

## · 知识介绍 ·

# 高效液相色谱法测定食品中硫酸软骨素

Hamano T, Mitsuhashi Y, Acki N, *et al*

**摘要:** 采用高效液相色谱法, 通过检测被软骨素酶ABC酶解释放的2种不饱和双糖来测定食品中硫酸软骨素(ChS)。软骨素酶ABC水解ChS产生2种不饱和双糖(6-磺化和4-磺化双糖), 其在氨基相柱中保留时间分别为6.2和7.3 min。这些双糖产生的峰被用来确定样品中ChS的总量。此方法成功用于市售蛋黄酱、调味料和鱼肉肠的分析。

**关键词:** 食品; 硫酸软骨素; 软骨素酶ABC; 高效液相色谱

硫酸软骨素(ChS)属于可被特定酶降解成不饱和双糖的杂多糖。几乎所有由软骨素酶ABC作用于4-硫酸软骨素(Ch4S)和6-硫酸软骨素(Ch6S)产生的双糖分别为2-乙酰氨基-2-脱氧-3-*O*-( $\beta$ -D-葡-4-烯吡喃糖醛酸)-4-*O*-磺基-D-半乳糖( $\Delta$ Di-4S)和2-乙酰氨基-2-脱氧-3-*O*-( $\beta$ -D-葡-4-烯吡喃糖醛酸)-6-*O*-磺基-D-半乳糖( $\Delta$ Di-6S)<sup>[1]</sup>。在日本, 只有Ch4S和Ch6S作为乳化剂用于某些食品<sup>[2]</sup>, 允许使用标准通常是0.3%~2%。因此有必要检测食品中ChS含量以确保添加符合限制标准。

目前测定食品中硫酸软骨素的方法是分光光度测定法<sup>[3]</sup>, 但此方法样品需较复杂的前处理, 且有其他多糖干扰。

一种由软骨素酶ABC酶解ChS异构体产生一定量的不饱和双糖的酶法被认为是检测ChS异构体的特效方法。在临床化学领域, 用高效液相色谱法(HPLC)检测这些不饱和双糖<sup>[4-6]</sup>。

值得关注的是, 在食品化学领域, 即使有了HPLC, 通常也忽略了用HPLC来测定酶解的ChS。

本文介绍了一种检测食品中ChS的方法, 研究蛋黄酱、调味料和鱼肉肠, 以此证明此法的可行性。

## 1 仪器

色谱系统: Model 3<sup>a</sup> 液相色谱(Shimadzu Japan), 20  $\mu$ L环路注射器; UV检测器, 8  $\mu$ L流通池(10 $\times$ 1 mm), 数据处理软件; 预包装Zorbax氨基柱(25 cm $\times$ 4.6 mm id), 分离均在室温(25 $^{\circ}$ C)进行; 移液器(100~1 000  $\mu$ L和1.0~10.0 mL), Hamilton微量调节注射器(25  $\mu$ L)。

## 2 试剂

市购Ch4S和Ch6S(Seikagaku Kogyo),  $\Delta$ Di-4S和 $\Delta$ Di-6S(分析纯), 软骨素酶ABC(E.C.4.2.2.4)(Seikagaku Kogyo)。

Tris缓冲液, pH 8.0, 0.4 mol/L。将48.4 g三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)(Sigma)和32.8 g醋酸钠溶于800 mL水中, 用1 mol/L盐酸调节pH 8.0, 加水稀释至1 L。

磷酸缓冲液, pH 5.0, 0.01 mol/L。将1.56 g二水合磷酸二氢钠和3.96 g硫酸铵溶解于800 mL水中, 用磷酸调节pH 5.0, 加水稀释至1 L。

## 3 步骤

### 3.1 标准溶液制备

Ch4S和Ch6S分别溶于水制成标准溶液(1 000  $\mu$ g/mL), 吸取规定体积(0.2~5.0 mL)的标准溶液至50 mL容量瓶中, 定容, 得到供试品溶液(4~100  $\mu$ g/mL)。

### 3.2 ChS标准溶液分析

取2.0 mL供试品溶液, 至含2.0 mL pH 8.0 Tris缓冲液试管中。加入0.1 mL软骨素酶ABC(2 U/mL), 混合液在30 $^{\circ}$ C反应30 min。经过超滤, 取10.0  $\mu$ L滤液室温下注入色谱柱, 流动相是0.01 mol/L磷酸缓冲液(pH 5.0, 流速1.0 mL/min)。检测波长235 nm。 $\Delta$ Di-4S和 $\Delta$ Di-6S的对应峰面积经数据处理软件计算得到。

### 3.3 食品中ChS含量分析

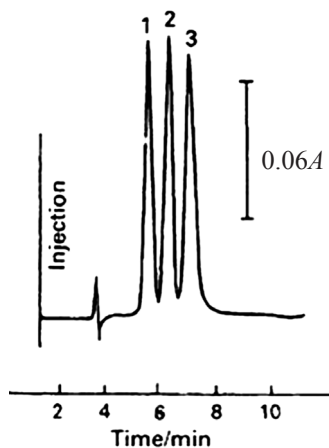
食品样品(10.0 g)于电捣碎器中加50 mL水匀浆, 匀浆后样品用2份50 mL正己烷脱脂。水层用水稀释至100 mL, 形成的混合物用滤纸过滤。取部分溶液(2.0 mL)按ChS标准溶液检测方法分析。

## 4 结果与讨论

### 4.1 色谱条件

此分析方法的原理是用色谱分离检测ChS酶解释放的双糖的量。为了确定生物流体中的ChS异构体的含量, 采用了多种色谱条件<sup>[4-6]</sup>。我们尝试评价这些方法对于检测食品中ChS的适宜性。然而发现有山梨酸和(或)苯甲酸食

品添加剂存在时, 这些色谱条件不能分离  $\Delta$  Di-4S和  $\Delta$  Di-6S, 因此改用氨基柱色谱条件。用0.01 mol/L磷酸缓冲液 (pH5) 作为流动相时,  $\Delta$  Di-4S和  $\Delta$  Di-6S保留在柱上, 20 min内不被洗脱。随后检测离子强度调节剂对双糖保留行为的影响。流动相含 $>0.05$  mol/L硫酸铵可使2种双糖与山梨酸完全分离, 即使这2种双糖不能完全分离。因此, 采用含硫酸铵 (3.96 g/L) 的0.01 mol/L磷酸缓冲液 (pH 5.0) 来折中好的分离与分析速度之间的矛盾。使用此流动相,  $\Delta$  Di-4S和  $\Delta$  Di-6S分别出现单一的峰, 彼此分离, 且与其它食品添加剂如山梨酸、苯甲酸也能分离 (图1)。



1.  $\Delta$  Di-6S (50  $\mu$ g/mL); 2.  $\Delta$  Di-4S (50  $\mu$ g/mL); 3. 山梨酸 (10  $\mu$ g/mL) 和苯甲酸 (10  $\mu$ g/mL)。条件: 色谱柱Zorbax ODS (25 cm $\times$ 4.6 mm); 流速1.0 mL/min; UV检测器, 235 nm; 洗脱液, 含硫酸铵 (3.96 g/L) 的0.01 mol/L磷酸缓冲液 (pH5.0); 进样体积10  $\mu$ L。A代表吸光度。

图1 标准品的HPLC图谱

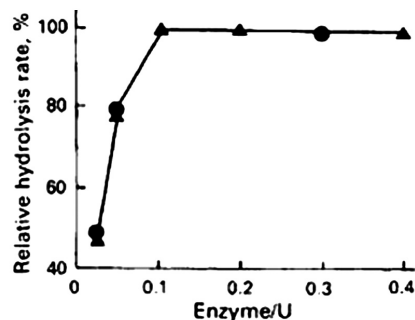
检测波长的选择也是成功定量的一个关键因素, 且最精确的方法应是分别校准和测定每种双糖<sup>[6]</sup>。但是, 在某些情况下, 基于2种双糖总响应的更简便的操作是更适当的。在上述色谱条件下, 就峰面积而言,  $\Delta$  Di-4S和  $\Delta$  Di-6S在235 nm处均有响应。

#### 4.2 酶反应的优化

为通过上述方法达到最大敏感性, 对一些实验参数如适宜酶活性的pH, 反应时间和酶浓度进行了优化。已知pH 8.0时软骨素酶ABC达到最大活性<sup>[7]</sup>, 本实验中使用Tris缓冲液调节pH 8.0。

关于分析速度, 在固定反应时间 (30 min) 测定软骨素酶ABC最优酶浓度。

如图2所示, 酶活性约0.1 U, Ch4S和Ch6S水解率显著增大, 此时, 酶反应几乎按零级反应进行, 与酶活性无关。



Ch4S和Ch6S浓度, 50  $\mu$ g/mL; 反应时间, 30 min; 温度, 室温。●  $\Delta$  Di-6S; ▲  $\Delta$  Di-4S

图2 软骨素酶ABC活性对ChS水解率的影响

#### 4.3 标准曲线、精密度和检测限

由  $\Delta$  Di-4S和  $\Delta$  Di-6S峰面积和对ChS浓度 ( $\mu$ g/mL) 做图, 得到标准曲线, 无论以Ch4S还是Ch6S为标准, 在4~100  $\mu$ g/mL范围内是直线, 20  $\mu$ g/mL水平的变异系数为2.2% (5次注射), ChS的最低检出量是2  $\mu$ g/mL。

#### 4.4 回收率研究与与分光光度法的比较

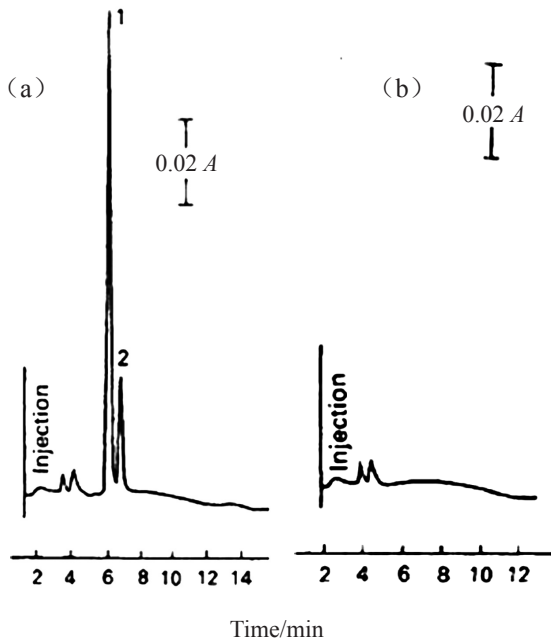
蛋黄酱、调味料和鱼肉肠均进行回收率实验。样品在开始匀浆前加入已知浓度的Ch4S或Ch6S, 故样品处理阶段发生的损失与色谱分离时受到的干扰即可被评估, 结果见表1。由表1可知, 样品检测回收率较好。加样和空白蛋黄酱提取物色谱图见图3, 比较后发现, 上述检测方法相对不受食品配料的干扰。该结果也适用于调味料和鱼肉肠。

表2对上述方法和分光光度法在检测市售食品中ChS方面进行了比较<sup>[3]</sup>。两种方法的检测结果缺乏一致性, 尤其是蛋黄酱样品, 反复多次实验, 结果亦如此。表1中的回收率数据表明这种结果可能源于检测方法的缺陷, 如分光光度法的专属性较低。因Ch4S和Ch6S被酶解后均产生多种比率的  $\Delta$  Di-4S和  $\Delta$  Di-6S<sup>[8]</sup>, 所以较难确认特定食品中含有的是Ch4S还是Ch6S。

表1 几种食品中Ch4S和Ch6S回收率

样品	加入量/mg·g <sup>-1</sup>	回收率*/%	
		Ch4S	Ch6S
蛋黄酱	1	94.8	94.6
	10	98.1	97.7
调味料	1	98.2	98.6
	10	98.8	99.2
鱼肉肠	1	97.7	98.1
	3	98.4	98.3

\*结果是2次测定的均值



a 含1 mg/g Ch6S的蛋黄酱提取物; b 空白蛋黄酱提取物; 1  $\Delta$  Di-6S; 2  $\Delta$  Di-4S; 与图1的色谱条件一致

图3 HPLC对照图谱

表2 市售食品中ChS含量检测

样品	ChS含量*/mg·g <sup>-1</sup>	
	本实验方法	分光光度法
蛋黄酱A	8.3	12.2
蛋黄酱B	6.5	4.3
调味料A	2.2	1.6
调味料B	3.5	3.8
鱼肉肠A	ND <sup>†</sup>	ND <sup>†</sup>
鱼肉肠B	ND <sup>†</sup>	0.2

\*数据表示Ch4S和Ch6S总量

<sup>†</sup>未检出

#### 参考文献

- [1] Suzuki S. J Biol Chem, 1960, 235: 3580.
- [2] "The Japanese Standards of Food Additives," Fifth Edition. Ministry of Health and Welfare of Japan, Tokyo, 1986: 503.
- [3] Yabe Y, Ninomiya T, Kashiwabc H, *et al.* J Food Hyg Soc Jpn., 1987, 28: 13.
- [4] Hjerpe C, Antonopoulos A, Engfeldt B. J. Chromatogr, 1979, 171: 339.
- [5] Murata K, Yokoyama Y. Anal. Biochem., 1985, 149: 261.
- [6] Lee G J-L, Liu D-W, Pav J W, *et al.* J Chromatogr., 1981, 212: 65.
- [7] Yamagata T, Saito H, Habuchi O, *et al.* J Biol Chem, 1968, 243: 1523.
- [8] Shinomiya K, Yamanashi S, Imanari T. Biomed Chromatogr, 1978, 2: 169.

边玲 编译 樊志萍 校

(Analyst, 1989, 114: 891-893)

编者按: 本文系“经典论文节译”, 供读者参考。欢迎对此栏目投稿。

本刊采用“中华人民共和国法定计量单位”, 如: 物质的量浓度 $c$  ( $M_r$ 或 $A_r$ 已准确测得时)及其单位mol/L, mmol/L,  $\mu$ mol/L等; 或质量浓度 $\rho$  (混合物或 $M_r$ 、 $A_r$ 未准确测得时)及其单位g/L, mg/L,  $\mu$ g/L等。组合单位符号中的斜线只限1条, 如mg/kg/d应改为mg/(kg·d)。单位与数值之间均空1/4字。

文中表述尽量使用国际代号和缩写, 如: 3 d, 4 h, 5 min, 6 s, 100 IU (国际单位);  $r$ /min (转速),  $P$  (概率),  $n$  (样本数)等。国际代号不能用于无数值的文句中, 如每天不应写作每d。非公知缩写文中首次出现时应注明中(英)文名称。

图和表 只在必要时使用。图应清晰。表采用“三线式”。图和表均应有序号和题名。图表中量和单位采用量/单位的形式, 如:  $\lambda$ /nm;  $l$ /m;  $t$ /d。。