

HPLC 法·酶法和间苯二酚法检测生物制品中唾液酸含量方法学比较

秦淑红^{1,2,3}, 朱爱华^{1,2,3}

(1. 陕西新药技术开发中心, 陕西西安 710075; 2. 陕西省创新药物研究中心, 陕西西安 710075; 3. 陕西省中药与天然药物研发重点实验室, 陕西西安 710075)

摘要 [目的] 比较高效液相色谱法(HPLC)、酶法及间苯二酚法测定唾液酸浓度的准确性、灵敏性和线性范围, 探讨 3 种方法的实际应用特点。[方法] 建立 HPLC、酶法和间苯二酚法测定唾液酸浓度的方法, 并分别使用 3 种方法同时测定同种生物制品中的唾液酸浓度。[结果] HPLC 法线性范围为 0.3~2 500.0 μg/mL, 回收率为 98.0%~99.2%, 日内、日间 RSD 分别为 0.8%~1.4% 和 1.6%~1.8%。酶法线性范围为 0.6~20.0 μg/mL, 回收率为 102.0%~106.5%, 日内、日间 RSD 分别为 3.5%~4.2% 和 4.0%~4.6%。间苯二酚法线性范围为 39~1 250 μg/mL, 回收率为 98.2%~100.2%, 日内、日间 RSD 分别为 2.9%~3.3% 和 3.0%~3.5%。[结论] 3 种方法回收率和精密度差异无显著性, 但高效液相色谱法更加简单、便捷、成本低廉、灵敏度高且线性范围较宽, 广泛适合生物制品中唾液酸含量测定。

关键词 唾液酸; 高效液相色谱法; 酶法; 间苯二酚法; 方法学

中图分类号 S 131 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)20-0162-02

Comparison of the Methods for the Determination of Sialic Acid by HPLC, Enzymatic and Resorcinol Methods

QIN Qiu-hong^{1,2,3}, ZHU Ai-hua^{1,2,3}

(1. Shaanxi New Drug Technology Development Center, Xi'an, Shaanxi 710075; 2. Shaanxi Innovative Drug Research Center, Xi'an, Shaanxi 710075; 3. Key Laboratory of Research and Development of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710075)

Abstract [Objective] The research aimed to determine the accuracy, sensitivity and linearity of sialic acid concentration by high performance liquid chromatography (HPLC), enzymatic and resorcinol methods, and discuss the practical application characteristics of the three methods. [Method] Establishing methods for the determination of sialic acid concentration by HPLC, enzymatic and resorcinol methods, and determining the sialic acid concentration in the same biological products using the three methods. [Result] The linear range of HPLC method was 0.3–2 500.0 μg/mL, and the recovery rate was 98.0%–99.2%, within-day and day-to-day RSD were 0.8%–1.4% and 1.6%–1.8% respectively. The linear range of enzymatic method was 0.6–20.0 μg/mL, and the recovery rate was 102.0%–106.5%, within-day and day-to-day RSD were 3.5%–4.2% and 4.0%–4.6% respectively. The calibration curve of resorcinol method was 39–1250 μg/mL, and the recovery rate was 98.2%–100.2%, Within-day and day-to-day RSD were 2.9%–3.3% and 3.0%–3.5% respectively. [Conclusion] There is no significant difference among the three methods in terms of recovery and precision, but HPLC is more simple, convenient, inexpensive, sensitive, and has a wide linear range, which can be widely used for the determination of sialic acid in biological products.

Key words Sialic acid; High performance liquid chromatography; Enzymic method; Resorcinol method; Methodology

唾液酸(Sialic acid, SA) 又称燕窝酸, 是神经氨酸经 N-乙酰化、O-乙酰化或 N-羟乙乙酰化后的衍生物, 其广泛存在于哺乳动物、脊椎动物及多种植物中的细胞膜表面, 以糖苷键链接到糖蛋白或糖脂的末端, 参与信号转导等多种生理功能^[1]。唾液酸因具有提高人体免疫力^[2]、提高记忆力和智力水平^[3] 以及抗痴呆^[4] 等作用而被广泛关注。已有研究表明, 唾液酸表达水平与疾病发生也密切相关, 在糖尿病、肾病、中枢神经系统疾病以及细菌感染的患者中唾液酸的表达水平出现明显异常^[5]。目前唾液酸的含量测定有间苯二酚法^[6]、酶法^[7] 以及高效液相色谱法^[8], 但是这些方法都有自身的特点。该试验通过方法学研究这 3 种方法各自的优点和缺点, 为不同生物样品唾液酸含量检测选择测定方法提供依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试液 唾液酸对照品[梯希爱(上海)化成工业发展有限公司]; 胎球蛋白[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; 唾液酸检测试剂盒[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; 间苯二酚、磷酸、邻苯二胺、盐酸、硫酸铜、乙酸丁酯、丁醇、乙腈为分析纯; 高效液相色谱系统(戴安中国有限公司, 型号 UltiMate3000); 离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司, 型号 TDZ6B-WS); 酶标仪(美谷分子仪器有限公司,

型号 Spectramax Plus 384)。

1.2 测定方法

1.2.1 标准溶液的配制。精密称取唾液酸标准品 25.0 mg, 加 0.5% 磷酸溶液至 5 mL, 配制成 5 000 μg/mL 唾液酸标准品贮备液, 并稀释成终浓度分别为 2 500.0、1 250.0、625.0、313.0、156.0、78.0、39.0、20.0、10.0、5.0、2.5、1.3、0.6、0.3 μg/mL 标准液。

1.2.2 HPLC 法测定生物制品中唾液酸含量。

1.2.2.1 样品制备。精密称取 0.1 g 奶粉溶于 10 mL 水中, 混匀, 于 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min, 除去上层油脂, 或精密量取 1 mL 新鲜牛奶, 加入磷酸至终浓度为 0.5 % 磷酸溶液并定容至 10 mL, 或精密称取 10 mg 胎球蛋白用 0.5 % 磷酸溶液溶解并定容至 10 mL, 于沸水煮沸 30 min, 室温冷却后取 0.5 mL 与 10 mg/mL 邻苯二胺溶液(0.5% 磷酸溶液溶解) 0.5 mL 混匀, 于 60 ℃ 水浴 40 min, 置室温冷却。

1.2.2.2 含量测定。按照高效液相色谱法, 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 柱温 30 ℃ 以 0.1% 磷酸: 乙腈(90:10) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 230 nm, 对照品溶液及样品溶液各进样 20 μL, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算唾液酸含量。

1.2.3 酶法测定生物制品中唾液酸含量。

1.2.3.1 样品制备。精密称取 0.05 g 奶粉溶于 10 mL 水中, 混匀, 于 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min, 除去上层油脂, 或精

基金项目 陕西省青年科技新星计划项目(2016KJXX-31)。

作者简介 秦淑红(1986—), 女, 重庆人, 工程师, 博士, 从事生物医药研究与开发工作。

收稿日期 2018-03-23

密量取 0.5 mL 新鲜牛奶,加入磷酸至终浓度为 0.5% 磷酸溶液并定容至 10 mL,或精密称取 5 mg 胎球蛋白用 0.5% 磷酸溶液溶解并定容至 10 mL,于沸水煮沸 30 min,置室温冷却。

1.2.3.2 含量测定。按照唾液酸检测试剂盒操作方法,在样品中加入 930 μ L Tris Reaction Buffer,吸取反应溶液至比色皿中,将分光光度计在 340 nm 处调零,加入 20 μ L β -DADH Solution,反复吹打多次后在 340 nm 处读取初始 β -DADH 吸光度。将反应液重新吸回到原反应管中,加入 1 μ L N-Acetylneuraminic Acid Aldolase 和 1 μ L L-Lactic Dehydrogenase,反复吹打多次后于 37 $^{\circ}$ C 水浴至少 1 h,吸取反应液至比色皿中,读取最终 340 nm 处吸光度。计算唾液酸含量。

1.2.4 间苯二酚法测定生物制品中唾液酸含量。

1.2.4.1 样品制备。精密称取 1 g 奶粉溶于 10 mL 水中,混匀,于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min,除去上层油脂,或精密量取 10 mL 新鲜牛奶,加入磷酸至终浓度为 0.5%,或精密称取 10 mg 胎球蛋白用 0.5%磷酸溶液溶解并定容至 1 mL,于沸水煮沸 30 min,置室温冷却。

1.2.4.2 含量测定。按照 2015 版《中国药典》三部通则 3102 唾液酸测定法,将样品 100 μ L 置入 10 mL 玻璃试管中,每管加入间苯二酚-盐酸溶液(分别量取 2% 间苯二酚溶液 2.5 mL、0.1 mol/L 硫酸铜溶液 62.5 μ L、25%盐酸溶液 20 mL,加水稀释至 25 mL,混匀)1 mL,加盖,沸水煮沸 30 min,取出置冰浴中 3 min 后,没管加乙酸丁酯-丁醇液(取乙酸丁酯 4 份与丁醇 1 份混匀)2 mL,充分混匀,室温放置 10 min,在波长 580 nm 处测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 HPLC 法测定唾液酸含量线性关系 在“1.2.2.2”色谱条件下,唾液酸的保留时间为 8.6 min 峰形良好,分离完全。取标准溶液系列按“1.2.2.2”方法进行测定。以所测得的唾液酸峰面积为横坐标、相应的唾液酸浓度(μ g/mL)为纵坐标做线性回归,得出回归方程为 $Y = 3.513\ 8X - 1.247$ ($R^2 = 0.999\ 9$),表明唾液酸在 0.3~2 500.0 μ g/mL 线性良好。

2.2 酶法测定唾液酸含量线性关系 取标准溶液系列按照“1.2.3.2”操作。以所得的唾液酸光吸光度为横坐标、相应的唾液酸浓度(μ g/mL)为纵坐标做线性回归,得出回归方程为 $Y = 108.92X - 4.192\ 7$ ($R^2 = 0.999\ 0$),表明唾液酸在 0.6~20.0 μ g/mL 线性良好。

2.3 间苯二酚法测定唾液酸含量线性关系 取标准溶液系

列按照“1.2.4.2”操作。以所得的唾液酸光吸光度为横坐标、相应的唾液酸浓度(μ g/mL)为纵坐标做线性回归,得出回归方程为 $Y = 3.743\ 5X - 0.151\ 4$ ($R^2 = 0.999\ 6$),表明唾液酸在 39~1 250 μ g/mL 线性良好。

2.4 精密度试验 取唾液酸标准溶液,用 HPLC 法检测 10、20、39 μ g/mL 溶液,用酶法检测 5、10、20 μ g/mL 溶液,用间苯二酚法检测 20、39、78 μ g/mL 溶液,各每天检测 5 次,计算日精密度,连续检测 5 d 计算日间精密度。结果见表 1。结果显示,3 种方法均符合生物样品分析要求。

表 1 3 种检测方法精密度试验结果($n=5$)
Table 1 The results of precision test of the three test methods

测定方法 Measurement method	理论浓度 Theoretical concentration μ g/mL	日内 Within-day		日间 Day-to-day		收率 Recovery rate %
		$\bar{x}$ μ g/mL	RSD %	$\bar{x}$ μ g/mL	RSD %	
HPLC 法	10	10.2	1.4	9.7	1.8	98.0
HPLC	20	19.9	1.0	19.9	1.6	98.2
method	39	39.0	0.8	39.0	1.6	99.2
酶法	5	5.3	4.2	5.2	4.6	106.5
Enzymic	10	10.5	3.8	10.1	4.0	104.6
method	20	20.4	3.5	20.2	4.0	102.0
	20	20.3	3.1	20.0	3.5	98.2
间苯二酚法	39	39.1	3.3	38.8	3.3	100.2
Resorcinol method	78	78.3	2.9	78.1	3.0	100.2

2.5 回收率试验 取 3 种检测方法各项下配制的奶粉 1#样品溶液(唾液酸含量分别为 15.75、7.93、156.80 μ g/mL),分别加入同体积的唾液酸对照品 20、10、156 μ g/mL,分别用 3 种方法检测,计算回收率。结果显示(表 1),3 种方法均符合生物样品分析要求。

2.6 生物制剂样品中测定结果及比较 用 3 种方法检测不同生物制品中唾液酸含量,结果见表 2,3 种方法所测得的唾液酸浓度结果经 t 检验无显著差异($P>0.05$)。

以 HPLC 测定值为自变量 X 、酶法测定值为函数 Y 进行线性回归,回归方程为 $Y = 0.990\ 4X + 0.015\ 8$ ($R^2 = 0.999\ 0$),可见 HPLC 法与酶法的相关性良好。以 HPLC 测定值为自变量 X 、间苯二酚法测定值为函数 Y 进行线性回归,回归方程为 $Y = 0.980\ 7X + 0.025\ 8$ ($R^2 = 0.998\ 0$),HPLC 法与间苯二酚法的相关性良好。

表 2 3 种方法测定不同生物制品中唾液酸含量
Table 2 Three methods for determining sialic acid content in different biological products

测定方法 Measurement method	胎球蛋白 Fetuin mg/g	新鲜牛奶 Fresh milk g/L	奶粉 1# Milk powder 1# mg/g	奶粉 2# Milk powder 2# mg/g
HPLC 法 HPLC method	22.963+0.070	0.136+0.001	1.575+0.005	1.687+0.005
酶法 Enzymic method	22.758+0.408	0.135+0.003	1.586+0.004	1.693+0.036
间苯二酚法 Resorcinol method	22.545+0.942	0.138+0.006	1.568+0.057	1.705+0.037

3 讨论

目前检测生物制品中唾液酸浓度的方法有高效液相色谱法、酶法和间苯二酚法等。酶法测定生物制品中唾液酸浓

(下转第 166 页)

($R^2=0.999\ 9$)。表明叶黄素在 0.139 6~2.094 0 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.2.2 精密度试验。从表 5 可看出,叶黄素峰面积的相对标准偏差 RSD 为 1.76%,表明仪器精密度高。

2.2.3 重复性试验。从表 5 可看出,叶黄素含量的 RSD 为 1.54%,表明该方法重复性良好。

表 5 精密度和重复性试验结果

Table 5 Precision and repeatability test results						
序号 No.	精密度试验 Precision test			重复性试验 Repeatability test		
	含量 Content g/kg	均值 Mean value g/kg	RSD %	含量 Content g/kg	均值 Mean value g/kg	RSD %
1	4.57	4.69	1.76	4.58	4.70	1.54
2	4.60			4.65		
3	4.72			4.72		
4	4.77			4.75		
5	4.73			4.74		
6	4.74			4.77		

2.2.4 加样回收率试验。从表 6 可看出,叶黄素的平均回收率为 99.55%,RSD 为 2.21%,表明叶黄素的加样回收率良好。

3 结论与讨论

该研究测定叶黄素是在党亚敏等^[4]研究的基础上进行了优化,分别考察了 N,N—二甲基甲酰胺^[4]、60 ℃水^[7]、二甲基亚砷^[8] 3 种破囊溶剂,确定了破囊溶剂为 60 ℃水,与其他 2 种破囊溶剂比较,转移率最为合理且无毒、绿色环保;对样品提取溶剂进行了优化,在无水乙醇的基础上增加了 0.1% BHT^[8],样品溶液中叶黄素在 24 h 很稳定,解决了叶黄素在测定过程中不稳定的缺点;对破囊时间、提取时间进行优化

表 6 加样回收率试验结果

Table 6 Test results of sample recovery					
样品含量 Sample content mg	加入量 Added amount mg	测得总量 Measured total content mg	回收率 Recovery rate// %	平均回收率 Average recovery rate// %	RSD %
0.232 7	0.1433 4	0.373 9	98.53	99.55	2.21
0.213 6	0.1433 4	0.354 9	98.59		
0.209 2	0.1433 4	0.354 7	101.47		
0.232 1	0.1433 4	0.371 4	97.18		
0.237 4	0.1433 4	0.385 0	102.99		
0.213 8	0.1433 4	0.355 0	98.53		

和方法学考察,确定破囊时间为 3 min,提取时间为 10 min,此条件下叶黄素可被充分提取。综上所述,该方法操作简便、适用性强、重现性好、稳定性佳,所用试剂绿色环保,此方法可用于保健食品中叶黄素含量测定。

参考文献

[1] 李大婧,庞慧丽,刘春泉.叶黄素和玉米黄质对眼睛的保护作用研究进展[J].江苏农业科学,2013,41(9):1-4.
[2] 李大婧,刘春泉,白云峰,等.叶黄素、玉米黄质研究进展:叶黄素、玉米黄质的结构、性质和生物学功能[J].核农学报,2006,20(1):64-67.
[3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品中叶黄素的测定:GB 5009.248—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
[4] 党亚敏,李建平,张明月,等.高效液相色谱法测定保健食品中的叶黄素[J].中国卫生检验杂志,2011,21(7):1650-1651.
[5] 黄声岚,俞晓玲,柯加法,等.高效液相色谱法测定食品中的叶黄素[J].海峡预防医学杂志,2009,15(4):48-50.
[6] 张莉华,许新德,陈少军,等.HPLC 法测定食品中的叶黄素含量[J].粮油食品科技,2007,15(1):60-62.
[7] 白鸿.保健食品功效成分检测方法[M].北京:中国中医药出版社,2011:258-261.
[8] 鲁杰,方从荣,高洁,等.微胶囊化功能性番茄红素产品的高效液相色谱测定法改进[J].中国食品添加剂,2013(3):99-102.

(上接第 163 页)

度具有准确、灵敏度高的优点,但其成本较高,操作方法较为复杂,且线性范围较窄。间苯二酚法是《中国药典》收录的传统的测定唾液酸含量的方法,具有快速、准确、重现性好的优点,但其灵敏度较差,线性范围较窄。高效液相色谱法测定生物制品中唾液酸浓度具有快速、准确、重现性好、灵敏度高且线性范围较宽的优点,可广泛适用于生物制品中唾液酸含量的检测。

参考文献

[1] 李连生,刘克刚,姚祝军,等.唾液酸类化合物的合成研究进展[J].有机化学,2002,22(10):718-734.
[2] BORK K, REUTTER W, GERARDY-SCHAHN R, et al. The intracellular

concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule[J].FEBS Lett,2005,579(22):5079-5083.
[3] BRUSÉS J L, RUTISHAUSER U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development[J].Biochimie,2001,83(7):635-643.
[4] 范剑.单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液治疗老年性痴呆 45 例[J].中国药业,2007,16(19):59.
[5] 吴日余.酶动力学法测定尿唾液酸临床诊断初探[J].齐齐哈尔医学院学报,2005,26(11):1302.
[6] 冯君,李宏基,韩立强,等.高效液相色谱法测定奶粉中唾液酸的含量[J].中国乳品工业,2008,36(6):62-64.
[7] 戴谦,吴炯,郭玮,等.酶法检测唾液酸的性能验证及临床应用评估[J].中华检验医学杂志,2014,37(3):189-193.
[8] 徐绯,宋紫玉.间苯二酚法测定重组人红细胞生成素原液唾液酸含量方法验证[J].黑龙江科技信息,2013(22):5.

科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对增长率),单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时),则可取各主要词首字母写成缩写,但需在第一次出现处写出全称,表及图中则用注解形式在下方注明,以便读者理解。