

# HPLC 法测定牛奶中游离唾液酸和与低聚糖结合的唾液酸含量

冯 君, 杨国宇, 李宏基\*, 韩立强, 林茂旺  
(河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘 要:** 利用酸水解法把牛奶中的唾液酸释放出来, 以邻苯二氨盐酸盐(10mg/ml)为衍生化试剂, 在 80℃水浴锅中衍生 40min。采用 Symmetry C<sub>18</sub> 柱(250mm × 4.6mm, 5μm), 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 1.0ml/min, 柱温 35℃, 紫外检测波长为 230nm。结果表明, 唾液酸在 10~320μg/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, 可准确测定牛奶中游离的唾液酸和与低聚糖结合的唾液酸含量。

**关键词:** 牛奶; N-乙酰神经氨酸; 高效液相色谱法

Determination of Contents of Free and Oligosaccharide-bound Sialic Acid in Milk by HPLC

FENG Jun, YANG Guo-yu, LI Hong-ji\*, HAN Li-qiang, LIN Mao-wang  
(College of Animal Husbandary and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Sialic acid in milk was released by acid hydrolysis, and then was derivated with O-pheny-lenediamine: 2HCl (10mg/ml) at 80℃ for 40 min. The conditions of HPLC were: Symmetry C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5μm), the mobile phase 1.0% tetrahydrofuran (containing 0.2% phosphoric acid)-acetonitrile (92:8), the flow rate 1.0ml/min, the column temperature 35℃, and the detection wave length 230 nm. The results indicated that the linear range of sialic acid was 10~320μg/ml. The average recovery was 95.7%. The method has the characteristics of good reproducibility and high sensitivity. It can be used to determine the contents of the free and oligosaccharide-bound sialic acid in milk.

**Key words** milk; N-acetylneuraminic acid; high performance liquid chromatography

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)05-0355-03

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<sup>[1]</sup>。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。本实验对牛奶中游离和与低聚糖结合的唾液酸含量测定进行初步研究, 在国内外首次采用 HPLC-UV 法, 以邻苯二氨盐酸盐(OPD)为衍生化试剂测定牛奶中游离和与低聚糖结合的唾液酸含量。

该法与传统的紫外方法比较<sup>[2]</sup>, 具有定量准确、方便快捷、灵敏度高等特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

乳样(初乳) 河南省郑州市毛庄奶牛厂。

N-乙酰神经氨酸对照品(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac) Sigma公司, 邻苯二氨盐酸盐(OPD) 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; 所有用水均为超纯水。

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。

收稿日期: 2007-06-12

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(0522010800)

作者简介: 冯君(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为乳生物化学。E-mail: fengjun1982219@163.com

\* 通讯作者: 李宏基(1964-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为乳生物化学。E-mail: atozss@sina.com

## 1.2 方法

### 1.2.1 色谱条件

色谱柱: Symmetry C<sub>18</sub> 柱(4.6mm × 250mm, 5 μm); 柱温: 35℃; 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: 230nm; 流速: 1.0ml/min; 进样体积: 10 μl。

### 1.2.2 样品溶液的制备<sup>[1,3]</sup>

准确量取牛奶 10ml 于离心管中, 在 4℃, 3500r/min 离心 30min, 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 10min, 再离心 30min, 将上清液移入锥形瓶中, 再加入 5ml 冷的 5% 的三氯乙酸洗涤沉淀, 混匀后在 4℃, 3500r/min 离心 20min, 将上清液移走, 合并两次的上清液, 加入等量的 0.1mol/L 的硫酸溶液, 放入 80℃ 水浴锅中 2h 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 10ml, 取此溶液 2ml, 加入 10mg/ml 邻苯二氨盐酸盐溶液(用 0.2mol/L 硫酸氢钠溶液溶解) 1ml, 再置于 80℃ 水浴锅中加热 40min, 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 2ml, 再加入 10mg/ml 邻苯二氨盐酸盐溶液 1ml, 置于 80℃ 水浴中加热 40min, 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 结果与分析

### 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<sup>[4]</sup>。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。

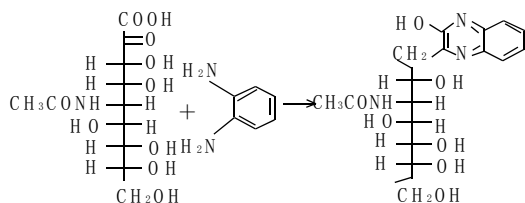


图1 N-乙酰神经氨酸反应机理

Fig.1 Reaction mechanism of N-acetylneuraminic 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。

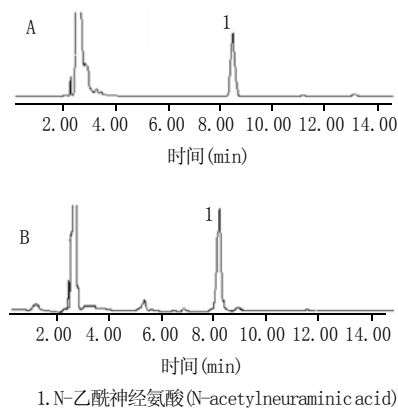


图2 对照品溶液(A)与样品溶液(B)的色谱图

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

### 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 5mg/ml 的对照品储备液。配制质量浓度分别为 10、20、40、80、160、200、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:  $Y = 52.1X + 9.03$ ,  $r = 0.995$ 。式中, Y 为色谱峰面积( $mV \cdot s$ ); X 为唾液酸质量浓度( $\mu g/ml$ )。

### 2.4 进样精密度实验

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 稳定性实验

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

### 2.6 重复性实验

分别量取牛奶各 10ml, 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。式中,  $D_1$  为检测限; N 为噪音峰高; W 为进样浓度; A 为 N-乙酰神经氨酸峰高。结果表明, 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, 按外标法计算其含量, 结果见表 1。

表1 游离和与低聚糖结合的唾液酸含量

Table 1 Concentrations of free sialic acid and sialic acid bounded with oligosaccharide

	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	平均
含量(mg/ml)	0.082	0.061	0.068	0.052	0.073	0.069	0.068
RSD (%)	1.52						

## 2.9 加样回收率实验

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89%~98.8%,符合分析要求。

表2 HPLC法测定唾液酸的回收率

Table 2 Recovery of sialic acid determination by HPLC

加入量(μg/ml)	回收量(μg/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)
2.50	2.42	96.8	95.7
5.00	4.45	89.0	
12.5	12.36	98.8	
25.0	24.30	97.2	
30.0	28.68	95.6	
50.0	48.36	96.7	

## 2.10 条件优化

### 2.10.1 最佳水解时间的确定

在80℃水浴条件下,考察不同水解时间对牛奶中唾液酸含量的影响,结果见图3。

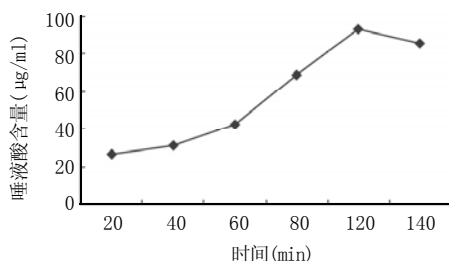


图.3 最佳水解时间的确定

Fig.3 Determination of optimal hydrolysis time

### 2.10.2 最佳衍生时间的确定

在80℃水浴条件下,考察不同衍生时间对牛奶中唾液酸含量的影响,结果见图4。

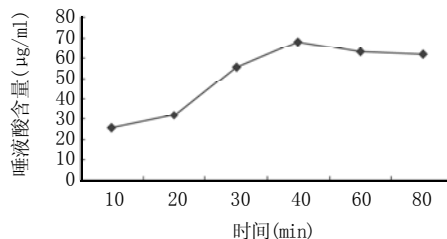


图4 最佳衍生时间的确定

Fig.4 Determination of optimal derivation time

## 3 讨论

本实验初步研究了用高效液相色谱法测定牛奶中(初乳)游离的和与低聚糖结合的唾液酸含量,回收率在89%~98.8%之间,另外考察了样品在80℃水浴中,用0.1mol/L硫酸溶液进行水解20、40、60、80、120、140min,水解时间对含量测定的影响,还考察了在80℃水浴中,10mg/ml邻苯二氨盐酸盐溶液中进行衍生10、20、30、40、60、80min,衍生时间对含量测定的影响。实验表明样品在80℃水浴0.1mol/L硫酸溶液中水解2h,然后在80℃水浴中衍生40min衍生反应基本完全。

### 参考文献:

- [1] WANG B, JANETE B M, PATRICIA M V, et al. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas[J]. American J Clin Nutrition, 2001, 74(4): 510-515.
- [2] 胡国昌, 陈文锐, 陈捷, 等. 燕窝及其制品的检测方法[J]. 食品科学, 1996, 17(11): 47-50.
- [3] 奚星林, 黄华军, 吴宏中, 等. 牛奶中唾液酸的测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(1): 39-40.
- [4] KARIM M, WANG B. Is sialic acid in milk food for the brain[J]. Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 2006(1): 1-11.