

高效液相色谱法测定母乳中唾液酸含量

陈海娇, 王萍, 陈越, 李红卫*
(厦门大学医学院预防医学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 建立荧光高效液相色谱(fluorescence detector-high performance liquid chromatography, HPLC-FLD)测定母乳中唾液酸 N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac)和 N-羟乙酰神经氨酸(N-glycolyl neuraminic acid, Neu5Gc)含量的分析方法。利用酸水解法释放出母乳中的唾液酸,以 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,50℃避光衍生 150min,采用荧光高效液相色谱仪检测。色谱条件:LiChrosorb RP-18 柱(250mm × 4mm, 5 μm),流动相为甲醇-乙腈-超纯水(7:8:85),流速 0.9mL/min,进样体积 10 μL,柱温 30℃,荧光检测器激发波长 373nm,发射波长 448nm。结果表明:唾液酸在 50~400 μmol/L 范围内与唾液酸峰面积的线性关系良好,平均回收率为 94.0%,精密度的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.4%,稳定性 RSD 为 1.0%,重复性 RSD 为 0.8%,Neu5Ac 的最低检出限为 0.02 μmol/L,Neu5Gc 的最低检出限为 0.03 μmol/L。该方法简单、重复性好、灵敏度高,可广泛用于奶粉、牛奶及母乳中唾液酸含量测定。
关键词: 母乳; 唾液酸; 荧光高效液相色谱(HPLC-FLD)

Determination of Total Sialic Acid Content in Human Milk by HPLC-FLD

CHEN Hai-jiao, WANG Ping, CHEN Yue, LI Hong-wei*
(Department of Preventive Medicine, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: An analytical method was developed for determining total content of sialic acids including N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and N-glycolyl neuraminic acid (Neu5Gc) in human milk. Sialic acid in human milk was released by acid hydrolysis, and derivatized with 4,5-methylenedioxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride at 50℃ for 150 min in a dark environment. The separation of sialic acid was achieved on LiChrosorb RP-18 column (250 mm × 4 mm, 5 μm) using methanol-acetonitrile-water (7:8:85) as the mobile phase at a flow rate of 0.9 mL/min. Injection volume and column temperature were set at 10 μL and 30℃, respectively. The fluorescence excitation and emission wavelengths were 373 nm and 448 nm, respectively. The results showed that the linear range of sialic acid was 50 - 400 μmol/L. The average recovery rate was 94.0%. The precision, stability and repeatability RSDs were 0.4%, 1.0% and 0.8%, respectively. The limits of detection were 0.02 μmol/L for Neu5Ac and 0.03 μmol/L for Neu5Gc. Therefore, this developed method is characteristics of simple operation, and high reproducibility and sensitivity. It can be widely applied to determine total content of sialic acid in infant formula, cow milk and human milk.

Key words: human milk; sialic acid; fluorescence high performance liquid chromatography

中图分类号: TS252.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)16-0308-04

唾液酸(sialic acid, SA)是一族神经氨酸的氮或氧基取代的衍生物,广泛存在于很多动物组织和体液中,是糖蛋白、低聚糖和糖脂的重要成分。在大部分哺乳动物的中枢神经系统中,尤其是大脑灰质中,唾液酸的含量相当高^[1]。此外唾液酸是一种天然的营养成分,以其在母乳中的高含量而受到广泛的关注,但在牛奶和婴儿配方奶粉中含量却很低^[2-3],研究证明它能促进婴儿的认知发育、增强学习和记忆能力^[4]。

母乳中的唾液酸绝大多数是 Neu5Ac(图 1),主要是

以低聚糖的形式存在^[2]。奶粉中的唾液酸主要是 Neu5Ac,但也含有一定量的 Neu5Gc(图 2),主要是以蛋白结合形式存在^[2]。虽然母乳中唾液酸的营养和生物学作用还不是很清楚,但是很多研究已证明与低聚糖结合的唾液酸的抗菌能力^[1,5]。也有研究发现外源性唾液酸有助于婴儿期的大脑发育和学习记忆能力^[1]。目前,市售配方奶粉已将唾液酸作为奶粉优化的一个参数,使其更接近母乳的黄金标准。因此,在研究中需要找到一种简单可靠方法来测定母乳中唾液酸含量,为配方奶的

收稿日期: 2010-11-23

作者简介: 陈海娇(1985—),女,硕士研究生,研究方向为营养学。E-mail: Jessichen2010@hotmail.com

* 通信作者: 李红卫(1967—),男,副教授,博士,研究方向为营养学。E-mail: rocque@xmu.edu.cn

生产提供参考。

目前定量检测总唾液酸的方法有很多,例如传统的基于比色法的间苯二酚法^[6]或硫比安酸法^[7]。牛奶和婴儿配方奶粉中唾液酸的检测方法仍然普遍使用比色法。但是这些方法相对来说都比较耗时耗力,成本较高,而且精密度较低。脉冲电化学高效阴离子交换色谱检测法(high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, HPAE-PAD)也用于唾液酸分析^[8],并且用于奶中唾液酸的检测^[9]。此外,也有用紫外高效液相色谱法(ultraviolet detector-high performance liquid chromatography, HPLC-UV)测定奶粉中唾液酸含量的报道^[10]。唾液酸是一种碳水化合物,在自然界中主要是以结合的形式与黏多糖、糖蛋白和糖脂中的低聚糖链相连,像牛奶、配方奶粉和母乳中所含有的大量乳糖、半乳糖、低聚糖等碳水化合物复杂基质,酸解后所释放的唾液酸,与这些糖类混合在一起而很难达到检测所要求的分离度^[11]。本研究的目的是建立一种DMB衍生化的HPLC-FLD检测方法,可以准确快速的测定母乳中唾液酸的含量。

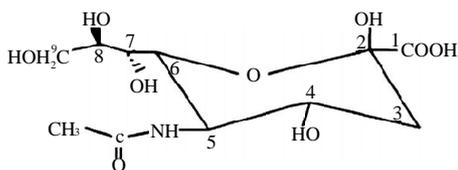


图1 Neu5Ac的结构

Fig.1 Structure of Neu5Ac

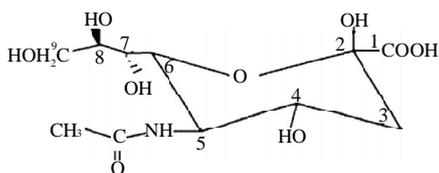


图2 Neu5Gc的结构

Fig.2 Structure of Neu5Gc

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

10份初乳(产后第3天),采自于厦门市妇幼保健院正常产的健康产妇;所有用水均为超纯水;4,5-亚甲二氧基-1,2-邻苯二胺盐酸盐(4,5-methylenedioxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride, DMB)、Neu5Ac、Neu5Gc标准品 美国Sigma公司;甲醇与乙腈均为色谱纯 韩国SK Chemical公司;硫酸、三氟乙酸、三氯乙酸、冰醋酸、亚硫酸钠、硫代硫酸钠、2-巯基

乙醇(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Agilent-1200型HPLC仪(带荧光检测器) 美国Agilent公司;色谱柱:LiChrosorb RP-18柱(250mm × 4mm, 5 μm) 德国默克公司;0.22 μm微孔滤膜 上海楚定分析仪器有限公司;超速冷冻离心机 美国Sigma公司。

1.3 色谱检测条件

色谱柱:LiChrosorb RP-18柱(250mm × 4mm, 5 μm),柱温30 °C;荧光检测器激发波长373 nm,发射波长448 nm;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。

DMB衍生液:8 mmol/L DMB, 1.5 mol/L冰醋酸, 0.25 mol/L硫代硫酸钠, 0.25 mol/L亚硫酸钠, 0.8 mmol/L 2-巯基乙醇。

衍生条件:90 μL样品或标准品中加入10 μL DMB衍生液,50 °C避光衍生150 min,冷却至室温后进行液谱分析。

1.4 母乳样品溶液的制备^[2,12]

1.4.1 游离和低聚糖结合唾液酸含量的测定

准确量取500 μL乳汁于离心管中,加入等体积的10%的三氟乙酸溶液沉淀蛋白,混匀后冰浴10 min,再离心30 min,将上清液移入新的离心管,于沉淀中加入500 μL冷的5%的三氟乙酸洗涤,混匀后在4 °C、3000 r/min离心30 min,吸取上清液到第1次的上清中,即合并两次上清液。合并的上清液加入等体积0.1 mol/L三氟乙酸80 °C水解30 min,取出后冷却,经0.22 μm滤膜过滤,精确吸取过滤后的溶液90 μL,加10 μL DMB 50 °C避光衍生150 min,冷却后进行液谱分析,此为母乳中游离的和与低聚糖结合的唾液酸之和。

1.4.2 蛋白结合唾液酸含量的测定

于1.4.1节处理后的沉淀中加入2 mL(0.05 mol/L)硫酸,80 °C水解120 min,取出后冷却,经0.22 μm滤膜过滤,精确吸取过滤后的溶液90 μL,加10 μL DMB 50 °C避光衍生150 min,冷却后按色谱条件分析。

1.4.3 总唾液酸含量

虽然唾液酸也有少部分以糖脂(神经节苷脂)的形式存在,但是在母乳总唾液酸含量中所占的比例却很低(< 0.5%)^[13],所以本研究未单独检测(包含于游离和与低聚糖结合唾液酸中)。母乳中总唾液酸含量即为游离的、与低聚糖结合的和与蛋白结合的唾液酸含量之和。

1.5 唾液酸的定性与定量

通过比较标准品和样品中唾液酸的保留时间定性,根据唾液酸的标准曲线来计算母乳中唾液酸的含量。

2 结果与分析

2.1 唾液酸的衍生化原理

唾液酸本身不具有荧光, 但其在酸性条件下能与 DMB 衍生液衍生生成 DMB 衍生物^[14](图 3), 该衍生物经 373nm 激发光激发后, 在 484nm 能够产生可辨识可定量的较强荧光信号, 从而在色谱仪中被识别并产生唾液酸的图谱。

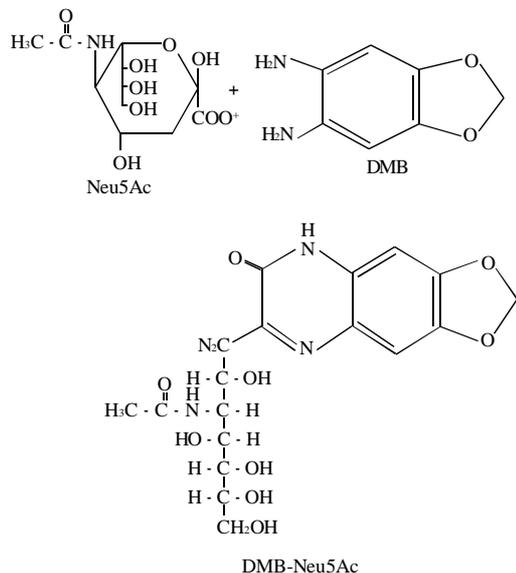


图 3 Neu5Ac 和 DMB 的衍生化原理

Fig.3 Derivatization principles of Neu5Ac and DMB

2.2 唾液酸的色谱图

图 4 为 Neu5Ac 和 Neu5Gc 标准品溶液的色谱图, Neu5Ac 的保留时间为 13.778min, Neu5Gc 的保留时间为 9.855min。图 5、6 分别为母乳中游离唾液酸和与低聚糖结合的唾液酸、与蛋白质结合的唾液酸的色谱图, 据标准品的保留时间可判定图 5 中 13.753min 和图 6 中 13.750min 的色谱峰分别对应的是母乳中游离的和经酸解后释放的与低聚糖结合的与与蛋白质结合的 Neu5Ac 的色谱峰。采用本方法检测母乳样品时未检测到 Neu5Gc。

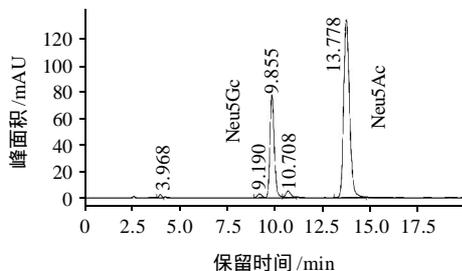


图 4 Neu5Ac 和 Neu5Gc 标准色谱图

Fig.4 Chromatograms of standard Neu5Ac and Neu5Gc

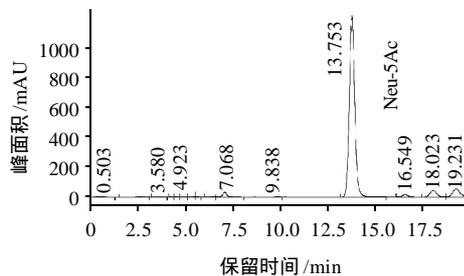


图 5 母乳中游离的唾液酸和低聚糖结合唾液酸色谱图

Fig.5 Chromatograms of free and oligosaccharide-bound sialic acid in human milk

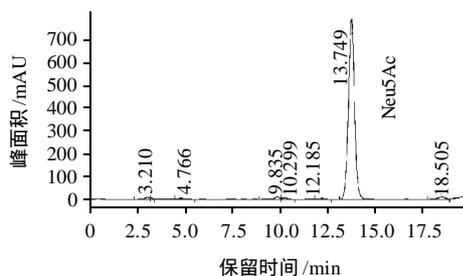


图 6 母乳中蛋白结合唾液酸色谱图

Fig.6 Chromatograms of protein-bound sialic acid in human milk

2.3 线性实验结果

表 1 唾液酸标准曲线数据

Table 1 Data for preparing standard curve of sialic acid

Neu5Ac/ μ L	Neu5Gc/ μ L	超纯水/ μ L	DMB/ μ L	Neu5Ac 浓度/ μ mol/L	Neu5Gc 浓度/ μ mol/L
5	5	80	10	50	50
10	10	70	10	100	100
20	20	50	10	200	200
30	30	30	10	300	300
40	40	10	10	400	400

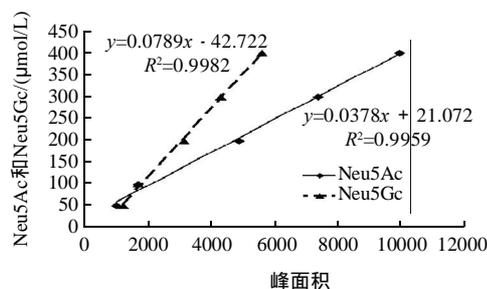


图 7 Neu5Ac 与 Neu5Gc 唾液酸含量标准曲线图

Fig.7 Standard curves of Neu5Ac and Neu5Gc

精确称取 0.0309g Neu5Ac 和 0.0325g Neu5Gc 标准品粉末, 分别溶解于 100mL 超纯水中, 配成 1mmol/L 的 Neu5Ac 和 1mmol/L 的 Neu5Gc 标准品溶液。分别取浓度为 1mmol/L 的两种标准液 5、10、20、30、40 μ L 按照表 1 配成待衍生的混合液, 50 衍生 150min 后 HPLC 检测, 不同浓度标准品进样 2 次。以 2 次峰面积的平均值

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, 如图 7, 标准品在 50 ~ 400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 与峰面积的线性关系较好。

2.4 回收率实验

取 3 份初乳, 加入一定量的 Neu5Ac 标准品溶液, 与样品同样实验方法测定唾液酸总量, 回收率见表 2。平均回收率为 94.0%, 表明样品处理过程中 Neu5Ac 损失较少。

表 2 HPLC-FLD 法测定唾液酸的回收率
Table 2 Spike recovery rates of sialic acid in human colostrum determined by HPLC-FLD

样品号	原始质量浓度/(mg/L)	添加质量浓度/(mg/L)	最后质量浓度/(mg/L)	回收率/%	平均回收率/%
1	2032	2000	3932	95.0	
2	1900	2000	3760	93.0	94.0
3	1809	2000	3689	94.0	

2.5 精密度实验

取 200 $\mu\text{mol/L}$ Neu5Ac 标准品溶液, 衍生后重复测定 6 次, 测得 6 次峰面积分别为: 3946、3964、3980、3979、3967 和 3951, 计算得相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.4%, 精密度较好。

2.6 稳定性实验

取同一份样品溶液, 分别于其衍生后 0、1、2、4、6、8、10h 测定其峰面积, 得峰面积分别为 9726、9723、9625、9820、9539、9623 和 9568, 计算得 RSD 为 1.0%, 表明该样品衍生后在 10h 内稳定。

2.7 重复性实验

分别量取同一个人的初乳, 共 6 份, 按样品溶液的处理方法处理后进样, 得 6 个峰面积分别为 7456、7436、7320、7459、7468 和 7489, 计算得 RSD 为 0.8%, 表明该方法重复性良好。

2.8 最低检出限实验

取 Neu5Ac 和 Neu5Gc 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 $D_l = 3NW/A$ 计算最低检测限(D_l 为最低检测限, N 为噪音峰高, W 为进样质量浓度, A 为标准品峰高)。结果 Neu5Ac 的最低检出限为 0.02 $\mu\text{mol/L}$, Neu5Gc 的最低检出限为 0.03 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.9 母乳中唾液酸含量

取 10 份初乳样品, 按 1.4.1、1.4.2 和 1.4.3 节方法处理后, 根据峰面积, 按外标法计算其含量, 10 份母乳唾液酸的平均含量为 2157.46mg/L。

3 讨论和结论

本方法能同时对 Neu5Ac 和 Neu5Gc 进行分析, 两者可以实现很好的分离。依本方法, 母乳中只检测到 Neu5Ac, 而未检测到 Neu5Gc。

比色法和色谱光度测量法等传统方法是用离子交换柱纯化酸水解样品后的唾液酸^[15], 这种方法样品中唾液酸损失较大, 影响检测的准确性。本研究方法的样品处理过程不需要对唾液酸进行纯化, 操作方便简单, 避免了唾液酸的损失和 O-乙酰基的异构化, 从而提高了回收率。本实验方法最主要的特点在于 DMB 与唾液酸的特异反应, 其特异性消除了母乳中乳糖等复杂物质对唾液酸检测的影响。用间苯二酚、硫巴比妥酸和酶裂解这 3 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、0.20mmol/L 和 0.06mmol/L, 重复性 RSD 分别为 4.5%, 3.1% 和 4.0%^[16], 而本方法中 Neu5Ac 的最低检出限为 0.02 $\mu\text{mol/L}$, Neu5Gc 的最低检出限为 0.03 $\mu\text{mol/L}$, 重复性 RSD 为 0.8%, 可见本研究方法能使唾液酸含量较低的样品也可以被检出, 重复性更好。

总之, 通过线性、回收率、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, 可广泛用于奶粉、牛奶及母乳中唾液酸的含量测定。

参考文献:

- WANG Bing, BRAND J. The role and potential of sialic acid in human nutrition [J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2003, 57(11): 1351-1369.
- WANG Bing, JANETTE B M, PATRICIA M, et al. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas[J]. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74(4): 510-515.
- MARTÍN-SOSA S, MARTÍN M J, GARCÍA-PARDO L A, et al. Sialyloligosaccharides in human and bovine milk and infant formulas: variations with the progression of lactation[J]. *American Dairy Science Association*, 2003, 86(1): 52-59.
- WANG Bing. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition[J]. *Annu Rev Nutr*, 2009, 29: 177-222.
- KUNZ C RUDLOFF S. Potential anti-inflammatory and anti-infectious effects of human milk oligosaccharides[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, 606: 455-465.
- SVENNERHOLM L. Quantitative estimation of sialic acids—A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1957, 24(3): 604-611.
- WARREN L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1959, 234(8): 1971-1975.
- ROHRER J S. Analyzing sialic acids using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 283(1): 3-9.
- TANG Kuntian, LIANG Lina, CAI Yaqi, et al. Determination of sialic acid in milk and products using high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36(11): 1535-1538.
- 冯君, 李宏基, 韩立强, 等. 牛奶中唾液酸含量的动态变化规律研究[J]. *食品科技*, 2008(4): 85-87.
- SØRENSEN L K. Determination of sialic acid in infant formula by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(11): 1208-1212.
- 黄华军, 奚星林, 吴宏中, 等. 奶粉中唾液酸的测定方法[J]. *分析测试学报*, 2006, 25(4): 129-131.
- RUDEA R, MALDONADO J, GIL A. Comparison of content and distribution of human milk gangliosides from Spanish and Panamanian mothers [J]. *Ann Nutr Metab*, 1996, 40(4): 194-201.
- LIN S L, INOUE S, INOUE Y. Acid-base properties of the reaction product of sialic acid with fluorogenic reagent, 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB)[J]. *Carbohydrate Research*, 2000, 329(2): 447-451.
- SIEBERT H C, KAPTEIN R, BEINTEMA J J, et al. Carbohydrate-protein interaction studies by laser photo CIDNP NMR methods[J]. *Glycoconj J*, 1997, 14(4): 531-534.
- LACOMBA R, SALCEDO J, ALEGRÍA 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.