

- [8] Chandra RK. Breast feeding, hydrolysate formulas and delayed introduction of selected foods in the prevention of food hypersensitivity and allergic disease[J]. *Nutrition Research*, 2004, 22(1):125-135.
- [9] Shea KM, Trucker RT, Weber RW, et al. Climate change and allergic disease[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2008, 122(3):443-453.
- [10] 李明华, 殷凯生, 蔡映云. 哮喘病学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005:9-10.

【基金项目】首都儿科研究所、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、全国儿童哮喘与过敏协作组第三次全国儿童哮喘流调项目(2010)

【作者简介】刘继贤(1956-), 女, 江西人, 主任医师, 学士学位, 主要研究方向为儿童哮喘防治。

收稿日期: 2012-05-11

本刊网址: www.cjchc.net

文章编号: 1008-6579(2012)11-1022-04

【临床研究与分析】

荧光高效液相色谱法测定血清中总唾液酸含量的分析

柏丹丹¹, 李红卫², 潘莉莉², 王冰³, 古桂雄¹

(1 苏州大学儿科研究所, 江苏 苏州 215003; 2 厦门大学公共卫生学院, 福建 厦门 361005; 3 厦门大学医学院, 福建 厦门 361005)

中图分类号: R722 文献标识码: A

摘要: 【目的】探讨荧光高效液相色谱法测定血清中总唾液酸含量的最佳条件。【方法】按优化实验的原则, 将人体血清分别用三氟乙酸、硫酸、盐酸 80℃ 水解, 酸化浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20 mol/L, 酸解时间分别为 30、60、90、120 min, 经 50℃ 避光衍生 150 min 后进行色谱分析。【结果】用 0.10 mol/L TFA 溶液 80℃ 水解 60 min 测定的唾液酸浓度最佳, 唾液酸的最适宜浓度在 0.625~80 μmol/L 范围内, 其平均回收率为 94.0%, 精密性、稳定性、重复性试验的相对标准差分别为 1.3%、1.1% 和 1.0%。Neu5Ac 的最低检出限为 0.02 μmol/L, 16~19 岁健康青少年血清中唾液酸 (Neu5Ac) 含量的平均值为 (2.12±0.15) mmol/L。【结论】荧光高效液相色谱法测定唾液酸简单、重复性好、灵敏度高, 可广泛用于人体血清唾液酸含量测定。

关键词: 血清; 唾液酸; 荧光高效液相色谱

Analysis of the total sialic acid content in serum determined with fluorometric high-performance liquid chromatography. BAI Dan-dan¹, LI Hong-wei², PAN Li-li², WANG Bing², GU Gui-xiong¹. (1 *Pediatric Research Institute of Soochow University, Suzhou, Jiangsu* 215003, China; 2 *Public Health School of Xiamen University, Xiamen, Fujian* 361005, China; 3 *Medical College of Xiamen University, Xiamen, Fujian* 361005, China)

Abstract: 【Objective】To determine the optimum conditions for total sialic acid analysis in serum using the fluorometric high-performance liquid chromatography (HPLC). 【Methods】The sialic acid standard operating fluid contained N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), N-glycolylneuraminic acids (Neu5Gc) and ketodeoxynonulosonic acid (KDN). The human plasma would be hydrolyzed with the trifluoroacetic acid (TFA), sulphuric acid and hydrochloric acid at different concentration of 0.05, 0.10, 0.15 mol/L and 0.20 mol/L at 80 °C and at varying time of 30, 60, 90 min and 120 min respectively. The hydrolyzed sample was treated with 4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride (DMB, Sigma) derivative reagent at 50 °C for 150 min away from light. 【Results】The maximum release of sialic acid was obtained with an equal volume of 0.1 mol/L TFA for 60 min at 80 °C. The optimum detection limit of sialic acid was in 0.625~80 μmol/L, the average recovery rate was 94.0% and the relative standard deviation (RSD) for the precision, stability and repeatability test were 1.3%, 1.1% and 1.0%, respectively. The minimum detection limit of Neu5Ac was 0.02 μmol/L and the average content of sialic acid in human serum was (2.12±0.15) mmol/L in 16~19 years old healthy adolescents. 【Conclusion】The total sialic acid content determined with fluorometric HPLC method is a simple, high sensitivity and good repeatability, which can be widely used in determination of sialic acid concentration in serum.

Key words: serum; sialic acid; fluorescence high performance liquid chromatography

唾液酸(sialic acid, SA)是一族带负电荷的九碳糖神经氨酸(neuraminic acid)的衍生物的总称, 即神经氨酸的氨基被乙醛基或羟乙酰基取代后产生的衍

生物^[1], 广泛分布于人体组织和体液中, 包括唾液、胃液、血清、尿液、眼泪、脑脊髓液和母乳等^[2]。唾液酸在血清中主要以糖蛋白和糖脂结合的形式存在, 唾液酸蛋白是细胞膜的重要组成部分, 亦是大脑神

经苷酸的重要组成成分,可修饰神经细胞粘附分子。唾液酸糖蛋白参与神经细胞的迁移和神经细胞轴突的生长,并具有多方面的神经功能,胚胎期中可调节神经发育,调节神经元突起的生长,轴突联系和记忆形成等过程。在恶性肿瘤或细胞恶性转化时,其细胞膜合成的唾液酸蛋白增多,可更多地脱落或分泌入血液,血清中唾液酸浓度在一定程度上可反应出细胞的恶变、癌症转移及浸润,是临床上恶性肿瘤的标记物之一^[1]。但炎症疾病(如结核、肺炎、风湿活动期等)、贫血、妊娠及手术创伤、动脉粥样硬化、糖尿病和某些与细胞损伤相关的疾病均可使血清唾液酸水平上升^[2],故测定血清中总唾液酸含量有重要的临床意义。

1 材料和方法

1.1 标本收集 本资料共收集 16~19 岁健康青少年 10 人,其中男性 6 名、女性 4 名。按知情同意和自愿参加的原则,在上午 08:00~10:00 时采集空腹静脉血 3 mL,置于无抗凝剂的试管内,经 1 000 r/min 离心 15 min,分离血清,供实验用。

1.2 主要实验试剂及溶液 N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac) 标准品、N-羟乙酰神经氨酸(N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc) 标准品和 2-酮基-3-脱氧九酮糖酸(ketodeoxynonulosonic acid, KDN) 标准品,4,5-亚甲二氧基-1,2-邻苯二胺盐酸盐(4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride, DMB) (Sigma 公司),甲醇与乙腈均为色谱纯(SK Chemical 公司),硫酸(1.84 g/mL)、三氟乙酸(1.535 g/mL)、盐酸(1.18 g/mL),冰醋酸、亚硫酸钠、硫代硫酸钠、2-巯基乙醇等,均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);水为超纯水。

标准品混合母液:每 1 mL 混合母液含 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Neu5Ac 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Neu5Gc 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 KDN 组成。

DMB 衍生液(8mM DMB):DMB 1.8 mg,1.5 M 冰醋酸 80.4 μL ,0.25 M 硫代硫酸钠及 0.25 M 亚硫酸钠 72 μL ,0.8 mM 2-巯基乙醇 50.8 μL ,超纯水 724.8 μL 。

1.3 主要实验仪器 高效液相色谱仪-带荧光检测器(Agilent-1200 型 Agilent 公司),色谱柱-Agilent ZORBAX ECLIPSE C18 柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),保护柱-Agilent ZORBAX ECLIPSE C18(4.6 mm \times 12.5 mm,5 μm),0.22 μm 微孔滤膜(上海楚定分析仪器有限公司),烘箱、振荡器、移液器、容量瓶等。

1.4 实验方法

1.4.1 血清预处理 首先取 100 μL 血清于

2 mL EP 管中,加入 900 μL 超纯水,即可得到稀释 10 倍的血清稀释液;按照上述方法再依次将该稀释液稀释 10 倍即为稀释 100 倍的血清稀释液,取该稀释液 500 μL ,加入等体积 0.10 mol/L TFA 于 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中水解 1.0 h,0.22 μm 滤器过膜。

1.4.2 唾液酸水解条件 1)酸解液的种类:三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)、硫酸(H_2SO_4)、盐酸(HCl);2)酸解液的浓度:上述各种酸化浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20 mol/L;3)酸解的时间:各种酸解液的不同浓度的酸化时间分别为 30、60、90、120 min;4)酸解温度:80 $^{\circ}\text{C}$ 。按照上述三方面每次唾液酸酸解的优化试验需要 48 份不同条件的酸解液。

1.4.3 DMB 衍生方法 90 μL 样品或标准品中加入 10 μL DMB 衍生液中,50 $^{\circ}\text{C}$ 避光衍生 150 min,冷却至室温后进行液谱分析。

1.4.4 色谱检测条件 流动相为甲醇-乙腈-超纯水(7:8:85);流速为 0.9 mL/min;进样体积 10 μL ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;荧光检测器激发波长 373 nm,发射波长 448 nm。每个样品均进样两次,于 HPLC 上检测两次,取两次峰面积的平均值作为测定结果。

1.4.5 制备标准曲线的工作液 将标准品混合母液依次等体积倍增稀释,配成七种不同浓度的溶液,供验证标准曲线线性关系使用,混合液的唾液酸浓度见表 1。

表 1 七种不同稀释液中的唾液酸浓度($\mu\text{mol/L}$)

Table 1 Concentration of sialic acid in the seven different dilution buffer($\mu\text{mol/L}$)

唾液酸种类	混合液 1	混合液 2	混合液 3	混合液 4	混合液 5	混合液 6	混合液 7
Neu5Ac	50	25	12.5	6.25	3.125	1.562 5	0.781 25
Neu5Gc	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312 5	0.156 25
KDN	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312 5	0.156 25

1.4.6 误差控制实验方法 将 Neu5Ac 标准品配制成 42 份的 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Neu5Ac 工作溶液,供误差控制实验用。

1)精密度实验:取 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Neu5Ac 工作溶液,按照上述衍生方法衍生后,分别重复进样测定 6 次,每次所测得的峰面积计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),从而判断该试验精密度。2)稳定性实验:取 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Neu5Ac 工作溶液,按照上述方法衍生,分别于其衍生后 0、1、2、4、6、8、10 h 测定其峰面积,计算 RSD,从而判断该样品衍生后在各时间段的稳定性。3)重复性实验:取同一人的血清,经血清预处理、衍生处理 6 份后,进机测定,所测得峰面积计算 RSD,从而判断该实验方法的重复性。

1.4.7 回收率实验 取 3 份血清,加入 Neu5Ac 标准品溶液,按上述方法测定唾液酸总量。

1.4.8 最低检测限的测定 取 Neu5Ac 标准品溶液,加水倍比稀释,按照标准品处理方法测定,直至被测标准品浓度所对应信噪比为 3,按公式 $D1 = 3NW/A$ 计算最低检测限(D1 为最低检测限,N 为噪音峰高,W 为进样摩尔浓度,A 为标准品峰高)。

2 结果

2.1 唾液酸的衍生化 唾液酸在酸解后能与 DMB 衍生液衍生生成 DMB 衍生物,该衍生物经 373 nm 激发波激发后,在 484 nm 能够产生可辨别可定量的较强荧光信号,从而在色谱仪中被识别并产生清晰的唾液酸图谱。

2.2 酸解的最佳条件 采用四种不同浓度酸解的样品稀释液分别于 80°C 水解 30、60、90、120min 于 HPLC 进行峰面积测定,结果显示,0.10 mol/L TFA 溶液 80°C 水解 60 min 测定的唾液酸峰面积最大。见图 1。

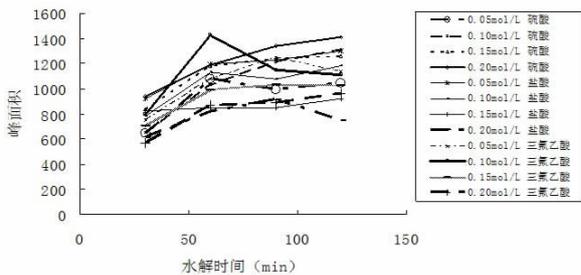


图 1 血清中唾液酸水解的优化

Fig.1 Optimize the condition of sialic acid released from serum

2.3 唾液酸的色谱图及特点 测定样品采用 TFA 酸解后与 DMB 衍生液衍生,经 HPLC-FLD 检测,可见不同唾液酸的色谱图。1)标准品混合母液的 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 含量,在色谱图上可良好分离。见图 2。Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 显示的保留时间分别为 11.822、9.210、8.492 min。2)血清中检测到的唾液酸(SA)的色谱图有其特点,根据标准品的保留时间可判定:11.891 min 的色谱峰对应的是血清中游离的 Neu5Ac 的色谱峰,可见采用本方法检测血清样品时未检测到 Neu5Gc、KDN。见图 3。

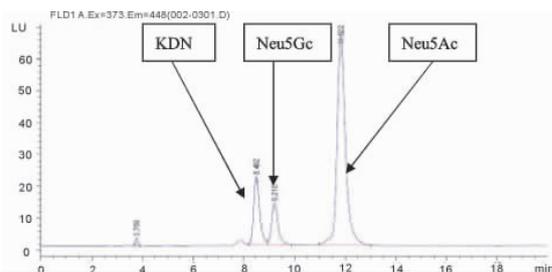


图 2 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN 的标准色谱图

Fig.2 Standard Chromatogram of Neu5Ac,Neu5Gc and KDN

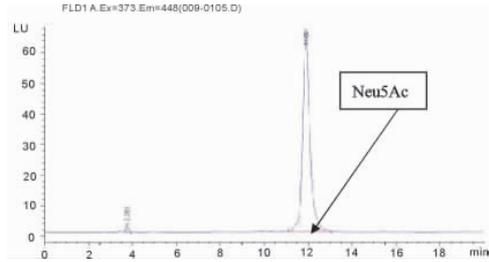


图 3 血清中唾液酸(Neu5Ac)色谱图

Fig.3 Chromatogram of sialic acid (Neu5Ac) in human serum

2.4 浓度线性实验 以峰面积为横坐标,标准品的浓度为纵坐标绘制标准曲线,计算标准曲线方程。Neu5Ac 的标准曲线的线性函数为: $Y = 0.0132X - 0.2858$, $R^2 = 0.9996$, $P < 0.01$,说明其在 0.625~80 μmol/L 浓度范围内线性关系良好。Neu5Gc 的标准曲线的线性函数为: $Y = 0.0581X - 0.1993$, $R^2 = 0.9994$, $P < 0.01$,提示其在 0.0125~40 μmol/L 浓度范围内线性关系良好。而 KDN 的标准曲线的线性函数为: $Y = 0.0706X - 0.4004$, $R^2 = 0.9985$, $P < 0.01$,表明其在 0.0125~40 μmol/L 浓度范围内线性关系良好。见图 4。

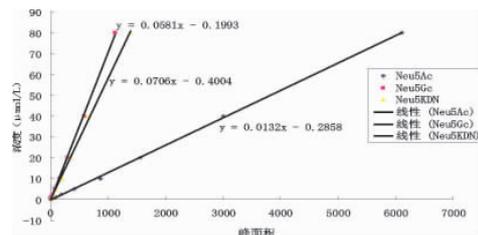


图 4 不同唾液酸的浓度-线性回归实验

Fig.4 The concentration-linear regression experiment of the different sialic acid

2.5 误差控制实验

2.5.1 精密度实验 本实验中所测得 6 次峰面积分别为 1 240、1 201、1 216、1 198、1 200 和 1 221,其 RSD 为 1.3%。

2.5.2 稳定性实验 本实验中所测定得峰面积分别为 1 240、1 201、1 198、1 210、1 220、1 218 和 1 213,其 RSD 为 1.1%。

2.5.3 重复性实验 本实验中所测得 6 个峰面积分别为 843、825、807、819、856 和 823,其 RSD 为 1.0%。

2.5.4 回收率实验 本实验的平均回收率为 94%。见表 2。表明样品处理过程中 Neu5Ac 损失较少。

表 2 血清唾液酸含量的回收率实验结果(μmol/L)

Table 2 Result of test for recovery in sialic acid of human serum (μmol/L)

Table with 6 columns: 样品号, 本底浓度, 添加浓度, 最后浓度, 回收率(%), 平均回收率(%). It contains 3 rows of experimental data.

2.6 最低检出限实验 本实验中所显示的

Neu5Ac 的最低检出限为 $0.02 \mu\text{mol/L}$ 。

2.7 血清中唾液酸(Neu5Ac)含量 本资料的 10 份血清样品经处理后,根据峰面积,按外标法计算其含量,血清唾液酸(Neu5Ac)的平均含量为 2.12 mmol/L ,标准差 0.15 mmol/L 。

3 讨论

目前已发现有 50 多种唾液酸^[1],其中 Neu5Ac 分布最广,是人体中存在的主要形式,当 N-乙酰基被羟基化作用后,生成 Neu5Gc,主要表达于灵长类即后口动物中,如马、狗的血清和大猩猩等动物体内,但在正常人群中含量较少。唾液酸分子多个位点的基团可被其他基团取代,若 C5 的氨基被羟基取代,则转化为 KDN,鱼卵中富含含有 KDN。

3.1 DMB 与唾液酸的特异反应良好 唾液酸是一种糖蛋白,主要以多糖的形式相结合,是一种低聚糖链。酸解后释放的唾液酸,容易和原液中的糖类物质混合在一起,则难达到检测所要求的分离度^[3]。本方法可与 DMB 衍生液衍生生成 DMB 衍生物^[4],消除血清中一些复杂物质对唾液酸检测的影响,因而具有其特异性。同时并不需要像比色法和色谱光度测量法等传统方法中用离子交换柱纯化唾液酸,使得操作方便简单,同时又避免了唾液酸的损失和 O-乙酰基的异构化。

3.2 本方法的最佳水解条件是 0.10 mol/L TFA 溶液 80°C 水解 60min 本实验选择 TFA、硫酸、盐酸作为酸解液进行唾液酸水解优化,其酸解常数(acid dissociation constant, PKA)分别为 0.5、-2.0、-6.3,PKA 越小酸性越强, H_2SO_4 和 HCl 均为负值,酸性远大于 TFA,在酸解过程中对唾液酸会有一定的破坏性。TFA 酸性温和,适于酸解唾液酸以最大程度的以游离形式释放出来。若水解的浓度过低,则未能充分水解,若浓度过高,则可改变唾液酸结构,本实验结果显示 TFA 在浓度为 0.10 mol/L 时表明水解最充分。酸解的温度^[5]和时间也很重要,若温度过低,或/和时间过短,则唾液酸未能充分水解。若温度过高,或/和时间过长,游离形式的唾液酸可部分挥发、降解或结构上的部分改变。本资料结果表明,唾液酸水解的最适温度为 80°C 、最适时间为 60 min,可供临床检验参考。

3.3 荧光高效液相色谱法准确、快速 传统的有比色法的间苯二酚显色的 Jourdan 法或硫巴比妥酸显色的 Warren 法以及改良的 Amoiff 法^[6],其都耗时耗力,成本较高,精密度低,而紫外高效液相色谱法(Ultraviolet High-Performance Liquid Chromatography, HPLC-UV)灵敏度亦低。荧光高效液相色谱

法(Fluorescence high performance liquid chromatography, HPLC-FLD)采用 DMB 衍生化技术,避免唾液酸受样品中其他碳水化物的干扰,实现较好的分离,可准确快速的测定血清中唾液酸的含量。用间苯二酚、硫巴比妥酸和酶裂解这三种方法检测生物组织中的唾液酸,其最低检出限分别是 0.12 , $0.20 \mu\text{mol}$ 和 $0.06 \mu\text{mol}$,重复性 RSD 分别为 4.5% , 3.1% 和 4.0% ^[4]。而本方法中 Neu5Ac 的最低检出限为 $0.02 \mu\text{mol}$,精密度、重复性、稳定性 RSD 分别为 1.3% 、 1.1% 、 1.0% ,均小于 3% ,可见本研究方法精密度高、重复性良好,唾液酸衍生后 10 h 内的稳定性较好。通过线性、精密度、稳定性、重复性、最低检出限和样品的测定,充分验证了本方法的可行性,可广泛用于血清、唾液、红细胞膜、奶粉、牛奶及母乳中等唾液酸的含量测定。

本实验在人血清样品中,唾液酸(Neu5Ac)的平均含量为 $(2.12 \pm 0.15) \text{ mmol/L}$,与国外研究相似^[1]。本实验仅检测到人血清中的 Neu5Ac,对于其他种类的唾液酸,有待于进一步实验研究。

[参 考 文 献]

- [1] Bing W, Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition[J]. *European J Clinical Nutrition*, 2003, 57(11):1351-1369.
- [2] Yin J, Hashimoto A, Izawa M, et al. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6):2937-2945.
- [3] Bing W, Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition[J]. *European J Clinical Nutrition*, 2003, 57(11):1351-1369.
- [3] Sphrensen LK. Determination of sialic acids in infant formula by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Bio-med Chromatogr*, 2010, 24(11):1208-1212.
- [4] Lacomba R, Salcedo J, Alegria 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.
- [5] 冯君,李宏基.牛奶中唾液酸含量的动态变化规律研究[J]. *食品科技*, 2008, 33(4):85-87.
- [6] Bing W. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition[J]. *Annu Rev Nutr*, 2009, 29(1):177-222.

【基金项目】江苏社会发展(BE2011673);苏州市科技局(SZS201108, SYS201145)

【作者简介】柏丹丹(1987-),女,江苏人,在读硕士研究生,主要研究方向为儿童保健。

【通信作者】古桂雄, E-mail: szgqx000@163.com; 王冰, E-mail: bwang@mmb.usyd.edu.au

收稿日期:2012-04-05

本刊网址:www.cjchc.net