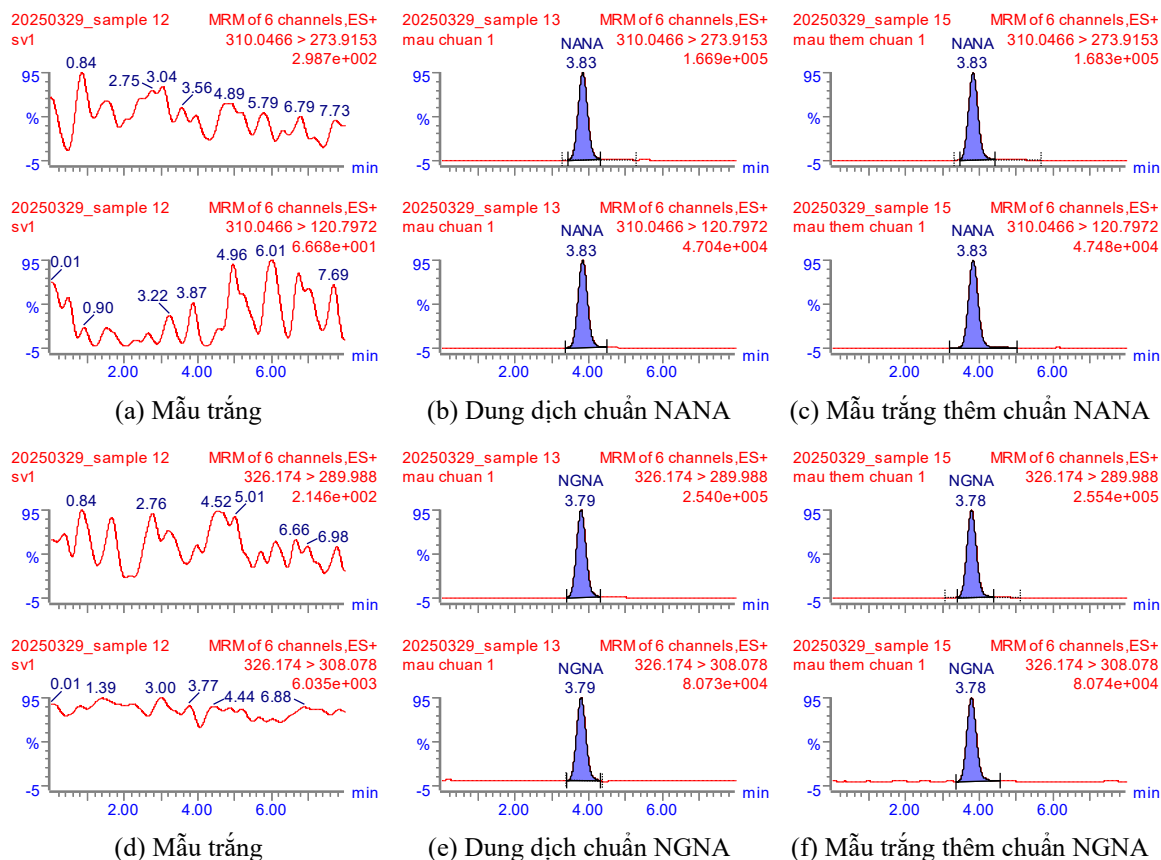
Trong giai đoạn đầu, việc kéo dài thời gian thủy phân làm tăng hiệu quả giải phóng acid sialic khỏi glycoprotein. Sau 1 giờ, hàm lượng acid sialic đạt giá trị cao nhất. Khi tiếp tục kéo dài thời gian thủy phân đến 2 – 3 giờ, hàm lượng acid sialic giảm, cho thấy các acid sialic tự do có thể bị phân hủy hoặc mất ổn định dưới tác động kéo dài của môi trường acid và nhiệt độ [2, 6, 8].

Sau khi khảo sát các điều kiện, quy trình chuẩn bị mẫu cuối cùng được thực hiện như sau: Mẫu được đồng nhất sơ bộ trước khi cân trên cân kỹ thuật 1 lượng chính xác vào ống ly tâm 50 mL: 0,5 – 1 g đối với mẫu tổ yến tinh chế, 1 – 5 g đối với nền mẫu sản phẩm từ tổ yến. Bổ sung 45 mL dung môi thủy phân HCl 0,1 M, vortex 30s. Thủy phân bằng bể điều nhiệt ở 90°C trong 1 giờ, lắc đảo đều mẫu 15 phút/1 lần, làm nguội đến nhiệt độ phòng và ly tâm tốc độ 6000 vòng/phút trong 3 phút. Lấy phần dịch, định mức 50 mL bằng nước. Lọc mẫu qua màng 0,2 µm và pha loãng đến nồng độ thích hợp trước khi phân tích bằng LC-MS/MS.

3.3. Kết quả xác định giá trị sử dụng phương pháp

Mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn được chuẩn bị và phân tích theo quy trình đã xây dựng để đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp. Dung dịch chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn được chuẩn bị với NANA và NGNA ở nồng độ 250 ng/mL mỗi chất. Về thời gian lưu, tại thời gian lưu của chất phân tích, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn có độ lệch $t_R \leq 1\%$. Đồng thời, tại t_R đó trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện tín hiệu.

Ngoài ra, số điểm IP (thông số đánh giá về mặt phổ khối) cũng được sử dụng để đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp phân tích. Theo kết quả trong **Bảng 1**, chất phân tích NANA và NGNA đều đạt điểm 5 khi theo dõi được 1 mảnh mẹ và 2 mảnh con tương ứng cho 1 mảnh mẹ của mỗi chất, đáp ứng yêu cầu phân tích trên khối phổ theo EU 2021/808 [10]. Điều này cho thấy phương pháp phân tích đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu trong thẩm định phương pháp (**Hình 6**).



Hình 6. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu

Đường chuẩn của NANA và NGNA được xây dựng trong khoảng nồng độ 25 – 5000 ng/mL bằng cách pha loãng trực tiếp dung dịch chuẩn trong ACN 50%. Đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic đáp ứng và nồng độ chất phân tích. **Bảng 3** trình bày chi tiết các kết quả về phương trình hồi quy, hệ số hồi quy và giá trị ước tính LOD – LOQ của phương pháp. Độ chính xác của phương pháp được đánh giá thông qua độ lặp lại (RSD_r) và độ tái lập nội bộ (RSD_R) trên một số nền mẫu (**Bảng 4**), trong khi độ đúng thực hiện tại 3 mức thêm chuẩn 80, 100 và 120 ng/mL; kết quả độ thu hồi ($H\%$) được trình bày trong **Bảng 5**.

Bảng 3. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính, LOD và LOQ của các chất phân tích

Chất phân tích	Phương trình hồi quy	Độ chệch (%)	Hệ số tuyến tính (r)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	R
NANA	$y = 6,9752x + 30,5295$	$-12,13 - + 7,70$	0,999	0,37	1,23	6,64
NGNA	$y = 9,8938x - 21,136$	$-9,02 - + 0,92$	0,999	0,37	1,23	6,81

Phương pháp được đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu thông qua thực hiện phân tích lặp lại 3 lần mẫu trắng thêm chuẩn và dung dịch chuẩn có nồng độ 50,0 ng/mL (tương ứng với LOQ). Giá trị ảnh hưởng nền ($ME\%$) đối với nền tổ yến, yến chưng và nước yến thu được lần lượt là $-2,98$, $-3,60$, $-1,66\%$, kết quả này nằm trong giới hạn có thể chấp nhận ($\pm 15\%$) và cho thấy đường chuẩn dung môi có thể được sử dụng trong quá trình định lượng phân tích mẫu [14].

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ chính xác

Nền mẫu	Thông số	Kết quả %		Thông số	Kết quả %	
		NANA	NGNA		NANA	NGNA
Tổ yến		1,61	2,01		2,28	2,57
Yến chưng	RSD_r%	1,81	2,01	RSD_r%	2,47	3,54
Nước yến		2,06	2,43		2,24	3,47

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ đúng

Chất phân tích	Mức thêm chuẩn (ng/mL)	Hàm lượng trung bình (mg/kg)	Độ thu hồi (H%)
NANA	80	1,90 ± 0,07	92,06 – 103,24
	100	2,66 ± 0,28	95,73 – 104,38
	120	2,86 ± 0,23	86,03 – 106,80
NGNA	80	1,89 ± 0,55	85,73 – 103,75
	100	2,20 ± 0,35	95,60 – 109,14
	120	2,91 ± 0,13	90,56 – 103,73

Như vậy, quá trình thẩm định cho thấy phương pháp đã xây dựng đạt các yêu cầu về xây dựng phương pháp phân tích hóa lý với độ đặc hiệu cao, khoảng tuyến tính tốt với giá trị $r \geq 0,999$. Đồng thời độ đúng và độ chính xác đều đáp ứng được yêu cầu của AOAC tại từng mức hàm lượng với giá trị RSD_r: 1,61 – 2,43% và H: 85,73 – 109,14%. LOD và LOQ của phương pháp lần lượt là 0,37 mg/kg và 1,23 mg/kg được đánh giá là tin cậy do hệ số R cho cả 2 chất đều thuộc khoảng giá trị 4 – 10. Các thông số thẩm định đều đáp ứng yêu cầu của AOAC, khẳng định phương pháp có độ đặc hiệu, độ nhạy và độ tin cậy cao, phù hợp để phân tích đồng thời NANA và NGNA trong tổ yến và các sản phẩm tổ yến, phục vụ công tác kiểm nghiệm và kiểm soát chất lượng.

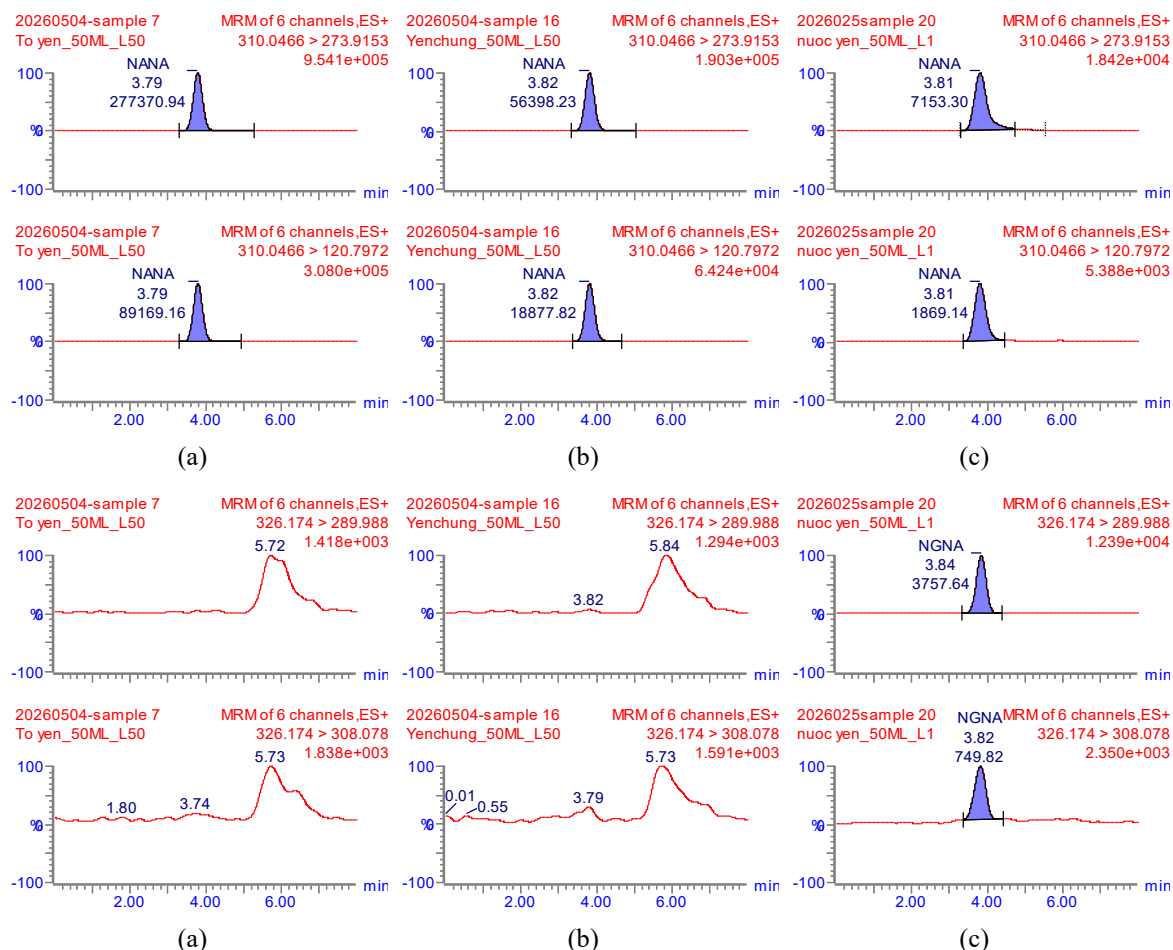
3.4. Xác định hàm lượng NANA, NGNA trong một số mẫu tổ yến và sản phẩm từ tổ yến

Phương pháp LC-MS/MS sau khi được thẩm định đã được ứng dụng để phân tích hàm lượng NANA, NGNA trong một số mẫu tổ yến (được mã hóa TY) và sản phẩm từ tổ yến (được mã hóa YC) được thu thập trên thị trường. Tất cả các mẫu được phân tích trong hai lần lặp lại và kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình. Một số sắc ký đồ trong **Hình 7** là sắc ký đồ phân tích các mẫu tổ yến, yến chưng, và nước yến thực tế. Kết quả cụ thể của 20 mẫu thực được trình bày ở **Bảng 6**.

Kết quả phân tích 20 mẫu tổ yến và sản phẩm từ tổ yến cho thấy NANA được phát hiện trong tất cả các mẫu tổ yến với hàm lượng từ 8,46 – 11,6 g/100 g, trong khi hàm lượng NGNA < LOD phương pháp ở trong các mẫu tổ yến. Kết quả phân tích này cho thấy sự tương đồng về mặt hàm lượng với các nghiên cứu trước đây, trong đó NANA được ghi nhận là dạng acid sialic có thành phần chủ yếu trong tổ yến còn NGNA thường chỉ xuất hiện ở hàm lượng rất thấp [1, 11].

Đối với các sản phẩm từ tổ yến, hàm lượng NANA dao động trong khoảng 0,59 – 420 mg/100 g, cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các mẫu phân tích. Trong khi đó, NGNA chỉ được phát hiện ở hai mẫu YC02 và YC05 với hàm lượng rất thấp, lần lượt là 0,20 mg/100 g và 0,16 mg/100 g (tương đương khoảng 2,0 và 1,6 mg/kg); các mẫu còn lại đều có hàm lượng nhỏ hơn giới hạn phát hiện của phương pháp. Sự khác biệt về hàm lượng NANA giữa các sản phẩm có thể phản ánh sự đa dạng về tỷ lệ tổ yến sử dụng trong công thức, mức độ pha loãng cũng như ảnh hưởng của quá trình chế biến. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Poon và Sze [4], trong đó NANA được xác định là dạng acid sialic chủ yếu trong các sản phẩm từ tổ yến.

Tổ yến và các sản phẩm liên quan thường phức tạp và chứa nhiều glycoprotein, carbohydrat, peptid và các hợp chất phân cực khác. Quá trình xử lý mẫu bằng acid nhằm giải phóng acid sialic ra khỏi glycoprotein cũng có thể làm hòa tan hoặc giải phóng thêm các thành phần khác vào dịch chiết như các acid amin. Các tạp chất này khi đồng rửa giải với chất phân tích có thể làm thay đổi hiệu suất ion hóa thông qua hiện tượng cạnh tranh ion hóa. Trong nghiên cứu hiện tại, giá trị ảnh hưởng nền (% ME) đã được xác định đối với tổ yến, yến chưng và nước yến, dao động từ –3,60 đến –1,66%, cho thấy hiện tượng cạnh tranh ion hóa được kiểm soát tại mức nồng độ nghiên cứu.



Hình 7. Sắc ký đồ phân tích mẫu thực của tổ yến (a); yến chưng (b) và nước yến (c)

Bảng 6. Kết quả phân tích các mẫu thực

		Hàm lượng NANA	Hàm lượng NGNA	Hàm lượng tổng acid sialic
Mẫu tổ yến (g/100 g)				
1	TY 01	8,46	-	8,46
2	TY 02	8,79	-	8,79
3	TY 03	9,33	-	9,33
4	TY 04	10,4	-	10,4
5	TY05	10,6	-	10,6
6	TY 06	10,7	-	10,7
7	TY 07	11,0	-	11,0
8	TY 08	11,5	-	11,5
9	TY 09	11,6	-	11,6
Mẫu sản phẩm tổ yến (mg/100 g)				
10	YC 01	0,59	-	0,59
11	YC 02	1,49	0,20	1,69
12	YC 03	4,25	-	4,25
13	YC 04	15,0	-	15,0
14	YC 05	21,7	0,16	21,9

		Hàm lượng NANA	Hàm lượng NGNA	Hàm lượng tổng acid sialic
15	YC 06	48,4	-	48,4
16	YC 07	63,6	-	63,6
17	YC 08	116	-	116
18	YC 09	196	-	196
19	YC 10	313	-	313
20	YC 11	420	-	420

“-” Hàm lượng chất phân tích nhỏ hơn LOD

Giới hạn định lượng của phương pháp đối với cả NANA và NGNA là 1,23 mg/kg. Đối với NANA, mẫu có hàm lượng thấp nhất trong nghiên cứu cũng đạt khoảng 5,9 mg/kg, cao gấp khoảng 4,8 lần LOQ. Đối với NGNA, hai mẫu được định lượng có hàm lượng khoảng 1,6 và 2,0 mg/kg, chỉ cao hơn LOQ khoảng 1,3 – 1,6 lần. Điều này cho thấy độ nhạy của phương pháp đáp ứng tốt yêu cầu định lượng NANA trong các nền mẫu khảo sát và có khả năng định lượng NGNA ở mức hàm lượng thấp trong một số sản phẩm.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định phương pháp LC-MS/MS để định lượng đồng thời NANA và NGNA trong tổ yến và các sản phẩm từ tổ yến. Kết quả xác định giá trị sử dụng phương pháp cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu cao, khoảng tuyến tính từ 25 – 5000 ng/mL với hệ số tương quan $r \geq 0,999$. Độ lặp lại (RSD_r) đạt 1,61 – 2,43%, độ thu hồi nằm trong khoảng 85,73 – 109,14%, đáp ứng yêu cầu của AOAC. LOD và LOQ lần lượt là 0,37 mg/kg và 1,23 mg/kg, cho thấy phương pháp có khả năng phát hiện và định lượng NANA và NGNA trong tổ yến và sản phẩm từ tổ yến.

Phương pháp được áp dụng để phân tích 20 mẫu thực tế, gồm 9 mẫu tổ yến và 11 mẫu sản phẩm từ tổ yến. Kết quả cho thấy NANA là dạng acid sialic chiếm ưu thế trong tổ yến cũng như các sản phẩm từ tổ yến, trong khi NGNA chỉ được định lượng ở hai mẫu sản phẩm và không được phát hiện (< LOD) trong các mẫu còn lại. Sự khác biệt về hàm lượng NANA giữa các mẫu có thể liên quan đến nguồn nguyên liệu, thành phần và đặc điểm chế biến của từng sản phẩm.

Trong phạm vi điều kiện đã được khảo sát và thẩm định, phương pháp LC-MS/MS được xây dựng trong nghiên cứu có thể sử dụng trong kiểm nghiệm thường quy để định lượng acid sialic (NANA, NGNA), phục vụ đánh giá chất lượng tổ yến và các sản phẩm từ tổ yến, đồng thời cung cấp cơ sở khoa học phục vụ đánh giá chất lượng, xác thực nguyên liệu và tăng cường kiểm soát các sản phẩm từ tổ yến lưu hành trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [20]. Y. Dai, J. Cao, Y. Wang, Y. Chen, and L. Jiang, "A comprehensive review of edible bird's nest," *Food Research International*, vol. 140, p. 109875, 2021.
- [21]. Y. Dai, J. Cao, Y. Zhang, F. He, and L. Jiang, "Study on sialic acid binding state in stewed bird's nest and optimization of enzymatic extraction of free and oligosaccharide-bound sialic acid," *Journal of AOAC International*, vol. 105, no. 2, pp. 567–575, 2022.
- [22]. J. Nilai-Banting, "Preliminary study on free sialic acid content of edible bird nest from Johor and Kelantan," *Malaysian Journal of Veterinary Research*, vol. 5, no. 1, pp. 9–14, 2014.
- [23]. P. M.-Y. Poon and E. T.-P. Sze, "Development of method for evaluation of edible bird's nest content in ready-to-eat beverages," *Journal of AOAC International*, vol. 106, no. 4, pp. 1003–1009, 2023.
- [24]. D. Karunanithi, A. Radhakrishna, and V. M. Biju, "Quantification of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in human milk using N-glycolylneuraminic acid as internal standard by LC-MS/MS," *International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, vol. 3, no. 4, pp. 299–308, 2012.
- [25]. M. Allen, "Development of tools for glycan analysis and quantitative sialic acid glycomics," Ph.D. dissertation, The Open University, Milton Keynes, U.K., 2022.
- [26]. AOAC International, "Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements," in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 2016.
- [27]. A. Tebani, D. Schlemmer, A. Imbard, O. Rigal, D. Porquet, and J.-F. Benoist, "Measurement of free and total sialic acid by isotopic dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method," *Journal of Chromatography B*, vol. 879, no. 31, pp. 3694–3699, 2011.

- [28]. X. Zhang et al., "Determination of 3'-sialyllactose in edible bird's nests and the effect of stewing conditions on the 3'-sialyllactose content of edible bird's nest products," *Molecules*, vol. 28, no. 4, p. 1703, 2023.
- [29]. European Commission, "Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC," *Official Journal of the European Union*, vol. L 180, pp. 84–109, 2021.
- [30]. R. Lacomba, J. Salcedo, A. Alegría, M. Jesús Lagarda, R. Barberá, and E. Matencio, "Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: A review," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 51, no. 2, pp. 346–357, 2010.
- [31]. N. T. H. Ngoc, M. T. T. Hoa, D. T. M. Hoa, T. H. Son, C. C. Khanh, P. T. T. Ha, and L. T. H. Hao, "Determination of sialic acid in dietary supplement by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)," *Vietnam Journal of Food Control*, vol. 2, no. 3, pp. 3–9, 2019, (in Vietnamese).
- [32]. Y. Shi et al., "Quantitative hydrophilic interaction chromatography–mass spectrometry analysis of N-acetylneuraminic acid and N-acetylmannosamine in human plasma," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 1000, pp. 105–111, 2015.
- [33]. S. C. Tran, *Method validation and assessment of measurement uncertainty in chemical analysis*, Science and Technics Publishing House, 2021, (in Vietnamese).
- [34]. D. V. McCalley, "Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1523, pp. 49–71, 2017.
- [35]. R. Schauer, "Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids," *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, vol. 40, pp. 131–234, 1982.