

软骨素酶 ABC 酶解-高效液相色谱法测定鱼翅中的透明质酸

鲍伦军¹, 杨建成², 何振华², 杨晓云³, 梁伟大¹

(1. 广州出入境检验检疫局, 广东 广州 510623; 2. 江门出入境检验检疫局, 广东 江门 529051;
3. 华南农业大学资源与环境学院, 广东 广州 510640)

摘要 建立了一种测定鲨鱼翅中透明质酸的酶解-高效液相色谱方法。在 37 °C 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液中, 鱼翅中的透明质酸被硫酸软骨素酶 ABC 酶解成透明质酸二糖。色谱条件为 ZORBAX 糖分析柱(4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 紫外检测波长 226 nm, 流动相为乙腈-0.5% 磷酸(体积比为 2:98), 流速 1 mL/min, 进样量 10 μL。透明质酸二糖的线性范围为 25 g/L~600 g/L。将此法应用到鱼翅的实际样品检测中, 取得了良好的结果, 透明质酸在鱼翅样品中的质量分数为 0.86%~1.96%。

关键词 高效液相色谱法 软骨素酶 ABC 酶解 透明质酸 鱼翅

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2002)06-0557-03

Zymohydrolysis with Chondroitinase ABC and High Performance Liquid Chromatography Used for the Determination of Hyaluronic Acid in Shark Fin

BAO Lun-jun¹, YANG Jian-cheng², HE Zhen-hua², YANG Xiao-yun³, LIANG Wei-da¹,

(1. Guangzhou Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China;

2. Guangzhou Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Jiangmen 529051, China;

3. College of Resource and Environment, South China Agriculture University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A method for the determination of hyaluronic acid in shark fin by high performance liquid chromatography (HPLC) is described. At 37 °C, with 0.2 mol/L Tris-HCl buffer solution, hyaluronic acid was converted to the hyaluronic acid disaccharide by zymohydrolysis with chondroitinase ABC. The chromatographic conditions were as follows: ZORBAX carbohydrate analysis column (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm); room temperature; UV-VIS detector set at 226 nm; mobile phase V(acetonitrile): V(0.5% phosphoric acid) = 2:98; 0.45 μm filter membrane, pumping filter; injection volume 10 μL; flow rate 1 mL/min. The calibration curve for the hyaluronic acid disaccharide was linear over the range of 25 g/L - 600 g/L. This method was applied to the analysis of shark fin with satisfactory results. The hyaluronic acid contents in different shark fins were from 0.86% to 1.96%.

Key words: high performance liquid chromatography; chondroitinase ABC; zymohydrolysis; hyaluronic acid; shark fin

透明质酸(hyaluronic acid, HA)又名玻璃酸, 是一种大分子酸性粘多糖, 广泛地存在于生物体的结缔组织中, HA 具有许多重要的生理功能, 如润滑作用、保水作用, 它还可以改变物质在皮肤中的扩散速率, 参与水和电解质等的运输。HA 是以葡糖醛酸-N-乙酰氨基葡糖为双糖重复单元所组成的直链多聚糖, HA 分子链的长度及相对分子质量是不均一的, 相对分子质量范围一般为 $2 \times 10^5 \sim 7 \times 10^6$, 双糖单元数为 300~1 100 对, 属于生物大分子^[1, 2]。鱼

翅是一种高档营养品, 它是由各种鲨鱼的鳍加工而成的淡干品, 除含有丰富的氨基酸和人体必需的矿物质外, 还含有少量的 HA。由于不同相对分子质量的 HA 都可被硫酸软骨素酶 ABC 定量酶解成相同的透明质酸二糖^[3, 4], 因此可据此来测定 HA 的含量。本文正是利用 HA 的这一性质通过高效液相色谱法对鱼翅中的 HA 进行了测定。本方法测定对象单一, 其他物质对测定不构成干扰, 准确度和精密度都较好, 通过分析 9 种具有代表性的鱼翅产品, 所得

收稿日期 2002-03-05

作者简介 鲍伦军, 男, 1967 年生, 博士, 高级工程师, 研究方向为色谱分析、流动注射分析、化学计量学、生物降解等, Tel (020) 38290355, Fax (020) 38290325, E-mail jlbao98@163.net.

基金项目 广东出入境检验检疫局重点科研项目(9903K).

结果令人满意,测得其 HA 的质量分数为 0.86%~1.96%。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

配置紫外可见检测器的 HP-1100 型高效液相色谱仪(美国惠普公司);DU-600 型紫外扫描仪(瑞士 Beckman 公司);透明质酸、透明质酸二糖、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、胶原酶、木瓜蛋白酶、软骨素酶 ABC 均为 Sigma 产品;乙腈为色谱纯;二次蒸馏水;其他所用试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX 糖分析柱(4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μ m);检测器及检测波长:紫外可见检测器,226 nm;流动相 V(乙腈):V(0.5%磷酸)=2:98;用 0.45 μ m 滤膜抽吸过滤;进样量 10 μ L;流速 1 mL/min;室温下分析。

1.3 溶液的配制

透明质酸二糖标准储备液的配制:准确称取标准品,用 0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲溶液溶解,稀释定容为 1 g/L 的标准储备液,于冰箱中存放。实验时,其他浓度的标准液均由此溶液用 0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)稀释而成。其他所用溶液均按常规方法配制而成。

1.4 鱼翅中透明质酸的提取

取鱼翅样品 5 克,剪碎,用玛瑙研钵研成粉末,加入丙酮 30 mL,摇匀浸泡 5 min,倾出丙酮,经乙醚洗涤后抽空干燥。准确称取干燥后的样品 100 mg 放入 5 mL 1 mol/L NaOH 中浸泡并在 4 $^{\circ}$ C 下过夜。浸泡过夜后的样品用 1 mol/L HCl 中和后,水浴煮沸约 5 min,冷却定容至 10 mL,从中取出 1 mL 和 0.2 mL 含 10 g/L 胶原酶的 0.05 mol/L Tris-HAc 混合,37 $^{\circ}$ C 下保温 3 h。加入 0.2 mL 含 10 g/L 木瓜蛋白酶的 0.01 mol/L Tris-Ac 45 $^{\circ}$ C 下再保温 12 h。

然后加入 1.5 mL 的 50 mmol/L 乙酸(含 150 g/L NaCl),再将溶液煮沸 5 min。以 3 500 r/min 的速率离心 15 min,上清液用 0.25 mol/L NaOH 中和,然后加入 9 mL 无水乙醇并将溶液置于 4 $^{\circ}$ C 下过夜。第二天取出溶液,以 3 500 r/min 的速率离心 15 min,所得沉淀用丙酮约 3 mL 洗涤摇荡,再离心沉淀 10 min,倾出丙酮,沉淀用氮气吹干,得透明质酸粗品。

1.5 透明质酸的酶解

把“1.4”节处理所得透明质酸粗品用 1 mL 0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)溶液溶解,然后和 0.5 mL 250 g/L 软骨素酶 ABC 溶液混合,37 $^{\circ}$ C 下放置 3 h,过滤后按上述色谱条件分析,外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的确定

取透明质酸二糖标准贮备液适量,以 0.2 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液为参比,用 1 cm 的比色皿扫描测定 180 nm~600 nm 的紫外可见吸收曲线,得到化合物的紫外可见光谱。透明质酸二糖的最大吸收在 226 nm,因此本实验选择 226 nm 为透明质酸二糖的检测波长。

2.2 流动相的选择

采用 ZORBAX 糖分析柱试验了不同组成的甲醇-水(或体积分数不同的磷酸溶液)和乙腈-水流动相对样品中透明质酸二糖的分离及峰形的影响,结果以乙腈-0.5%磷酸(体积比为 2:98)作流动相效果最好,不仅峰形对称,而且和其他组分完全分离,因此以乙腈和 0.5%磷酸作为最佳流动相。图 1 是透明质酸二糖标准品和样品的色谱图。

2.3 透明质酸二糖的线性关系分析

将 1 000 g/L 透明质酸二糖标准溶液稀释为 600 g/L,500 g/L,400 g/L,300 g/L,200 g/L,100 g/L,50 g/L 和 25 g/L,在选定的色谱条件下,由低浓度向高浓度分别进样分析($n=3$),测得其峰面积与峰

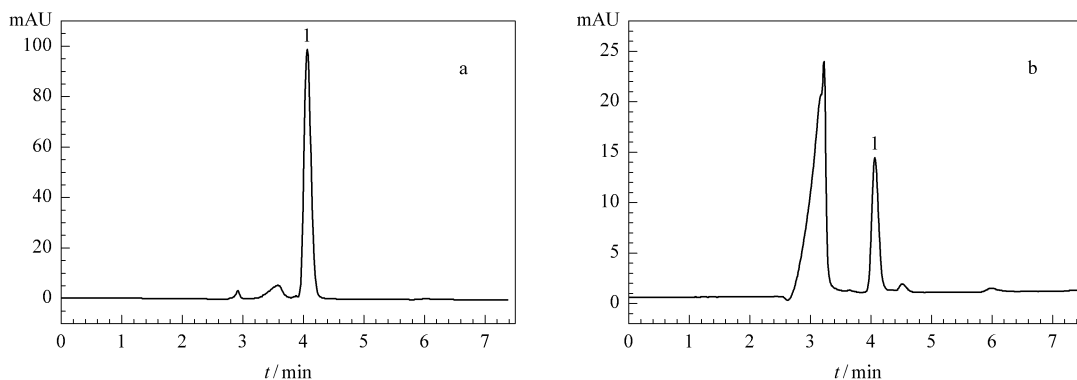


图 1 透明质酸二糖标样(a)和样品(b)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of hyaluronic acid disaccharide standard (a) and a shark fin sample (b)

1. hyaluronic acid disaccharide.

高。将峰面积 (Y) 与标样的质量浓度 (X , g/L) 作线性回归, 得回归方程为 $Y = 21.27X + 1.06$, 线性相关系数为 0.9999, 可见透明质酸二糖的质量浓度为 25 g/L~600 g/L 时与对应峰面积成良好线性关系; 而透明质酸二糖的质量浓度与对应峰高的线性关系不太好, 因此只宜用峰面积进行定量分析。

2.4 透明质酸的含量与其酶解处理后透明质酸二糖含量的关系分析

取透明质酸标准品按“1.4”节方法进行处理再检测其中的透明质酸二糖, 得出透明质酸的质量 A (mg) 与透明质酸二糖的质量 B (mg) 有如下关系, 即 $A = 1.02B$, 因此通过测定样品中的透明质酸二糖的质量便可计算出透明质酸的质量。

2.5 精密度和回收率

在选定的检测条件下, 分别对透明质酸二糖标样和样品平行测定 6 次, 测得透明质酸二糖标样峰面积的相对标准偏差为 2.5%, 样品峰面积的相对标准偏差为 3.2%, 结果令人满意。在测定样品中加入已知量的透明质酸二糖标样, 测得添加 50 g/L, 125 g/L 和 250 g/L 的回收率分别为 93.8%,

96.9% 和 97.5%。

2.6 鱼翅样品分析结果

按本方法对广东江门地区加工生产的 9 种鱼翅产品进行了透明质酸所占质量分数的分析, 结果分别为 1.23%, 1.02%, 0.92%, 1.62%, 0.86%, 0.95%, 1.96%, 1.15% 和 1.12%。

参考文献:

- [1] QIAN Wan-ying, SHI Tang-chun, ZHOU Ming-xia, WANG Feng-song, WANG Dong-mei. Journal of Biology, 1999, 16(6): 19
钱万英, 石堂春, 周明霞, 王峰松, 王冬梅. 生物学杂志, 1999, 16(6): 19
- [2] CHEN Peng, LU Wen-xiong, ZHOU Qin-fu, YAN Ya-jing. Journal of Shanghai University (Natural Science Edition), 1999, 5(1): 69
陈鹏, 陆文雄, 周勤夫, 严雅静. 上海大学学报(自然科学版), 1999, 5(1): 69
- [3] Koshiishi I, Takenouchi M, Hasegawa T, Toshio I. Analy Biochem, 1998, 265(1): 49
- [4] Imanari T, Toida T, Koshiishi I, Toyoda H. J Chromatogr A, 1996, 720: 275

《第十四次全国色谱学术报告会暨仪器展览会》

第一轮通知——征文通知

中国化学会色谱专业委员会、中国分析测试协会色谱学会和中国色谱学会一致商定《第十四次全国色谱学术报告会暨仪器展览会》将于 2003 年 4 月 20~24 日在江苏无锡市举行。凡反映近年来包括气相色谱、液相色谱、薄层色谱、凝胶色谱、裂解色谱、离子色谱、毛细管电泳等在基础研究、新方法新技术发展、分析应用、仪器及其部件研制等方面水平较高的论文均可应征。本次会议将特设以下几个专题(1)蛋白组学和代谢组学等组学研究的新进展(2)生命科学中的分离分析新方法(3)色谱在食品安全中的应用(4)环境和人类可持续发展中的色谱技术(5)多维分离和联用技术。并特邀国外著名学者做大会报告。

应征的论文要求如下(1)内容应简明扼要, 能反映工作特色, 要写成含图表和参考文献不超过两页(A4 纸)的摘要。参考文献格式请按照 GB/T3179-92 的规定书写(见《色谱》1998 年第 1 期第 89 页《征稿简则》)(2)摘要一律打字, 不要手写(3)必须附有作者单位的推荐信及未在中外学术会议上宣读或公开刊物上发表过的证明(4)作者姓名下面要写明具体单位(至科、室、系)、邮编、详细地址和电话号码, 以便联系。

为了简化审稿程序, 本次会议论文由会议筹备组直接组织审查。请投稿者将稿件(一式三份)和审稿费(30 元/篇)直接投寄到会议筹备组——大连市中山路 161 号中国科学院大连化学物理研究所许国旺研究员处, 邮编 116011。投寄征文摘要请一律用挂号邮寄, 并务必在稿件上写明“十四次色谱会征文”字样, 以免丢失或与其他稿件混淆。征文截止日期为 2002 年 12 月底。不寄审稿费的稿件不予受理。

中国化学会色谱专业委员会
中国分析测试协会色谱学会
中国色谱学会
2002 年 9 月 25 日