

N-丙酰-唾液酸衍生物的化学酶法合成 及在测定禽蛋中唾液酸含量的应用

王毛毛¹,张瑶瑶^{1,+},姚宏亮²,刘 丽^{1,*},JOSEF Voglmeir^{1,*}

(1.南京农业大学食品科技学院,江苏南京 210095;

2.金陵科技学院动物科学与技术学院食品科学系,江苏南京 210038)

摘要:为实现禽类蛋黄和蛋清中N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac)的准确定量,消除禽蛋样品中分析物以外的物质产生的基质效应对分析结果造成的影响,本研究以甘露糖胺为底物采用化学酶法合成了非天然唾液酸衍生物5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷-N-丙酰-唾液酸(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside-N-propionyl-sialic acid, X-Gal-α-2,6-Neu5Prop),对该衍生物在酸性条件下的水解特性以及稳定性进行研究,并以该衍生物为内标测定了鹌鹑、鹅、珍珠鸡、鸵鸟、鸭、鸽子、火鸡等9种禽类蛋黄和蛋清中Neu5Ac的含量。禽蛋样品和内标物在酸性条件下处理,唾液酸糖缀合物被解离为游离的唾液酸后经荧光标记物邻苯二胺衍生,采用高效液相色谱-荧光检测器对样品进行分析。结果表明,相同浓度的X-Gal-α-2,6-Neu5Ac和X-Gal-α-2,6-Neu5Prop在2 mol/L的醋酸溶液80℃的水解条件下水解程度相当,90 min后能够完全转化为游离的唾液酸。Neu5Ac和Neu5Prop在10 h内仍保持相似的稳定性。蛋清中Neu5Ac的含量在不同物种之间表现出很大的差异。鹌鹑蛋清中Neu5Ac的含量最低(0.13 mg/g),而鸵鸟蛋清中的最高(2.20 mg/g),比鹌鹑蛋清Neu5Ac含量高近17倍。该方法能够消除生物样品中的基质效应,实现对Neu5Ac的准确定量,且样品前处理简单。因此,适合常规食品中Neu5Ac的检测与分析。

关键词:唾液酸, Neu5Ac, 蛋清, 蛋黄, 高效液相色谱-荧光检测器(HPLC-FLD)

Chemoenzymatic Synthesis of N-Propionyl-Neuraminic Acid Derivative and Its Application in the Determination of Sialic Acid Content in Poultry Eggs

WANG Mao-mao¹, ZHANG Yao-yao^{1,+}, YAO Hong-liang², LIU Li^{1,*}, JOSEF Voglmeir^{1,*}

(1.College of Food Science and Engineering, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;

2.Department of Food Science, School of Animal Science, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China)

Abstract: To realize the accurate quantification of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in egg yolk and egg white of poultry, and eliminate the matrix effect caused by substances other than analytes in egg samples, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside-N-propionyl-sialic acid (X-Gal-α-2,6-Neu5Prop) was synthesized by chemical enzymatic method using mannosamine as substrate. The hydrolysis characteristics and stability of the derivative under acidic conditions were studied. The content of Neu5Ac in egg yolk and egg white of quail, goose, guinea fowl, ostrich, duck, pigeon and turkey was determined by using the derivative as internal standard. The glycoconjugates of sialic acid were dissociated into free sialic acid after being treated in acidic condition. The samples were analyzed by high performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLD). It was found that the hydrolysis rate of X-gal-α-2,6-Neu5aAc and X-gal-α-2,6-Neu5Prop at the same concentration were similar under the condition of 2 mol/L acetic acid solution at 80℃, which could be completely converted into free sialic acid after 90 min. The stability of Neu5Ac and Neu5Prop were similar at 10 h. The Neu5Ac content of the egg whites showed a wide variation across species. Quail egg whites had the lowest concentration of Neu5Ac (0.13 mg/g), while the ostrich had the highest (2.20 mg/g), which was seventeen times higher nearly. And Neu5Ac content of chicken egg yolk and albumen was found to be in agreement with previous reports. The method of analysis described herein could eliminate the matrix

收稿日期:2020-01-15 + 并列第一作者

作者简介:王毛毛(1989-),女,硕士研究生,研究方向:糖组学与糖生物学,E-mail:2012108007@njau.edu.cn。

张瑶瑶(1993-),女,博士研究生,研究方向:糖组学与糖生物学,E-mail:2018208001@njau.edu.cn。

* 通信作者:刘丽(1972-),女,博士,教授,研究方向:糖组学与糖生物学,E-mail:lichen.liu@njau.edu.cn。

JOSEF Voglmeir(1979-),男,博士,教授,研究方向:糖组学与糖生物学,E-mail:josef.voglmeir@njau.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金(31471703, A0201300537, 31671854);“外专百人计划”(JSB2014012)。

effect in biological samples and quantify the content of Neu5Ac accurately, with facile sample preparation requirements and was well suited to the routine analysis of foodstuffs.

Key words: sialic acid; Neu5Ac; egg white; egg yolk; high performance liquid chromatography-fluorescent detector (HPLC-FLD)

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)01-0028-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020010142

引文格式: 王毛毛, 张瑶瑶, 姚宏亮, 等. N-丙酰-唾液酸衍生物的化学酶法合成及在测定禽蛋中唾液酸含量的应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 28-34, 41.

WANG Mao-mao, ZHANG Yao-yao, YAO Hong-liang, et al. Chemoenzymatic Synthesis of N-Propionyl-Neuraminic Acid Derivative and Its Application in the Determination of Sialic Acid Content in Poultry Eggs [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(1): 28-34, 41. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

唾液酸 (Sialic acid, Sia), 又称神经氨酸 (Neuraminic acid, Neu), 是一系列含有九个碳原子的羟基化单糖酰化衍生物的统称, 通常位于高等动物糖蛋白、神经节苷脂及多糖胺等寡糖链的末端^[1], 通过 α -2, 3/6 键连接在半乳糖 (Gal)/N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 上或 α -2, 8 键连接到其他种类的唾液酸上^[2]。唾液酸家族种类繁多, 目前已经鉴定出 50 多种天然存在的唾液酸衍生物^[3], 其核心结构分为酮基-脱氧壬酮糖 (Kdn) 和神经氨酸 (Neu) 两大类^[4]。常见两种构型为 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (Neu5Gc)^[5], 其中研究最多、最深入的唾液酸是 Neu5Ac, 它是合成其他种类唾液酸的前体^[6]。唾液酸作为糖缀合物的重要组成部分, 其所携带的负电荷能促进细胞之间的相互排斥, 起到稳定细胞膜、增加偶联糖蛋白粘度的作用^[7]。唾液酸还是重要的生物信息传递分子, 如参与识别宿主与病原体之间以及细胞之间的反应^[8-9]、参与衰老红细胞的触发和吞噬等^[10]。另外, 唾液酸与肿瘤的发生、发展都有着密切的关联^[11-12]。研究发现唾液酸在脑中的含量很高, 它能促进神经细胞的发育、分化和再生, 并参与记忆和学习功能^[13]。婴幼儿自身合成的唾液酸并不能满足机体需要, 研究发现可以通过饮食补充外源性唾液酸以增加脑部唾液酸的含量。因此很有必要开发一种能够用于食品中唾液酸含量的准确定量方法, 为婴幼儿膳食营养补充提供有力的依据。

Warren 等^[14]开发出一种用于唾液酸含量测定的比色法, 但该方法的特异性差。随着分析技术的稳定和完美, 如高效液相色谱 (HPLC)、气相色谱 (GC) 和质谱的联用等分析技术使人们对唾液酸的结构有了更加清晰的认识。Koketsu 等^[15]应用高效液相色谱技术测定了乌鸡蛋中唾液酸的含量。但该方法的缺点是生物样品的基质效应使得唾液酸的检测结果准确度不高。为了解决这一问题, 本实验室在前期研究中以 X-Gal- α -2, 6-Neu5Prop 为内标, 与红肉样品同时进行酸水解使分析物与内标物处于相同的基质背景, 从而消除基质效应^[16]。游离唾液酸经荧光标记物邻苯二胺衍生后采用 HPLC-FLD 进行检测^[16-18], 实现了红肉中唾液酸的准确定量。

膳食中 Neu5Ac 的主要来源之一是鸡蛋, 研究发现鸡蛋中含有大量的 Neu5Ac, 尤其是蛋黄中含量更

高 (0.95 g/kg)^[19], 且不含其他种类的唾液酸^[20]。鸡蛋作为 Neu5Ac 的饮食和工业来源具有巨大的潜力^[21]。而其他种类禽蛋如鹌鹑蛋、鹅蛋、鸭蛋等却鲜有研究, 因此本研究拟以化学酶法合成的 X-Gal- α -2, 6-Neu5Prop 为内标并结合 HPLC-FLD 对 9 种禽类蛋黄和蛋清中 Neu5Ac 的含量进行测定, 从而为膳食营养的摄入提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜禽蛋 (鸡、鹌鹑、鹅、珍珠鸡、鸵鸟、鸭、鸽子、乌鸡和火鸡) 购自江苏苏果超市和南京家禽养殖场; N-乙酰神经氨酸 分析纯, 上海德默医药科技有限公司; NaHSO₃、NaCl、冰醋酸 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 邻苯二胺 (OPD) 分析纯, 百灵威科技有限公司; 甲醇、乙腈 色谱纯, 默克公司; N-氨基琥珀酰亚胺 (NHS)、二环己基碳二亚胺 (DCC)、乙酸乙酯、三乙胺 (Et₃N)、甲醇、氯化镁、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-Gal)、2-(N-吗啡啉)、乙磺酸 (MES)、三磷酸胞苷 (CTP)、甘露糖胺 分析纯, 南京寿德公司; 所有分离用有机溶剂 均为国产分析纯; 唾液酸转移酶 (~0.02 U)、CMP-唾液酸合成酶 (~0.02 U)、唾液酸醛缩酶 (≥ 13 mU) 南京格莱克生物科技有限公司; 乳糖酶 (~10 U) 德国 Pronatura 公司。

1416R 型高速冷冻离心机 珠海黑马医学仪器有限公司; GRP-9160 型恒温培养箱 上海森信实验仪器有限公司; LNG-T12 真空离心浓缩干燥仪 太仓市华利达实验设备有限公司; Shimadzu LC-30AD 型超高效液相色谱配有 SPD-20A 型紫外检测器以及 RF-20Axs 型荧光检测器、SIL-30AC 型自动进样器、CO-2000 型柱温箱 (恒温仪器)、LCMS-2020 型液相质谱联用仪、LC solution 工作站 岛津技迹 (上海) 商贸有限公司; Ultrafile Xtreme MALDI-TOF 质谱仪 德国 Bruker 公司; 数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司 (江苏)。

1.2 实验方法

1.2.1 X-Gal- α -2, 6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2, 6-Neu5Prop 的合成、纯化与检测 生物样品中唾液酸通常以糖缀合物的形式存在于糖脂和糖蛋白上与半乳糖残基相连。因此本文选择了 X-Gal- α -2, 6-

Neu5Ac 作为生物样品唾液酸糖缀合物的模型,并研究 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 在酸性条件下的水解特性以确定生物样品中唾液酸糖缀合物解离为游离唾液酸的最佳反应时间,同时跟内标物在酸性条件下水解特性进行比较,以判断 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 是否能作为合适的内标。

1.2.1.1 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的合成 以 Neu5Ac 和 X-Gal 为起始物,酶法合成 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac^[22-25],将 MES 缓冲液(4 mL,0.5 mol/L,pH6.5)、MgCl₂(80 μ L,1 mol/L)、胞苷三磷酸(5.52 mL,80 mmol/L)、Neu5Ac(0.92 mL,0.2 mol/L)、X-Gal(0.6 mL,61 mmol/L)、唾液酸转移酶(19.68 mL)和 CMP-唾液酸合成酶(9.2 mL)混合后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中反应。在 10 min、30 min、1 h、2 h、3 h 等反应时间点取样并用 HPLC 实时监测 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 的转化率,待转化率达到 95% 时加入乳糖酶(1 mL),继续反应 1 h 以除去过量的 X-Gal。

以甘露糖胺为底物采用化学酶法合成 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop^[16,25](X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的合成流程及应用如图 1 所示)。将反应体系置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中反应,利用 HPLC 实时检测转化率,待转化率 \geq 80% 时加入乳糖酶(\sim 10 U),37 $^{\circ}$ C 反应 30 min 以除去过量的 X-Gal。

1.2.1.2 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的纯化 将 1.2.1.1 中 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 的反应体系先经 C₁₈ 固相萃取柱(SupelcleanTM ENVITM-18 SPE,45 μ m 平均孔径,500 mg/3 mL)纯化,上样后用 4 mL 水平衡柱子,然后分别用 10 mL 10%、40%、100% 的乙腈-水溶液(v/v)梯度洗脱并收集样品洗脱下来的样品,每管收集 2 mL,利用 HPLC 在 300 nm 的波长下检测收集到的组分并将含有 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 的组分合并。将合并后的初提纯品减压真空浓缩干燥(28 Pa,1500 r/min,常温)后用硅胶柱进行二次纯化,硅胶柱采用湿法装柱,硅胶粉用量为样品量的 30 倍左右,待硅胶柱压实后将 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 的初提纯品加入硅胶柱的最上端,经乙酸乙酯:甲醇:水(12:8:1,v/v/v)混合溶剂洗脱,并收集洗脱液。用 HPLC 对收集到的样品进行再次检测,将含有 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 的洗脱组分合并,采用真空浓缩除去溶剂,得到 10 mg X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 的纯品(产率为 39%,产物的摩尔质量/底物的摩尔质量 \times 100)。X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的纯化方式与上述相同。

1.2.1.3 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的检测 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的 HPLC 检测洗脱程序如下:反相色谱柱:Phenomenex Hyperclone 5 μ m ODS C₁₈,250 mm \times 4.60 mm。流动相 A:50 mmol/L 甲酸铵(pH4.5);流动相 B:乙腈;流速 1.0 mL/min;紫外检测波长:300 nm;进样量:10 μ L;柱温常温。洗脱程序:0~5 min B 10%~60%,5~6 min B 60%~90%,6~8 min B 90%,8~9 min B 90%~10%,9~15 min B 10%。

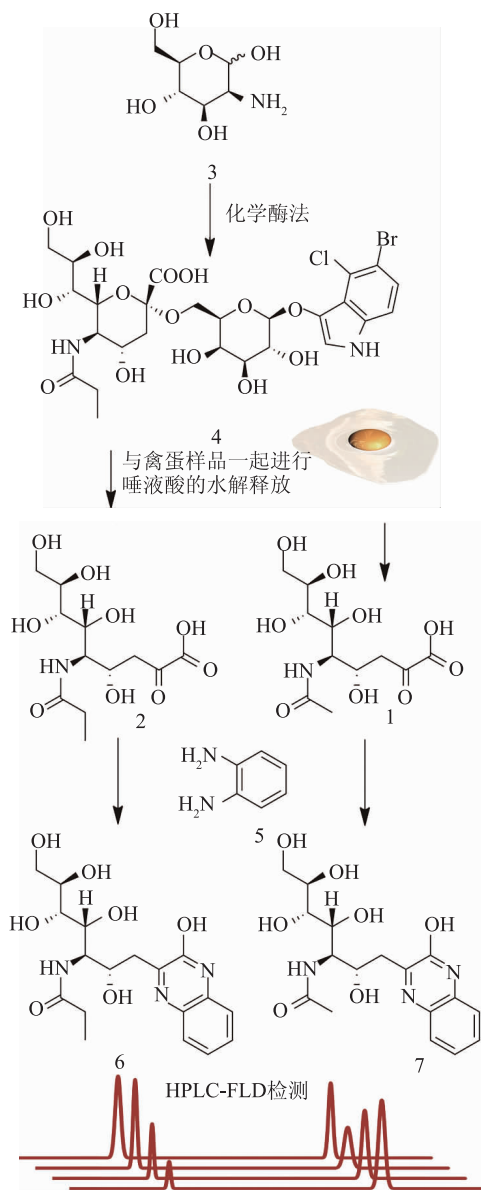


图1 以甘露糖胺为底物化学酶法合成 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 及其作为内标检测禽蛋样品中 Neu5Ac 含量的流程图

Fig.1 The route of synthesis of X-Gal- α -2,6-Neu5Prop from mannosamine and determination of Neu5Ac content in poultry egg samples
注:1:Neu5Ac;2:Neu5Prop;3:甘露糖胺;
4:X-Gal- α -2,6-Neu5Prop;5:邻苯二胺;
6:邻苯二胺标记的 Neu5Prop;7:邻苯二胺标记的 Neu5Ac。

对纯化后的 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)检测后,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-ToF-MS)对这两种物质进一步验证以确定其准确性。质谱检测参数:电喷雾离子源,脱溶剂管温度 250 $^{\circ}$ C,雾化器流速 3 L/min,干燥器流速 15 L/min。MALDI-ToF-MS 质谱条件为:离子加速电压 20 kV,质荷比扫描范围 m/z 300~1500,采集数据所用激光的能量为 6000,采用 Bruker Flexanalysis 3.3 分析软件对质谱数据进行处理。

1.2.2 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-

Neu5Prop 水解特性研究 为了确定生物样品中唾液酸糖缀合物解离为游离唾液酸的最佳反应时间,并进一步验证 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 能否作为禽蛋 Neu5Ac 定量检测的合适内标物,本文研究了 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 在酸性条件下的水解特性。分别取 4、20、100 μ L 1.2.1 中合成的 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 或 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 溶液 (0.4 mmol/L), 醋酸溶液 (100 μ L, 2 mol/L) 和水 (总体积 200 μ L) 加入到 1.5 mL 离心管中, 80 $^{\circ}$ C 水浴下进行反应。在反应 0、10、20、30、60、90、120、150、180 min 时分别取 4 μ L 反应上清液, 冰浴并用水稀释至 20 μ L 过滤膜, 采用 HPLC 检测不同时间点的样品。高效液相色谱检测条件与 1.2.1.3 中相同。并根据下列公式计算水解程度:

水解程度 (%) = (水解前的样品量 - 水解后的样品量) / 水解前的样品量 \times 100

1.2.3 Neu5Ac 和 Neu5Prop 在酸性条件下的稳定性研究 为了检验唾液酸在酸性条件下的稳定性, 将 1.2.1.1 中合成的 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 或 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac (4 μ L, 0.4 mmol/L), 冰醋酸 (100 μ L, 2 mol/L) 和水 (96 μ L) 混匀后于 80 $^{\circ}$ C 水浴中反应, 在反应 0、10、30 min, 1、2、3、4、5、6、8、10、12、15 h 时取反应上清液并迅速冰浴冷却以终止反应, 将反应上清液减压真空浓缩干燥 (28 Pa, 1500 r/min, 常温) 并参照 1.2.6 中描述的方法进行检测。

1.2.4 Neu5Ac 和 Neu5Prop 的浓度与色谱峰面积之间的线性关系考察 为了考察分析方法的准确性, 本文研究了不同浓度的 Neu5Ac 和 Neu5Prop 与色谱峰面积之间的线性关系。将 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 或 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 分别溶于 2 mol/L 醋酸溶液中配制成 1、2、2.5、5、10、15、20、40、60、80、100 μ mol/L 的唾液酸衍生物, 将配制好的溶液置于 80 $^{\circ}$ C 水浴上加热 3 h 后, 迅速冰浴冷却以终止反应, 将反应液减压真空浓缩干燥 (28 Pa, 1500 r/min, 常温) 并参照 1.2.6 中描述的方法进行检测。

1.2.5 禽蛋样品中 Neu5Ac 的解离与定量检测 将蛋黄与蛋清分离, 称取 20 mg 蛋黄或蛋清溶于 1 mL 醋酸溶液 (2 mol/L) 中, 从中取出 100 μ L 加入 4 μ L X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 水溶液 (0.4 mmol/L) 和 96 μ L 水。将反应体系置于 80 $^{\circ}$ C 水浴中加热 3 h。反应结束后迅速将水解样品冰浴冷却以终止反应, 离心后 (12000 g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) 取 500 μ L 上清液减压真空浓缩干燥 (28 Pa, 1500 r/min, 常温) 并参照 1.2.6 中描述的方法进行检测 (流程如图 2 所示), 并根据下列公式计算禽蛋样品中 Neu5Ac 的含量:

$$C_{\text{Neu5Ac}} = \text{RMM}_{\text{Neu5Ac}} \frac{P_{\text{Neu5Ac}} N_{\text{Neu5Prop}}}{P_{\text{Neu5Prop}} M_{\text{sample}}}$$

其中, C_{Neu5Ac} 表示 Neu5Ac 的含量, mg/g; $\text{RMM}_{\text{Neu5Ac}}$ 表示 Neu5Ac 的相对分子质量 309.27 g/mol; N 表示样品中 Neu5Prop 的摩尔质量 1.6 nmol; M 表示样品质量, g; P 表示峰面积。

1.2.6 唾液酸的荧光衍生与检测 将上述经真空干燥的游离唾液酸复溶在 100 μ L 0.1 mol/L 的氯化钠溶液中, 离心 (12000 \times g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) 后取 50 μ L 上

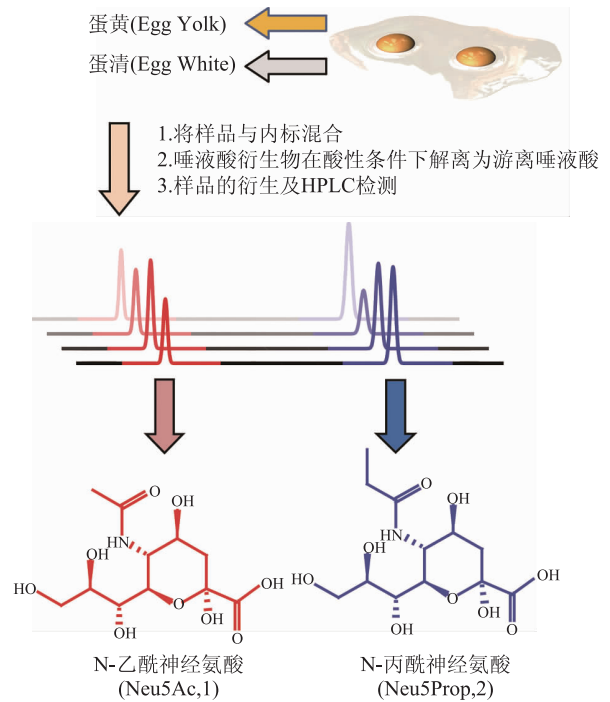


图2 以 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 为内标检测禽蛋样品中 Neu5Ac 的含量

Fig.2 Determination of Neu5Ac in eggs by X-gal- α -2,6-neu5prop as internal standard

清加入 10 μ L OPD 衍生试剂 (10 mg/mL 邻苯二胺 (OPD) 溶于 0.2 mol/L NaHSO_3 溶液), 置于 80 $^{\circ}$ C 水浴中避光反应 40 min。

采用 HPLC-FLD 对衍生后的唾液酸样品进行检测。反相色谱柱: Phenomenex Hyperclone 5 μ m ODS C_{18} , 250 mm \times 4.60 mm。荧光激发波长 Ex 为 373 nm, 发射波长 Em 为 448 nm, 进样量 10 μ L。流动相 A 为纯净水, 流动相 B 为色谱纯乙腈, 流动相 C 为色谱纯甲醇, 总流速为 1.0 mL/min, 梯度洗脱时间为 22 min。洗脱程序如下: 流动相 A: B: C 的初始比例为 90: 5: 5, 10 min 内流动相比比例逐渐变为 76: 12: 12, 然后 2 min 内流动相比比例变为 20: 40: 40, 并在此浓度保持 10 min。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel Office 2010 数据整理, 绘图软件采用 Adobe illustrator 进行色谱图绘制。

2 结果与分析

2.1 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的合成、纯化与检测

酶法合成的 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 以及化学酶法合成的 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop, 经 C_{18} 固相萃取柱初提纯后再经硅胶柱二次纯化。纯化后的 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 与 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 经 HPLC 检测, 结果如图 3A 中所示, X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 与 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的保留时间均在 7 min 左右, 采用 LC-MS 对其进行验证, 提取在负离子模式下的离子流图, 结果如图 3B 中所示, X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 的质荷比 (m/z) 为 697.06 ($[M-H]^-$), 与理论值 697.14 ($[M-H]^-$, 84%) 相

符。X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的质荷比 (m/z) 为 711.08 ($[M-H]^-$), 与理论值 711.18 ($[M-H]^-$, 77%) 一致。采用 MALDI-ToF-MS 对 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 与 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 进一步验证, 结果如图 3C 和 3D 所示, 检测结果均与理论值相符。因此, 本研究成功合成并得到了 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 与 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的纯品。

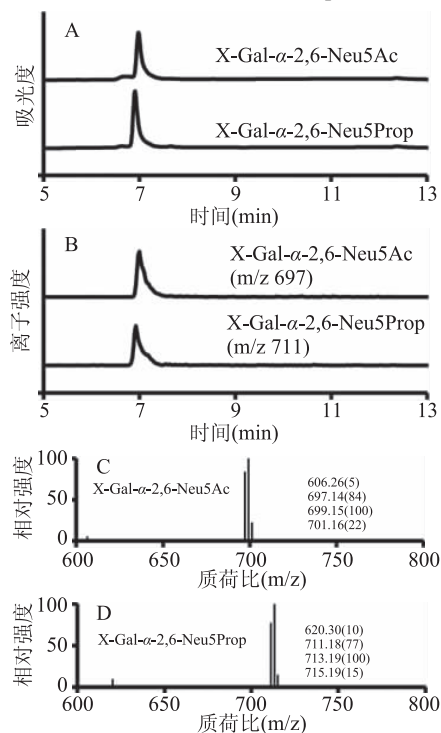


图3 X-Gal-唾液酸的 HPLC-MS 谱图和 MALDI-ToF-MS 谱图

Fig.3 The HPLC-MS profiling and MALDI-ToF-MS profiling of the X-Gal-sialoside

注: A: X-Gal-唾液酸的液相色谱图; B: X-Gal-唾液酸的质谱提取离子流图; C: X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 的 MALDI-ToF-MS 谱图; D: X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的 MALDI-ToF-MS 谱图。

2.2 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 的水解特性研究

本研究以酶法合成的 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 作为生物样品中唾液酸糖缀合物的模型, 以化学酶法合成的 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 为内标物, 研究了 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 在酸性条件下的水解特性。将不同样品量的 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 在 2 mol/L 的醋酸溶液中 80 °C 的水解条件下反应, 取反应 0、10、20、30、60、90、120、150、180 min 时的反应上清液冰浴、稀释并过滤膜后用 HPLC 进行分析。研究结果如图 4 所示, 不同样品量的唾液酸衍生物在 60 min 内水解速率较快, 唾液酸衍生物的解离程度与反应时间成正比。90 min 后能完全转化为相应的游离唾液酸。因此, 相同样品量的生物样品中唾液酸糖缀合物在 2 mol/L 的醋酸溶液中、80 °C 的水解条件下, 90 min 即可完全转化为游离的唾液酸。

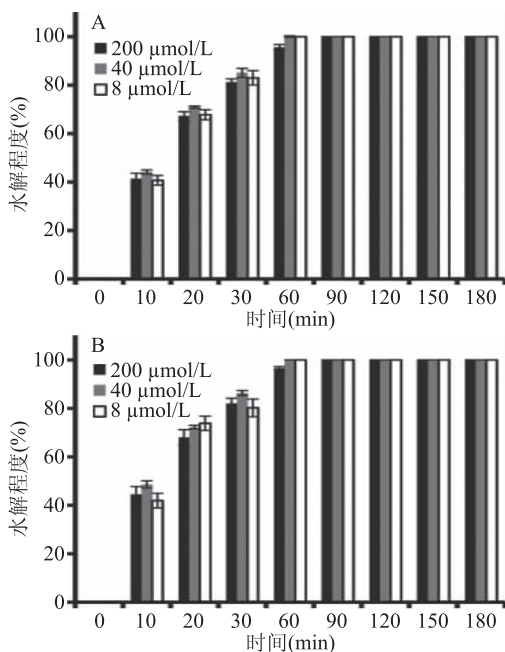


图4 底物浓度和水解时间对 X-Gal-唾液酸水解程度的影响

Fig.4 Effects of substrate concentration and time on the extent of the hydrolysis of X-Gal- α -2,6-sialoside

注: $n=3$; A: X-Gal- α -2,6-Neu5Ac; B: X-Gal- α -2,6-Neu5Prop。

2.3 Neu5Ac 和 Neu5Prop 在酸性条件下的稳定性分析

在样品处理和衍生过程中, 分析物与内标的稳定性十分重要。因此本文研究了 Neu5Ac 和 Neu5Prop 在酸性条件下的稳定性。前期研究结果显示唾液酸衍生物如脱氨基神经氨酸 (KDN) 在酸性条件下的稳定性与 Neu5Ac 相比明显较差^[16,26]。为了评估这一特性, 将 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 分别溶于 2 mol/L 醋酸溶液中并在 80 °C 下 (与禽蛋样品中唾液酸的水解条件相同) 反应, 游离唾液酸经 OPD 衍生后采用 HPLC 进行分析。结果如图 5 所示, Neu5Ac 和 Neu5Prop 在 10 h 内表现出相似的稳定性, 反应 10 h 后, 游离唾液酸的量随水解时间的延长呈逐渐下降的趋势。从图 5B 中可以看出, 水解 3 h 后 Neu5Prop 的量随着水解时间的延长不再继续升高, 因此 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 在水解 3 h 后能完全解离为游离的 Neu5Prop。

2.4 底物浓度与峰面积之间的线性关系的考察

为了考察分析方法的准确性以及灵敏度, 采用高效液相色谱对已知浓度的 Neu5Ac 和 Neu5Prop (从 X-Gal- α -2,6-唾液酸的定量水解得到) 与峰面积之间的线性关系进行考察。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归分析, 结果如图 6 所示。Neu5Ac 和 Neu5Prop 在 1~100 μ mol/L 的浓度范围内均呈线性关系。

2.5 禽蛋中唾液酸含量的定量测定

本研究采用内标法检测了 9 种禽类蛋黄和蛋清中 Neu5Ac 的含量 (如表 1 所示)。游离唾液酸经荧光标记物 OPD 衍生后采用 HPLC-FLD 进行检测, MS

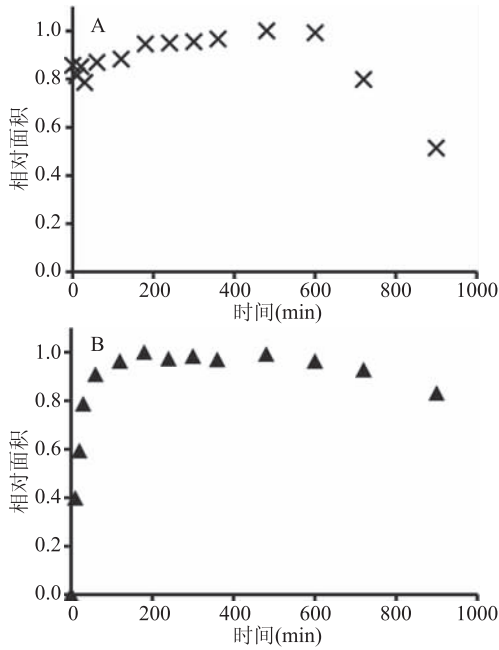


图5 唾液酸水解条件下 Neu5Ac 和 Neu5Prop 的稳定性
Fig.5 Stability of Neu5Ac and Neu5Prop under sialic acid-releasing conditions
注:A: Neu5Ac; B: Neu5Prop。水解物质为 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop。

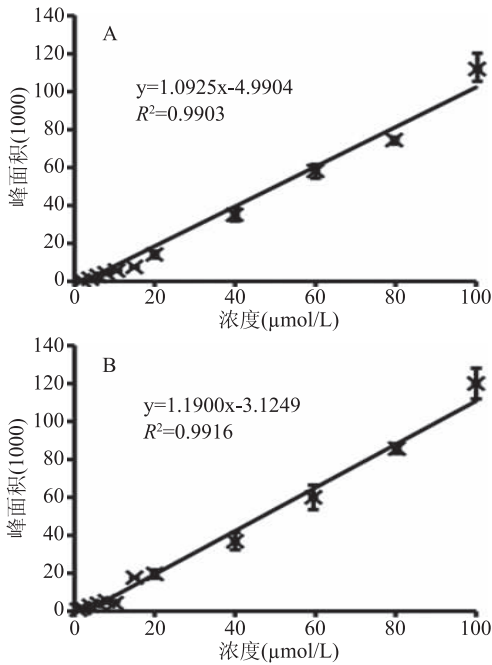


图6 底物浓度与峰面积之间的线性回归分析(n=3)
Fig.6 The linear regression analysis between substrate concentration and peak area(n=3)
注:A: Neu5Ac; B: Neu5Prop。

结果显示 m/z 382.0 ($[Neu5Ac-OPD+H]^+$)、396.0 ($[Neu5Prop-OPD+H]^+$) 均与理论值相符,验证了液相色谱中 9.1 和 11.8 min 的色谱峰分别为 Neu5Ac 和 Neu5Prop 的色谱峰(如图 7 所示)。研究结果显示蛋清中 Neu5Ac 的含量在相同物种之间相差不大,但在不同物种之间表现出很大的差异。鹌鹑蛋清中

Neu5Ac 的含量最低(0.13 mg/g),而鸵鸟蛋清中的最高(2.20 mg/g),比鹌鹑蛋清 Neu5Ac 含量高出近 17 倍。蛋黄中 Neu5Ac 含量的差异较小,鸡蛋黄中含量为 0.88 mg/g,鸵鸟蛋黄中含量为 0.94 mg/g。检测到鸡蛋中唾液酸的含量与已报道的结果(蛋黄中 0.95 mg/g,蛋清中 0.1 mg/g)一致^[19]。而乌鸡蛋黄和蛋清中 Neu5Ac 的含量与已报道的含量(蛋黄为 7.1 mg/g,蛋清为 0.49 mg/g)相比较低,今后需进一步研究种间变异对检测值造成的影响。

表1 不同种类禽蛋蛋清和蛋黄中 Neu5Ac 含量(n=3)
Table 1 The content of Neu5Ac in egg whites and egg yolks of different species of bird(n=3)

物种	Neu5Ac 含量(mg/g)	
	蛋清	蛋黄
鸡	0.28 ± 0.05	0.88 ± 0.03
鸭	0.28 ± 0.04	0.71 ± 0.06
灰鹅	1.30 ± 0.20	0.81 ± 0.06
珍珠鸡	0.35 ± 0.01	0.72 ± 0.02
鸵鸟	2.20 ± 0.10	0.94 ± 0.03
鸽子	1.03 ± 0.06	0.75 ± 0.01
鹌鹑	0.13 ± 0.02	0.89 ± 0.06
乌鸡	0.18 ± 0.04	0.65 ± 0.06
火鸡	0.80 ± 0.10	0.75 ± 0.09

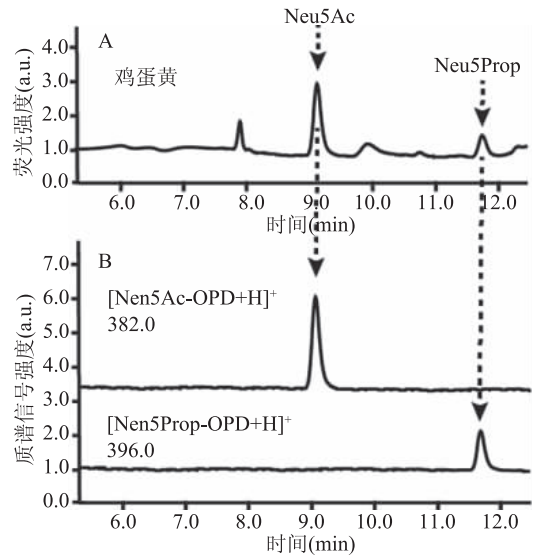


图7 鸡蛋黄中 Neu5Ac 和内标物 Neu5Prop 的定性测定
Fig.7 Qualitative determination of Neu5Ac and Neu5Prop in egg yolk

注:A: HPLC-FLD 色谱图; B: ESI-MS 质谱图。

实验以化学酶法合成的 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 为内标,消除了基质效应对检测结果造成的影响,实现了对禽类蛋清蛋黄中 Neu5Ac 的准确定量。基质效应通常是指样品在提取或在前处理中引入的其他杂质对检测的选择性和灵敏度造成的影响,进而影响到分析方法的准确度。内标法^[27]、基质添加标准曲线法^[28]和优化前处理条件^[29]等方法有效消除基质效应的方法。内标定量法是通过测量内标物与目标组分的峰面积的相对值来进行计算,在

一定条件下消除了前处理条件变化等所引起的误差,测定结果较为准确。采用内标法消除基质效应时,应选择合适的内标物,本研究中用到的内标物 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 经酸水解为游离的 Neu5Prop,该物质与被检测物质 Neu5Ac 的结构相似,仅单个侧链基团不同。因此,在液相色谱中与被检测物质有相似的响应值,可减小检测过程中带来的误差。但 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 不适用于分析样品中含有两种以上与被分析物与不可分离的唾液酸^[30]。Cai 等^[17]应用同位素标记的唾液酸衍生物作为内标物实现了肉类和禽蛋中唾液酸含量的准确测定,但是同位素标记的内标物价格昂贵且不易获取。因此,选择合适的内标物至关重要。

3 结论

本研究采用化学酶法成功地合成了非天然唾液酸衍生物 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop,对该衍生物在酸性水解条件下水解特性以及稳定性进行了考察。并以该衍生物为内标结合高效液相色谱测定了鹌鹑、鹅、珍珠鸡、鸵鸟、鸭、鸽子、火鸡等 9 种禽类蛋黄和蛋清中 Neu5Ac 的含量。研究表明,相同浓度的 X-Gal- α -2,6-Neu5Ac 和 X-Gal- α -2,6-Neu5Prop 在 2 mol/L 的醋酸溶液 80 °C 的水解条件下水解程度相当,90 min 后能够完全转化为游离的唾液酸。Neu5Ac 和 Neu5Prop 在 10 h 时仍保持相似的稳定性。蛋清中 Neu5Ac 的含量在相同物种之间相差不大但在不同物种之间表现出很大的差异。鹌鹑蛋清中 Neu5Ac 的含量最低(0.13 mg/g),而鸵鸟蛋清中的最高(2.20 mg/g),比鹌鹑蛋清 Neu5Ac 含量高近 17 倍。鸡蛋蛋黄与蛋清中 Neu5Ac 含量与之前报道的结果一致^[19]。本研究涉及的分析方法可行性高,易于操作,重复性强。因此,适于食品和生物样品的常规分析。

参考文献

[1] Traving C, Schauer R. Structure, function and metabolism of sialic acids [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1998, 54 (12): 1330-1349.

[2] Lamari F N, Karamanos N K. Separation methods for sialic acids and critical evaluation of their biologic relevance [J]. Journal of Chromatography B, 2002, 781 (1/2): 3-19.

[3] Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: An evolutionary perspective [J]. Chemical Reviews, 2002, 102 (2): 439-470.

[4] Cohen M, Varki A. The sialome—far more than the sum of its parts [J]. Omics: A Journal of Integrative Biology, 2010, 14 (4): 455-464.

[5] Okerblom J, Varki A. Biochemical, cellular, physiological, and pathological consequences of human loss of N-glycolylneuraminic acid [J]. Chem Bio Chem, 2017, 18 (13): 1155-1171.

[6] Schauer R. Sialic acids: Fascinating sugars in higher animals and man [J]. Zoology, 2004, 107 (1): 49-64.

[7] Siebert H C, Kaptein R, Beintema J J, et al. Carbohydrate-protein interaction studies by laser photo CIDNP NMR methods

[J]. Glycoconjugate Journal, 1997, 14 (4): 531-534.

[8] Zheng F, Du Y M, Lin X S, et al. N-glycosylation plays an essential and species-specific role in anti-infection function of milk proteins using *Listeria monocytogenes* as model pathogen [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67 (38): 10774-10781.

[9] Wu C X, Xia L, Liu L J, et al. A sensitive and efficient method for determination of N-acetylhexosamines and N-acetylneuraminic acid in breast milk and milk-based products by high-performance liquid chromatography via UV detection and mass spectrometry identification [J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1011: 14-23.

[10] Bratosin D, Mazurier J, Tissier J P, et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review [J]. Biochimie, 1998, 80 (2): 173-195.

[11] 刘志东, 王荫榆, 郭本恒, 等. 唾液酸的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2010, 31 (4): 368-373.

[12] Wang F, Xie B Y, Wang B, et al. LC-MS/MS glycomic analyses of free and conjugated forms of the sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in human throat cancers [J]. Glycobiology, 2015, 25 (12): 1362-1374.

[13] Wang B, Miller J B, McNeil Y, et al. Sialic acid concentration of brain gangliosides: Variation among eight mammalian species [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1998, 119 (1): 435-439.

[14] Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1959, 234 (8): 1971-1975.

[15] Koketsu M, Sakuragawa E, Linhardt R J, et al. Distribution of N-acetylneuraminic acid and sialylglycan in eggs of the Silky fowl [J]. British Poultry Science, 2003, 44 (1): 145-148.

[16] Yao H L, Conway L P, Wang M M, et al. Quantification of sialic acids in red meat by UPLC-FLD using indoxylsialosides as internal standards [J]. Glycoconjugate Journal, 2016, 33 (2): 219-226.

[17] Cai Z, Conway L P, Huang Y Y, et al. Enzymatic synthesis of trideuterated sialosides [J]. Molecules, 2019, 24 (7): 1368.

[18] Cao C, Wang W J, Huang Y Y, et al. Determination of sialic acids in liver and milk samples of wild-type and CMAH knock-out mice [J]. Journal of Visualized Experiments, 2017 (125): e56030.

[19] Juneja L R, Koketsu M, Nishimoto K, et al. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane [J]. Carbohydrate Research, 1991, 214 (1): 179-186.

[20] Koketsu M, Juneja L R, Kawanami H, et al. Preparation of N-acetylneuraminic acid from delipidated egg yolk [J]. Glycoconjugate Journal, 1992, 9 (2): 70-74.

[21] Hatta H, Kapoor M P, Juneja L R. Bioactive components in egg yolk [M] // Egg Bioscience and Biotechnology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.: 185-237.

[22] Both P, Riese M, Gray C J, et al. Applications of a highly α 2,6-selective pseudosialidase [J]. Glycobiology, 2018, 28 (5): 261-268.

[23] Reyes Martínez J E, Šardžik R, Voglmeir J, et al. Enzymatic

Science, 2019, 153(7):19-25.

[8] Lauren Anne Van Rooyen, Paul Allen, Sarah M Crawley, et al. The effect of carbon monoxide pretreatment exposure time on the colour stability and quality attributes of vacuum packaged beef steaks[J]. Meat Science, 2017, 129(7):74-80.

[9] Fu X, Hayat K, Li Z, et al. Effect of microwave heating on the low-salt gel from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 27(2):301-308.

[10] Li K, Kang Z L, Zou Y F, et al. Effect of ultrasound treatment on functional properties of reduced-salt chicken breast meat batter[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(5):2622-2633.

[11] Grossi A, Olsen K, Bolumar T, et al. The effect of high pressure on the functional properties of pork myofibrillar proteins[J]. Food Chemistry, 2016, 196:1005-1015.

[12] Jeehwan Choe, Juri Lee, Kyung Jo, et al. Application of winter mushroom powder as an alternative to phosphates in emulsion-type sausages[J]. Meat Science, 2018, 143(9):114-118.

[13] Jia D, You J, Hu Y, et al. Effect of CaCl_2 on denaturation and aggregation of silver carp myosin during setting[J]. Food Chemistry, 2015, 185:212-218.

[14] Guo X Y, Peng Z Q, Zhang Y W, et al. The solubility and conformational characteristics of porcine myosin as affected by the presence of L-lysine and L-histidine[J]. Food Chemistry, 2015, 170:212-217.

[15] Chen X, Chen C G, Zhou Y Z, et al. Effects of high pressure processing on the thermal gelling properties of chicken breast myosin containing κ -carrageenan[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 40:262-272.

[16] Sun J X, Wu Z, Xu X L, et al. Effect of peanut protein isolate on functional properties of chicken salt-soluble proteins from breast and thigh muscles during heat-induced gelation[J]. Meat Science, 2012, 91(1):88-92.

[17] Zhou Y Z, Chen C G, Chen X, et al. Contribution of three ionic types of polysaccharides to the thermal gelling properties of chicken breast myosin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(12):2655-2662.

[18] Liu J H, Wang X P, Ding Y T. Optimization of adding

(上接第34页)

synthesis of colorimetric substrates to determine α -2,3- and α -2,6-specific neuraminidase activity[J]. RSC Advances, 2013, 3(44):21335.

[24] Wang S, Laborda P, Lu A, et al. N-acetylglucosamine 2-epimerase from *Pedobacter heparinus*: First experimental evidence of a deprotonation/reprotonation mechanism[J]. Catalysts, 2016, 6(12):212.

[25] Huang K, Wang M M, Kulnich A, et al. Biochemical characterisation of the neuraminidase pool of the human gut symbiont *Akkermansia muciniphila*[J]. Carbohydrate Research, 2015, 415:60-65.

[26] Maurer U, Neumann U, Šoštarić K, et al. S19.11 Different distribution of glycosphingolipids in mouse and rabbit skeletal muscle demonstrated by biochemical and immunohistological

konjacglucmannan to improve gel properties of low-quality surimi[J]. Carbohydrate Polymers, 2013(92):484-489.

[19] Takahashi K, Kurose K, Okazaki E, et al. Effect of various protease inhibitors on heat-induced myofibrillar protein degradation and gel-forming ability of red tilapia (*Branchiostegus japonicus*) meat[J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 68:717-723.

[20] Jeong J Y, Jeong T C, Yang H S, et al. Multivariate analysis of muscle fiber characteristics, intramuscular fat content and fatty acid composition in porcine longissimus thoracis muscle[J]. Livestock Science, 2018, 202:13-20.

[21] Custodio F B, Vasconcelos-Neto M C, Theodoro K H, et al. Assessment of the quality of refrigerated and frozen pork by multivariate exploratory techniques[J]. Meat Science, 2018, 139:7-14.

[22] Derek F Keenan, Juan Valverde, Ronan Gormley, et al. Selecting apple cultivars for use in ready-to-eat desserts based on multivariate analyses of physicochemical properties[J]. LWT - Food Science and Technology, 2012, 48(2):308-315.

[23] Gaoliang Bao, Li Zhang, Baozhong Sun, et al. The correlation research on yak meat texture profile analysis (TPA) and freshness parameters during refrigerated storage[J]. Food Processing & Technology, 2015, 1(4):94-102.

[24] Geöcze K C, Barbosa L C A, Fidêncio P H, et al. Essential oils from pequi fruits from the Brazilian Cerrado ecosystem[J]. Food Research International, 2013, 54(1):1-8.

[25] 赵光辉. 食用胶对熏煮香肠品质的影响研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014.

[26] Isa dos S B, Geysa B B, Gabriel L dos S, et al. Multivariate data analysis of trace elements in bivalve molluscs: Characterization and food safety evaluation[J]. Food Chemistry, 2019, 273(2):64-70.

[27] Ankit P, Nigel P B, Gerard D, et al. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify fruits and vegetables commonly consumed in Ireland based on *in vitro* antioxidant activity[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24(2):250-256.

analyses[J]. Glycoconjugate Journal, 1993, 10(4):337.

[27] Kloepfer A, Quintana J B, Reemtsma T. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1067(1/2):153-160.

[28] 刘敏, 刘戎, 王立琦, 等. 猪肝中 β -受体激动剂多残留的样品前处理方法比较及同时检测[J]. 分析测试学报, 2012, 31(3):290-295.

[29] 贾彦波, 王清清, 宋海峰. 高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MSⁿ)分析生物样品时的基质效应研究[J]. 军事医学, 2011, 35(2):149-152.

[30] Schauer R. Achievements and challenges of sialic acid research[J]. Glycoconjugate Journal, 2000, 17(7/8/9):485-499.