

高效液相色谱法测定乳中唾液酸含量

冯君, 李宏基, 韩立强, 李卫华, 李平, 杨国宇

(河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 利用酸水解法把乳中的唾液酸释放出来, 以邻苯二氨盐酸盐 (10 mg/mL) 为衍生化试剂, 在 80 °C 水浴锅中衍生 40 min, 采用 Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 1.0% 的四氢呋喃水溶液 (含 0.2% 磷酸) - 乙腈 (92:8); 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 °C; 紫外检测波长 230 nm。结果表明, 唾液酸在 10~320 μg/mL 范围内线性良好, 平均回收率为 95.7%。本方法具有灵敏度高, 重复性好等特点, 可准确测定乳中唾液酸含量。

关键词: 乳; N-乙酰神经氨酸; 高效液相色谱法

中图分类号: TS252.1; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)12-0075-03

Determination of the Sialic Acid Content in Milk by HPLC

FENG Jun, LI Hong-ji, HAN Li-qiang, LI Wei-hua, LI Ping, YANG Guo-yu

(College of Animal Husbandary and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Sialic acid in milk was released via acid hydrolysis, and then derivated with O-pheny-lenediamine •2HCl (10 mg/mL) at 80 °C for 40 min. The content of the derivated sialic acid was determined on a Symmetry C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) using a UV detector at 230 nm. The mobile phase was a mixture of 1.0% tetrahydrofuran (containing 0.2% phosphoric acid) and acetonitrile (92:8) at a flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 35 °C. The results indicated the linear range of Sialic acid was 10~320 μg/mL and the average recovery was 95.7%. This method for the determination of the sialic acid content in milk had good reproducibility and high sensitivity.

Key words: milk; N-Acetylneuraminic acid; high performance liquid chromatography

唾液酸 (Sialic Acid, SA) 是一族神经氨酸 (Neuraminic acid) 的衍生物, 广泛存在于多种生物组织中, 是构成细胞膜上糖蛋白和糖脂的重要成分, 在大部分哺乳动物组织中发现的唾液酸主要是 N-乙酰神经氨酸, 所以通常把 N-乙酰神经氨酸称为唾液酸, 它参与细胞表面的多种生理功能。另外, 唾液酸是一种天然的大脑营养素, 它能促进婴儿的记忆力和智力发育^[1]。唾液酸的食物来源主要是母乳, 尤其是初乳中的含量最高, 也存在于牛奶、鸡蛋和奶酪中。本文对乳中唾液酸含量测定进行了初步研究, 在国内外首次采用 HPLC-UV 法, 以邻苯二氨盐酸盐 (OPD) 为衍生化试剂测定了乳中唾液酸含量, 与传统的紫外方法比较^[2], 具有定量准确、方便快捷, 灵敏度高等特点。

1 材料与amp;方法

收稿日期: 2007-08-23

基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (0522010800)

作者简介: 冯君 (1982-), 男, 汉族, 硕士研究生, 研究方向: 乳生物化学
通讯作者: 杨国宇 (1966-), 男, 汉族, 博士, 教授, 主要从事动物性食品安全的教学与研究。

1.1 仪器与试剂材料

高速冷冻离心机 (Sigma 公司); 高效液相色谱仪 (Waters 公司); 旋转蒸发仪 (上海盛玻仪器有限公司); N-乙酰神经氨酸对照品 (N-Acetylneuraminic acid, Neu5Ac) 购自 Sigma 公司; 邻苯二氨盐酸盐 (OPD) 购自中博生物公司; 四氢呋喃和乙腈均为色谱纯, 硫酸氢钠、磷酸、三氯乙酸为分析纯, 乳样采自河南省郑州市毛庄奶牛厂, 所有用水均为超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Symmetry C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 流动相: 1.0% 四氢呋喃水溶液 (含 0.2% 磷酸) - 乙腈 (92:8); 检测波长: 230 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样体积: 10 μL。

1.2.2 样品溶液的制备^[1,3]

准确量取牛奶 10 mL 于离心管中, 在 4 °C、3500 r/min 离心 30 min, 取出后将上层油脂除去, 再加入等体积的 10% 的三氯乙酸溶液沉淀蛋白, 混匀以后冰上放置 10 min, 再离心 30 min, 将上清液移入锥形瓶中, 再加入 5 mL 冷的 5% 的三氯乙酸洗涤沉淀, 混匀后在 4 °C、3500 r/min 离心 20 min, 将上清液移走, 合并

两次的上清液,加入等量的 0.1 mol/L 的硫酸溶液,放入 80 °C 水浴锅中 2 h 进行酸水解。取出后用流水冷却、过滤,在旋转蒸发仪上蒸发浓缩至 10 mL。取此溶液 2 mL,加入 10 mg/mL 邻苯二氨盐酸盐溶液(用 0.2 mol/L 硫酸氢钠溶液溶解)1 mL,再置于 80 °C 水浴锅中加热 40 min,取出后冷却,经 0.45 μm 膜过滤后精密吸取上述溶液 10 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积。

1.2.3 对照品溶液的制备

取 N-乙酰神经氨酸对照品溶液 2 mL,再加入 10 mg/mL 邻苯二氨盐酸盐溶液 1 mL,置于 80 °C 水浴中加热 40 min,取出后冷却,经 0.45 μm 膜过滤后精密吸取上述溶液 10 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积。

2 结果与讨论

2.1 唾液酸的衍生化原理

唾液酸(SA)是一种碳水化合物,它以九碳酮糖酸-神经氨酸为骨架,通常在糖蛋白或糖脂的末端以糖苷的形式存在^[4]。在乳中唾液酸以 N-乙酰神经氨酸的形式存在,它在酸性条件下与 OPD 反应,生成有强紫外吸收的唾液酸衍生物,反应式见图 1。

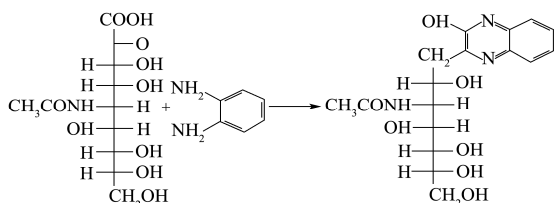


图 1 N-乙酰神经氨酸反应机理

Fig.1 Mechanism of N-Acetylneuramic acid

2.2 唾液酸的色谱图

唾液酸对照品及样品中唾液酸的色谱图见图 2。

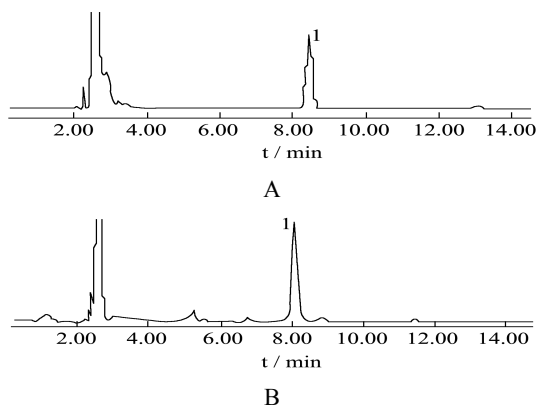


图 2 对照品溶液(A)与样品溶液(B)的色谱图

Fig.2 Chromatograms of the reference solution (A) and the test solution (B)

注: 1 为 N-乙酰神经氨酸(N-Acetylneuramic acid)。

2.3 线性关系考察

精密称取 N-乙酰神经氨酸对照品适量,加水溶解并稀释成 5 mg/mL 的对照品储备液。配制质量浓度分别为 10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL、80 μg/mL、160 μg/mL、200 μg/mL、320 μg/mL 的对照品溶液,按对照品溶液的处理方法处理,记录峰面积。以含量对峰面积作图得标准曲线,此标准曲线线性良好,线性方程为:

$$Y=52.1X+9.03, r=0.995, \text{ 其中 } Y \text{ 为色谱峰面积 (mv}\cdot\text{s), } X \text{ 为唾液酸质量浓度 } (\mu\text{g/mL}).$$

2.4 进样精密度试验

取 N-乙酰神经氨酸对照品溶液,重复进样测定 6 次,其 RSD 为 1.02%。

2.5 稳定性试验

取同一份样品溶液,分别于 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、10 h 测定其峰面积,其 RSD 为 1.7%,表明该样品在 10 h 内稳定。

2.6 重复性实验

分别量取牛奶各 10 mL,共 6 份,按样品溶液的处理方法处理后进样,结果 RSD 为 1.4%,表明该方法重复性良好。

2.7 最低检测限的测定

取 N-乙酰神经氨酸对照品溶液适量,加水倍比稀释,按照 1.2.3 的处理方法进样测定,直至其峰高约为噪音的 3 倍。按公式 $D_1=3NW/A$ 计算最低检测限(D_1 为检测限, N 为噪间峰高, W 为进样浓度, A 为 N-乙酰神经氨酸峰高)。结果 N-乙酰神经氨酸的最低检测限为 0.25 μg/mL。

2.8 样品中唾液酸的含量测定

取牛奶样品 6 批,按 1.2.2 方法处理后,精密吸取 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录峰面积,按外标法算其含量,结果见表 1。

表 1 唾液酸含量

Table 1 Contents of the free sialic acid and sialic acid bounded with oligosaccharide

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	均值
含量 (mg/L)	0.082	0.061	0.068	0.052	0.073	0.069	0.068
RSD/%	1.52						

2.9 加样回收率试验

在原样品含量的基础上加入不同量的唾液酸标样,测定方法的回收率,数据如表 2 所示,回收率在

(下转第 84 页)