

燕窝中唾液酸的 DAD/FLD 串联 HPLC 测定方法研究

冯婷玉, 薛长湖, 孙 通, 崔宏博, 徐 杰*
(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘 要: 建立燕窝中唾液酸的柱前衍生二极阵列/荧光检测器(DAD/FLD)串联的反相高效液相色谱检测方法。用硫酸氢钠溶液水解样品, 以邻苯二氨盐酸盐为衍生化试剂, 采用 C₁₈ 柱分离, 四氢呋喃溶液(含体积分数 0.5% 磷酸和体积分数 0.15% 正丁胺)-乙腈为流动相等度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 二极阵列检测波长 230 nm, 荧光激发波长(E_s) 230 nm, 发射波长(E_m) 425 nm。结果表明, 唾液酸在 0.1 ~ 750 μ g/mL 范围内线性良好($r > 0.9990$), 20 min 内完全分离, 回收率在 85.03% ~ 97.14% 之间。检出限 0.2 μ g/mL (DAD), 0.005 μ g/mL (FLD), FLD 检出限比 DAD 低两个数量级且杂峰少, 在 DAD 检出限以上的相同浓度下, DAD 比 FLD 更灵敏。本方法具有灵敏度高, 重复性好, 分析速度快等特点, 可准确测定燕窝等样品中唾液酸含量。

关键词: 燕窝; 唾液酸; 高效液相色谱法; 测定

Determination of Sialic Acid in Edible Birds' Nest Using Pre-column Derivatization Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array or Fluorescence Detection

FENG Ting-yu, XUE Chang-hu, SUN Tong, CUI Hong-bo, XU Jie*
(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A pre-column derivatization RP-HPLC method with detection with a photodiode array detector (DAD) or a fluorescence detector (FLD) was developed for the determination of *N*-acetylneuraminic acid in edible birds' nest (EBN). Samples were dissolved in 0.5 mol/L sodium bisulfate aqueous solution and kept for 30 min in 80 °C water bath. After cooling the derivatization was carried out using *O*-phenylenediamine · 2HCl as derivative. The chromatographic separation was achieved on a C₁₈ column using a mobile phase composed of 1.0% tetrahydrofuran aqueous solution (containing phosphoric acid and 1-butylamine at the levels of 0.5% and 0.15%, respectively) and acetonitrile (95:5, *V/V*) at a flow rate of 1.0 mL/min in the isocratic elution mode. The DAD wavelength was set at 230 nm and the FLD E_s and E_m wavelengths at 230 and 425 nm, respectively. The relationship between HPLC peak area and *N*-acetylneuraminic acid concentration over the range of 0.1 - 750 μ g/mL exhibited good linearity ($r > 0.9990$). A complete separation of *N*-acetylneuraminic acid was observed within 20 min. Mean recoveries of 6 replicates for *N*-acetylneuraminic acid in a real sample spiked at 3 levels ranged from 85.03% to 97.14%. The limit of detection (LOD) of the method was 0.2 μ g/mL with a DAD and 0.005 μ g/mL with a FLD. Clearly, the LOD with a FLD was two orders of magnitude lower than that with a DAD. Meanwhile, less miscellaneous small peaks were observed in the FLD detection. However, a DAD presented higher detection sensitivity than a FLD at the same concentrations over the LOD resulting from DAD detection. The method demonstrates the advantages of high sensitivity, good repeatability and rapidity, and is consequently most suitable for the determination of *N*-acetylneuraminic acid in some samples like EBN.

Key words: edible bird's nest; *N*-acetylneuraminic acid; high-performance liquid chromatography; determination

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)08-0233-04

燕窝是鸟类雨燕科(Apodiformes) 金丝燕(*Collocalia* Gray 1840)的唾液腺分泌物, 产地分布于东南亚一带,

收稿日期: 2009-07-11

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-04-0642)

作者简介: 冯婷玉(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品化学。E-mail: ftyxy1986@yahoo.com.cn

* 通信作者: 徐杰(1973—), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为水产品化学。E-mail: xujie9@ouc.edu.cn

如中国、印尼、泰国、越南和马来西亚等。燕窝是一种名贵中药,具有养阴润燥,补中益气,入胃补脾,化痰止咳等功能,是一种安全有效的防止流感病毒的天 然物,并且具有促进细胞生长和加强免疫系统的功能^[1], 传统上被看作名贵滋补品和高级宴席佳肴。燕窝富含蛋 白质、糖类和矿物质,其主要成分是唾液酸糖蛋白^[2]。 唾液酸(sialic acid, SA)是一族神经氨酸的衍生物,主 要包括 *N*-乙酰神经氨酸(*N*-Acetylneuraminic acid, Neu5Ac)、*N*-羟乙酰神经氨酸(*N*-Glycolylneuraminic acid, NeuGc)等。唾液酸广泛存在于多种生物组织中, 以九碳酮糖酸-神经氨酸为骨架,通常在糖蛋白或糖脂 末端以糖苷的形式存在。近年来发现,唾液酸及其衍 生物在各种生命活动调节中起着重要的作用,与许多疾 病密切相关,在抑制唾液酸转移酶和抗癌转移、促进 神经细胞增长与抗老年痴呆症、抑制唾液酸酶与抗病 毒、抑制白细胞粘附与抗炎等方面具有很大作用^[3-5]。近 年报道,测定唾液酸的方法主要有化学比色法^[6]、高效 液相色谱法(HPLC)^[7-10]、气相色谱法(GC)^[11]、胶束电动 色谱法(MEC)^[12]、毛细管区带电泳法(CZE)^[13]等。比色 法操作相对简便,但仍然较费时且灵敏度欠佳;协同催 化光度法样品前处理复杂且测试所需时间较长(25 ~ 120min);GC 需要耗费大量的时间来对分析样品衍生; CZE 与 MEC 较简单,但检出限较高(3.0mg/L)。本实验采用 DAD/FLD 串联 HPLC 法,以邻苯二氨盐酸盐(OPD-HCl) 为衍生化试剂对唾液酸(*N*-乙酰神经氨酸)进行定量测 定,与上述其他测定方法比较,该法具有灵敏度高、 检出限低、定量准确、方便快捷等特点。

唾液酸在酸性条件下可与邻苯二氨反应,生成有强 紫外吸收及荧光的唾液酸衍生物,以 Neu5Ac 为例,反 应方程式如图 1^[7]所示。

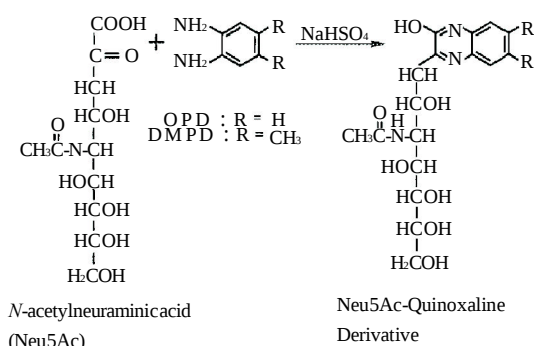


图1 *N*-乙酰神经氨酸衍生反应机理

Fig.1 Derivatization mechanism of *N*-acetylneuraminic acid

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

燕窝 市售。

N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)(含量 > 85%)和 *N*-羟乙酰 神经氨酸(NeuGc)对照品 Sigma 公司;邻苯二氨盐酸盐 BBI 公司;乙腈(色谱纯);硫酸氢钠、磷酸、四氢 呋喃、正丁胺(均为分析纯);实验用水均为 Milli Q 超 纯水。

1.2 仪器与设备

1100 高效液相色谱仪(配有自动进样器、DAD 和 FLD 检测器) 美国 Agilent 公司;SB5200B 超声清洗器 宁波新芝生物科技股份有限公司;Milli-Q 超纯水器 Milliopre 公司;0.45 μm 针头微孔滤膜过滤器。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6mm × 150mm, 5 μm);柱温 35 °C;流动相为体积分数 1.0% 四氢呋喃水 溶液(含体积分数 0.5% 磷酸和体积分数 0.15% 正丁胺)-乙 腈(95:5, V/V);二极管阵列检测波长 230nm;荧光激 发波长(*E*_s) 230 nm,发射波长(*E*_m) 425nm;流速 1.0mL/ min;进样体积 20 μL。

1.3.2 样品溶液制备

取 1 ~ 5mg 样品,加 0.5mol/L 硫酸氢钠溶液 1mL, 在 80 °C 水浴条件下加热 30min,取出冷却,得水解样品 溶液,待衍生。

1.3.3 对照品溶液制备

精密称取 *N*-乙酰神经氨酸对照品适量,加水溶解 并定容成 2mg/mL 的对照品储备液。吸取上述储备液, 配制成 0.1、1、5、10、25、50、100、200、400、 750、1000 μg/mL 等一系列质量浓度的对照品使用溶液, 待衍生。

1.3.4 衍生反应

取上述各溶液 1mL,分别加入 20mg/mL 邻苯二氨盐 酸溶液(用 0.25mol/L 硫酸氢钠溶液溶解)1mL,再置于 80 °C 水浴中加热 40min,取出后冷却,经 0.45 μm 微孔 滤膜过滤,于 4 °C 冰箱中保存,待进样。

1.3.5 统计分析

采用 SPSS V11.0 软件,对 *N*-乙酰神经氨酸的含量 进行统计分析比较。

2 结果与分析

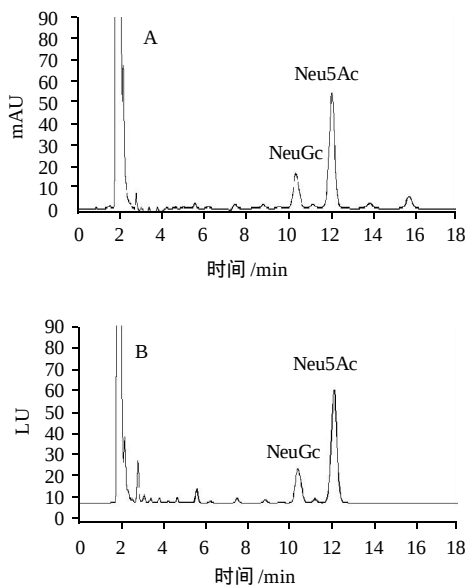
2.1 线性范围

吸取 0.1 ~ 1000 μg/mL 不同质量浓度对照品使用溶液 各 1mL,按 1.3.1 节方法测定,记录峰面积。以峰面积 (*y*)为纵坐标、溶液质量浓度(*x*)为横坐标,绘制标准曲 线。结果表明,在 0.1 ~ 750 μg/mL 质量浓度范围内, 二极管阵列和荧光两种检测器对 *N*-乙酰神经氨酸的检测 均呈现良好的线性关系,结果见表 1 及图 2。

表1 唾液酸性实验结果

Table 1 Linear regression equations and correlation coefficients for determination of *N*-acetylneuraminic acid with DAD or FLD detection and corresponding LODs and LOQs of *N*-acetylneuraminic acid

检测器	线性方程	相关系数 r	检出限 ($R_{SN}=3$, $\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($R_{SN}=10$, $\mu\text{g/mL}$)
DAD	$y = 16.57x + 5.03$	0.9992	0.2	0.5
FLD	$y = 12.85x + 1.19$	0.9991	0.005	0.3



A 为二极管阵列色谱图, B 为荧光色谱图;
Neu5Ac 50 $\mu\text{g/mL}$, NeuGc 20 $\mu\text{g/mL}$ 。

图2 二极管阵列/荧光串联检测唾液酸标准HPLC图

Fig.2 HPLC chromatograms of *N*-acetylneuraminic acid standard with DAD (A) or FLD detection (B)

2.2 精密度实验

仪器精密度实验: 取15 $\mu\text{g/mL}$ 的 *N*-乙酰神经氨酸对照品溶液, 连续进样测定6次, 分别得到二极管阵列检测器的RSD为1.0%, 荧光检测器的RSD为0.61%。表明仪器精密度良好, 符合实验要求。

方法精密度实验: 称取燕窝样品6份, 每份5mg, 按样品溶液的制备方法处理后进样, 结果二极管阵列检测器的RSD为3.6%, 荧光检测器的RSD为3.8%, 表明该方法重复性较好。

2.3 稳定性实验

表2 燕窝中唾液酸含量

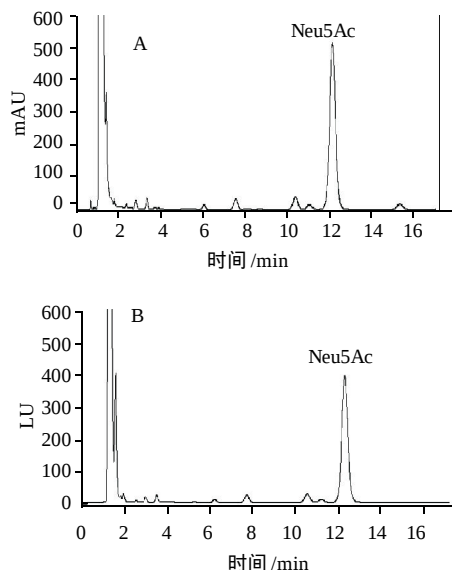
Table 2 Contents of *N*-acetylneuraminic acid in 4 EBN samples resulting from DAD or FLD detection

检测器	燕窝1		燕窝2		燕窝3		燕窝4	
	唾液酸含量/ $(\mu\text{g/mg})$	RSD/%	唾液酸含量/ $(\mu\text{g/mg})$	RSD/%	唾液酸含量/ $(\mu\text{g/mg})$	RSD/%	唾液酸含量/ $(\mu\text{g/mg})$	RSD/%
DAD	122.12 $\pm$ 3.00	2.5	125.27 $\pm$ 0.70	0.79	110.61 $\pm$ 3.65	4.7	132.27 $\pm$ 2.15	2.0
FLD	123.09 $\pm$ 2.20	2.5	126.96 $\pm$ 0.58	0.65	112.63 $\pm$ 3.83	4.8	134.06 $\pm$ 2.44	2.8

取同一份样品溶液, 分别于0、1、2、4、8、10、12h测定其峰面积, 其RSD为1.0%, 表明该样品在12h内稳定。

2.4 样品测定

取4个燕窝样品约5mg, 平行3份, 按上述方法衍生分析, 采用外标法计算其含量, 其结果见表2。其中前3个为血燕, 最后一个为宫燕。经检验, 不同种类的燕窝中 *N*-乙酰神经氨酸的含量没有显著性差异。图3为血燕样品中唾液酸的HPLC色谱图。



A 为二极管阵列色谱图; B 为荧光色谱图。

图3 燕窝样品中唾液酸的HPLC图

Fig.3 HPLC chromatograms of *N*-acetylneuraminic acid in an EBN sample with DAD (A) or FLD detection (B)

2.5 回收率实验

表3 燕窝唾液酸回收率实验结果($n=6$)

Table 3 Mean recoveries of 6 replicates for *N*-acetylneuraminic acid detected with a DAD or a FLD in a EBN sample spiked at 3 levels ($n=6$)

	DAD检测器			FLD检测器		
	唾液酸质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	回收率/%	RSD/%	唾液酸质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	回收率/%	RSD/%
样品基质	226.47 $\pm$ 6.55			225.65 $\pm$ 6.75		
加标1.25 $\mu\text{g/mL}$	193.65 $\pm$ 0.30	85.03	0.15	194.60 $\pm$ 0.32	85.76	0.16
加标25 $\mu\text{g/mL}$	243.02 $\pm$ 0.57	96.65	0.23	243.48 $\pm$ 0.26	97.14	0.11
加标200 $\mu\text{g/mL}$	403.14 $\pm$ 0.25	94.53	0.06	402.56 $\pm$ 1.18	94.57	0.29
平均回收率/($n=18$)		92.07			92.49	
RSD/($n=18$)			0.15			0.19

精密称取已测定含量的燕窝样品约5mg,分别加入低、中、高3种不同质量浓度(1.25、25、200 $\mu\text{g/mL}$)的 *N*-乙酰神经氨酸对照品溶液5mL,用超纯水定容至10mL。按测定方法要求进行回收实验,计算3个加标水平的平均回收率和相对标准偏差,分析不同添加条件下的回收率变化,结果见表3。3种质量浓度回收率的测定结果为85.03%~97.14%,符合准确定量分析的要求。

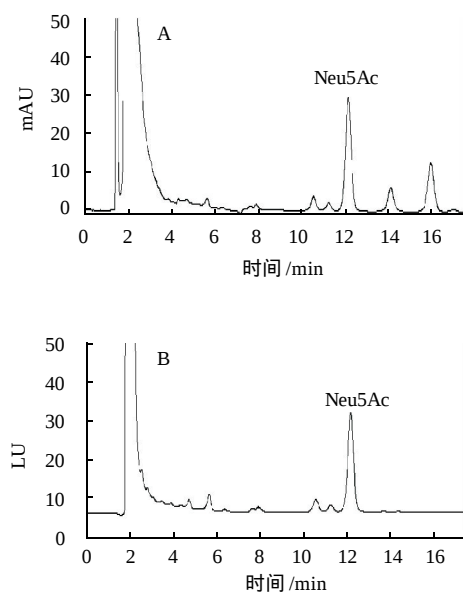
3 讨论

3.1 水解条件选择

本实验对热水浸提法提取燕窝样品中的唾液酸与直接酸水解方法进行对比,热水浸提法不但费时,且浸提不完全,故选择酸水解法对燕窝样品直接水解得唾液酸。然后考察了不同浓度的硫酸氢钠溶液、硫酸铵以及硫酸溶液对糖脂与糖蛋白样品的水解效果,结果表明,0.5mol/L 硫酸氢钠溶液的水解效率较高,在80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热30min,水解基本完全。

3.2 对照品确定

本方法可同时对 Neu5Ac 和 NeuGc 进行分析,二者能实现很好的分离(图2)。但通过对燕窝、神经节苷脂(GM₁)等含唾液酸样品的测定发现,它们只含有 Neu5Ac,而没有 NeuGc,故本实验仅选择 Neu5Ac 作为对照品进行了详细的分析和讨论。图4为使用本方法对神经节苷脂(GM₁)样品进行衍生分析的结果。



A. 二极管阵列色谱图; B. 荧光色谱图。

图4 GM₁样品中唾液酸的HPLC图

Fig.4 HPLC chromatograms of *N*-acetylneuraminic acid in a GM₁ sample with DAD (A) or FLD detection (B)

3.3 两种检测器比较

DAD 是一种最普及的 HPLC 检测器,而 FLD 具有更高的灵敏度和选择性,基于此特点,本实验采用两种检测器串联进行比较,结果显示,两者平均回收率和 RSD 十分接近;FLD 测定 Neu5Ac 的检出限为 0.005 $\mu\text{g/mL}$,DAD 为 0.2 $\mu\text{g/mL}$,FLD 比 DAD 的低两个数量级,在低含量唾液酸样品的测定时选用 FLD 更好,且在 15~18min 范围内 FLD 无杂质峰出现;而在 DAD 检出限以上的相同浓度下,DAD 对 Neu5Ac 的响应较 FLD 强约 29%。因此,两个检测器串联使用,可以弥补各自的不足,保证待测唾液酸在各浓度下能被正确检出。

4 结论

本研究建立了唾液酸的柱前衍生二极管阵列/荧光检测器串联的反相高效液相色谱检测方法。该方法提高了唾液酸定性和定量检测的准确性,并充分地对检测结果进行验证,提高方法的可靠性。通过线性、准确度、精密度、检出限和样品的测定,充分验证了方法的可行性。本方法的建立,满足糖脂、糖蛋白等样品中唾液酸检测的需要,同时也为燕窝真伪的鉴别提供了一种准确的检测方法。

参考文献:

- [1] GUO Chaotao, TAKAHASHI T, BUKAWA W, et al. Edible bird's nest extract inhibits influenza virus infection[J]. Antiviral Research, 2006, 70: 140-146
- [2] 张能荣. 燕窝的成分和药理研究概况[J]. 中国生化药物杂志, 1993 (4): 6-10.
- [3] KEPPEL O T, HORSTKORTE R, PAWLITA M, et al. Biochemical engineering of the *N*-acetyl side chain of sialic acid: biological implications [J]. Glycobiology, 2001, 11(2): 11-18
- [4] 李绍顺. 唾液酸及其衍生物的生物学研究进展[J]. 药学进展, 1997, 21(2): 70-76.
- [5] 赵心臣. 唾液酸[J]. 广东牙病防治, 1998, 6(4): 63-64.
- [6] 黄华军, 奚星林, 陈文锐, 等. 分光光度法检测燕窝及其制品中燕窝含量[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(3): 68-69.
- [7] ANUMULA K R. Rapid quantitative determination of sialic acid in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with a sensitive fluorescence detection[J]. Analytical Biochemistry, 1995, 230: 24-30.
- [8] 冯君, 李宏基, 韩立强, 等. 高效液相色谱法测定乳中唾液酸含量[J]. 现代食品科技, 2007, 23(12): 75-76; 84.
- [9] 王慧, 倪坤仪, 王玉. 燕窝中唾液酸的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(9): 1251-1253.
- [10] KARAMAN N K, WIKSTROM B, ANTONOPOULOS C A. Determination of *N*-acetyl- and *N*-glycolylneuraminic acids in glycoconjugates by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection[J]. J Chromatogr, 1990, 503: 421-429.
- [11] REUTER G, PFEIL R, STOLL S, et al. Identification of new sialic acids derived from glycoprotein of bovine submandibular gland[J]. Eur J Biochem, 1983, 134: 139-143.
- [12] 贾丽, 周维, 潘瑛. 在线富集胶束电动色谱法测定唾液中的唾液酸[J]. 分析测试学报, 2004, 23(6): 69-72.
- [13] 贾丽, 周维, 高文华. 在线富集毛细管区带电泳测定唾液中的 *N*-乙酰神经氨酸[J]. 汕头大学学报, 2004, 19(3): 42-47.