

## 动物组织中抗动脉粥样硬化成份——牛磺酸的微量测定

曾祥月<sup>①</sup> 王佐<sup>②</sup> 贺朝霞<sup>②</sup> 谢金魁<sup>③</sup>

(衡阳医学院<sup>①</sup>化学教研室, <sup>②</sup>心血管病研究所, <sup>③</sup>附属第一医院, 衡阳 421001)

### Detection of Trace Taurine, the Composition of Antiatherosclerosis, in Animal Tissues

ZENG Xiang-Yue<sup>①</sup>, WANG Zuo<sup>②</sup>, HE Zhao-Xia<sup>②</sup> and XIE Jin-Kui<sup>③</sup>

(<sup>①</sup>Department of Chemistry, <sup>②</sup>Institute of Cardiovascular Disease, <sup>③</sup>The First Affiliated Hospital, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

#### ABSTRACT

**Aim** To develop a new method for microdetermination of taurine the composition of antiatherosclerosis, in animal tissues with reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

**Methods** Animal tissues were soaked in water to extract taurine. The extraction was concentrated by vacuum freezing and drying. Then using the mixed liquid of Phenylisothiocyanate (PITC), triethylamine, water and ethanol (1:1:1:7) as derivative to pre-column derived taurine with PITC. Under the following conditions: 1 mL/min flow rate, 254 nm wavelength and column temperature at 45°C, 991 HPLC was used to separate, determine taurine. Qualitative and quantitative analysis of the content of taurine in sample animal (slug) tissues was done by using the approaches of peak increase and standard curve respectively.

**Results** Under the condition of selected chromatogram, the retention time of taurine was 5.06 min with distinct qualitative phenomenon of peak increasing. The result was reliable. The lowest detectable amount was 4.48 ng with the concentration of taurine between  $5.58 \times 10^3 \sim 1.79 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ . The linear regression equation between peak area of the chro-

matogram and the content of taurine was:  $S = 3.34 \times 10^{-4}W - 1.09 \times 10^{-3}$ , with  $r = 0.9998$ . The relative standard deviation of the sample liquid was 1.5% ( $n = 7$ ), the added recovery of the sample was  $\bar{P} = 99.57\%$ .

**Conclusion** This approach of soaking the taurine of animal tissues with water is simple and convenient.

It decreases the contamination. The derivative reaction is complete; the derivative of taurine is well separated within the column. This approach is a new analytical method for detecting the trace taurine in animal tissues.

**KEY WORDS** Taurine; Microdetermination; Reverse-phase high performance liquid chromatography; Atherosclerosis

**摘要** 为测定动物组织中对预防动脉粥样硬化有效的成分——牛磺酸的含量,利用渗透压原理,以水为溶剂先提取动物组织中牛磺酸,用真空冷冻抽干浓缩后进行柱前衍生处理、进样,经反相高效液相色谱柱内疏水分离后,再用标准曲线法进行定量测定。在选定的试验条件下,牛磺酸保留时间为 5.06 min,分离效果好,峰形呈正态分布,样品溶液相对标准偏差为 1.5%,最低检出量是 4.48 ng,牛磺酸含量在  $5.58 \times 10^3 \sim 1.79 \times 10^5 \mu\text{g/L}$  范围,色谱峰面积与牛磺酸含量间有良好线性关系( $r = 0.9998$ ),131.2~968.2 ng 牛磺酸的样品加标回收率为 97.79%~101.99%。按照此法测得蛞蝓组织中牛磺酸含量为 75.4  $\mu\text{g/g}$ 。此方法简便、准确,抗干扰能力强,是一种测定动物中微量牛磺酸的比较完善的分析方法。

**关键词** 牛磺酸; 微量测定; 反相高效液相色谱; 动脉粥样硬化

牛磺酸广泛存在于人和动物体内组织中,具有抑制脂质过氧化程度,预防动脉粥样硬化的作用<sup>[1,2]</sup>。在医学和食品等领域的牛磺酸研究

中,建立了一些牛磺酸含量测定方法,最常用的酸碱滴定法,方法简便易行,原理简单,但是该法只能测定常量牛磺酸,无法满足医学中微量牛磺酸测定的需要。近年报道较多的薄层层析法<sup>[3,4]</sup>,虽然样品中牛磺酸与杂质得到充分分离,但方法本身局限,仅用肉眼辨别最低检出量等重要指标,薄层厚度、点样技术以及展开的条件难以保持十分恒定,从而影响定量的准确性。基于牛磺酸是一种氨基酸,文献<sup>[5]</sup>应用氨基酸自动分析仪,建立了 25 min 短程序分析方法,定量测定结果为  $CV=1.85\%$ ,  $P=95\sim 108\%$ ,不过该法先用索氏提取法提取样品中的牛磺酸,然后再进行浓缩,步骤繁琐,溶剂消耗量大,且牛磺酸提取不完全。新近报道的示波中和滴定法<sup>[6]</sup>具有灵敏等特点,但金属汞有剧毒,对分析工作者的健康和环境污染影响很大。王佐等<sup>[7]</sup>用反相高效液相色谱(reverse-phase high performane liquid chromalography, RP-HPLC)法建立了一种测定家兔主动脉壁微量游离 L-精氨酸的新方法。本文首次提出用 RP-HPLC 法测定动物组织中微量牛磺酸,并应用渗透压原理,提取动物样品(蛞蝓)组织中牛磺酸,经柱前衍生后直接进样,最低检出量达到 4.48 ng,实验线性范围为  $5.58\times 10^3\sim 1.79\times 10^5\text{ }\mu\text{g/L}$ ,线性系数  $r=0.9998$ ,该方法为动物组织中微量牛磺酸的提取和测定,提供了一种较完善的新方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与仪器

牛磺酸(色谱纯);乙腈(色谱纯,上海吴泾化工厂);异硫氰酸苯酯(phenylisothiocyanate, PITC)(Sequanal Grade, PIERCE 公司)。其余试剂均为国产分析纯试剂;水为超纯水( $1.82\times 10^7\text{ }\Omega$ )。

991 型高效液相色谱仪(Waters 公司),配有 991 紫外检测器,510 泵,U6K 进样器,TCM 恒温盒,680-008031 梯度控制仪,Pico-Tag<sup>TM</sup>氨基酸分析专用柱( $3.9\times 150\text{ mm}$ , Waters 公司);CQ 250 型超声发生器;THZ-C 恒温振荡器;超纯水发生器(Milli-Qplus);pH 计(Beckman 公司)。

### 1.2 试剂配制

流动相 A 液:将 19.0 g  $\text{NaAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 mL 三乙胺溶解于适量水中,用冰醋酸调节 pH 至 6.5,水定容至 1.0 L。过滤,超声除气后,再取此溶液 940 mL。加 60 mL 乙腈;超声除气后充氮于 4℃ 保存。

流动相 B 液:取 600 mL 乙腈,用冰醋酸和氢氧化钠调节 pH 至 6.5,超声除气 20 min,充氮后于 4℃ 保存。

衍生剂:PITC:三乙胺:水:乙醇=1:1:1:7

样品稀释液:取 710 mg 磷酸氢二钠加水定容至 1 000 mL,用磷酸乙腈混合溶液 10%磷酸:乙腈(95:5)调节 pH 至 7.4。

### 1.3 样品制备及预处理

取活蛞蝓 2 只(175.0 mg),用 300  $\mu\text{L}$  水浸泡 20 min,让其释放粘液。将所获液体高速( $1.5\times 10^4\text{ r/min}$ )离心 15 min,吸取上清液 50  $\mu\text{L}$  于 0.50 mL 塑料离心管中,用真空冷冻干燥机抽干 12 h 后;加 20  $\mu\text{L}$  衍生剂室温下衍生 30 min,再在真空冷冻干燥机上冻干 16 h,除尽 PITC;然后用 200  $\mu\text{L}$  样品稀释液溶解供进样用。标准牛磺酸同步衍生处理。

### 1.4 测定方法

选定 HPLC 流动相流速为 1 mL/min;紫外检测波长 245 nm;柱温 45℃;用 A 液平衡氨基酸分离柱后,进样 10  $\mu\text{L}$ ,再用 B 液对混合物进行直线梯度洗脱,10 min 后 B 液达 100%。

### 1.5 结果判定

用标准系列各管的峰面积对牛磺酸进样量建立回归方程,根据样品中牛磺酸峰面积,用回归方程计算出对应的牛磺酸量( $W_{\pm}$ ,ng),以下式进一步计算出蛞蝓中牛磺酸含量  $X(\text{ng/g})$ :

$$X(\text{ng/g}) = \frac{6W_{\pm}}{W_n} \times \frac{V_1}{V_2}$$

$V_1$  为样品稀释液总量( $\mu\text{L}$ ); $V_2$  为样品稀释液进样量( $\mu\text{L}$ ); $W_n$  为样品量(g)。

## 2 结果

### 2.1 流动相对牛磺酸保留时间的影响

#### 2.1.1 流动相流速对牛磺酸保留时间的影响

分别调节流动相的流速为 0.5、0.7、1.0、1.5 和 2.0 mL/min,对应的保留时间为 9.63、7.15、5.04、3.32 和 2.63 min。结果表明,流动相的流速为 1.0 mL/min 时,样品中的牛磺酸能较好地与其他组份分离。

#### 2.1.2 流动相 pH 对牛磺酸保留时间的影响

如表 1(Table 1)所示,随着流动相 pH 值升高,牛磺酸保留时间缩短,两者呈反变关系( $r = -0.988, P < 0.01$ )。当流动相 pH=6.50 时,标准溶液保留时间为  $5.04 \pm 0.02 \text{ min}$  ( $n = 5$ )。

2.2 标准牛磺酸与 PITC 衍生化产物的反相高效液相色谱图及标准曲线方程

2.2.1 标准牛磺酸与 PITC 衍生化产物的反相高效液相色谱图 图 1(Figure 1)是流动相 pH=6.50、流速 1 mL/min、进样量为 892.8 ng 时的色谱图,其峰面积为 0.2890 毫伏·秒,保留时间为 5.06 min。由图 1(Figure 1)可见,在选定色谱条件下,牛磺酸色谱峰尖锐,且基线平

直,整个色谱峰趋向正态分布。

Table 1. Influence of pH of mobile phase on retention time of taurine.

pH	$t_R(\text{min})$
5.00	$6.13 \pm 0.04$
5.50	$5.86 \pm 0.02$
6.00	$5.72 \pm 0.02$
6.50	$5.04 \pm 0.02$
7.00	$4.89 \pm 0.01$
7.50	$4.52 \pm 0.01$
8.00	$4.03 \pm 0.01$

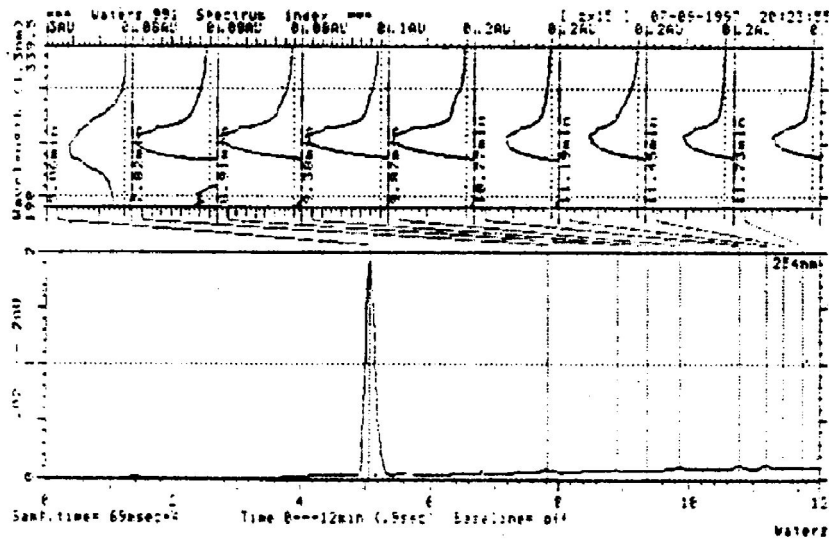


Figure 1. RP-HPLC profiles of the PITC derivative of standard taurine (PITC-taurine)(with spectrum analysis).

2.2.2 标准曲线方程 测定结果发现,进样量在  $5.58 \times 10^3 \sim 1.79 \times 10^5 \mu\text{g/L}$  范围内,峰面积(S)与进样量(W)的线性回归方程为:

$$S = 3.34 \times 10^{-4} W - 1.09 \times 10^{-3}, (r = 0.9998, P < 0.001).$$

2.3 方法可靠性及灵敏度测定

2.3.1 方法精密度 对同一样品溶液平行测定 7 次,相对标准偏差为 1.5%。

2.3.2 方法准确度 向样品溶液中分别加入不同量牛磺酸,考察回归方程对应的高中低不同含量范围内方法测定准确性,结果如表 2 (Table 2)所示。

Table 2. Recovery of taurine (ng).

Sample	Content	Added	Found	Recovery(%)
1	75.4	55.8	129.2	98.48
2	75.4	111.6	189.8	101.50
3	75.4	223.2	292.0	97.79
4	75.4	446.4	532.2	101.99
5	75.4	892.8	949.7	98.09
Average recovery(%)				99.57

2.3.3 最低检出量 信噪比=2:1 时,最低检出量为 4.4 ng。

2.4 蛞蝓中牛磺酸含量

2.4.1 蛞蝓水相提取物与异硫氰酸苯酯

(PITC)衍生化产物的反相高效液相色谱(RP-HPLC)图 图 2(Figure 2)是蛞蝓水相提取物稀释液与 PITC 衍生化产物的 RP

HPLC 图。可见随着保留时间不同,出现不同的峰。

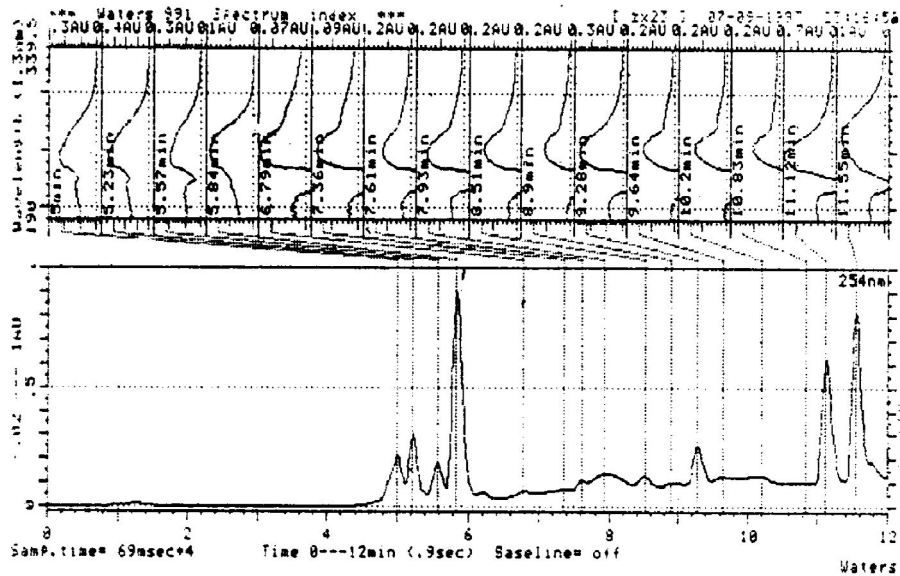


Figure 2. RP-HPLC profiles of the PITC derivative of water-phase extraction of slug (with spectrum analysis).

2.4.2 样品中牛磺酸的定性分析 由图 1 (Figure 1)和图 2(Figure 2)可见,标准牛磺酸的保留时间为 5.06 min,图 2(Figure 2)中只有保留时间为 5.00 min 的峰与其具有极为相近的色谱、波谱图形。当样品加入一定量的标准牛磺酸,经预处理后进样分析发现,只有该吸收峰增高、峰面积明显增大,加标回收率为 99.9%,其它峰的峰高、峰面积均无明显变化。实验认定图 2(Figure 2)中保留时间为 5.00 min 的吸收峰为样品中 PTC-牛磺酸的吸收峰。

2.4.3 蛞蝓中牛磺酸含量的计算结果 样品中牛磺酸对应峰面积为  $S_{\text{样}} = 0.0356$  毫伏·秒,由回归方程和 1.5 所述公式计算可知:

蛞蝓中牛磺酸的含量  $X = 75.4 \mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

3.1 衍生化技术

因牛磺酸结构中缺乏共轭双键系统,无近紫外吸收特性,本文采用 PITC 试剂作为柱前衍生剂,PITC 试剂与牛磺酸衍生反应形成 PTC—牛磺酸,在原牛磺酸结构上引入苯环,该

产物在 254 nm 有紫外吸收峰,用高灵敏度紫外检测器可定量检测 PTC—牛磺酸。比较图 1 (Figure 1)和图 2(Figure 2)可知,样品和牛磺酸标准物经柱前同步衍生后,保留时间分别为 5.00 和 5.06 min,非常接近,表明衍生反应选择性强,干扰少,所选衍生剂适当。上述的极小误差属正常操作误差所致。

3.2 色谱条件

由于反相色谱柱性能稳定,柱效高,流动相平衡容易,可避免用传统的离子交换柱测定时性能不够稳定、流动相平衡时间长的缺点。在图 1(Figure 1)中,牛磺酸的峰形尖锐,基线平直,整个色谱峰呈正态分布,表明 HPLC 的流动相、固定相十分适用于该衍生产物的色谱行为,有利于柱内分离,在样品分析中,5.00 min 色谱峰与 5.23 min 色谱峰分离较好,样品加标回收率达到 97.79%~101.99%。

3.3 流动相对色谱行为的影响

经试验当流动相流速为 1.0 mL/min、pH = 6.5 时,有利于牛磺酸的柱内疏水分离。从化学结构上看,PTC—牛磺酸具有两性,流动相的

pH 值不仅会影响它们的分辨率,而且会因衍生化牛磺酸的分子与离子浓度的比例而影响检测灵敏度。因此,实验最佳的流动相流速和 pH 值必须通过预试验决定。

### 3.4 动物组织中牛磺酸的提取分离

本文利用渗透压差原理,用水浸泡蛞蝓提取牛磺酸,不需加入其他试剂,避免了一些干扰,利用真空冷冻干燥法除去水份,不造成任何污染,最大限度地浓缩了牛磺酸;样品抽干后再衍生化处理,衍生化反应完全,因而标准系列具有良好线性关系( $r=0.9998$ ),在 131.2~968.2 ng 牛磺酸的宽含量范围内,样品加样准确度试验平均回收率达到 99.57%。若能设法缩短抽干时间,将进一步扩大本法的实用性。

### 参考文献

- 1 Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* 1992, 72(1): 101.
- 2 薛林,赵春玉,刘勃,等. 牛磺酸对家兔实验性动脉粥样硬化的影响. 北京医科大学学报, 1994, 26(5): 357~358.
- 3 蔡云见,张穗芳,周清凯. 青环海蛇胆中牛磺酸的 TLC 分析. 中药材, 1994, 17(6): 34~35.
- 4 杨祖英,张平伟. 薄层色谱法测定食品中牛磺酸. 卫生研究, 1996, 25(4): 248~250.
- 5 陈玉珍,章广远,龚代来,等. 食品中牛磺酸测定方法的研究. 营养学报, 1994, 16(4): 406~411.
- 6 孙汝东,缪平,相秉仁,等. 示波中和滴定法测定牛磺酸. 药物生物技术, 1995, 2(1): 46~47.
- 7 王佐,刘易林,姜志胜. 一种测定兔主动脉壁 L-精氨酸水平的新方法. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4(1): 72~74.

(1997-07-31 收到, 1997-11-28 修回)