

海洋生物中牛磺酸的生物活性及其含量测定

PHYSIOLOGICAL ACTIONS AND QUANTITY DETERMINATION
OF TAURINE IN MARINE ORGANISMS

谭乐义 薛长湖 林 洪 李兆杰

(青岛海洋大学食品工程系 266003)

牛磺酸 (Taurine, Tau) 是一种非蛋白质结构氨基酸的特殊氨基酸。它以游离氨基酸的形式普遍存在于动物体内各种组织,并以小分子二肽或三肽的形式存在于中枢神经系统,但不参与蛋白质合成。最早是 1827 年从牛的胆汁中发现了这种含硫氨基酸,又称为牛胆碱,牛胆素。其分子式为 $C_2H_7NO_2S$,是一柱状结晶体,熔点为 $310\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。牛磺酸在鱼、贝类中含量十分丰富,软体动物中尤甚。可以说海洋生物是牛磺酸的天然宝库。

1 生物活性研究近况

1886 年, Schmeideberg 等人就认为牛磺酸具有药物作用,但直到 1975 年 Hayes 等发现幼猫因牛磺酸缺乏而造成视网膜退化并最终导致失明后,牛磺酸的营养和神经生理功能才开始受到了广泛关注。

牛磺酸具有多种保健功能。它能使脂肪乳化,有助于脂肪的消化吸收;有保护肝细胞膜的作用,中和细菌毒素,降低次级胆酸的毒性及抗四氯化碳对肝的损伤,所以是一种良好的护肝剂;牛磺酸能与胆汁酸化而排泄出体外,故具有降低胆固醇及抑制胆固醇、胆结石的作用。林钧明 1991 年研究还发现,牛磺酸还具有一定的抗肿瘤活性,因此将牛磺酸与其他氨基酸、维生素并用还可用于癌症的治疗。

在对牛磺酸的生理功能的研究中,人们最感兴趣的还是牛磺酸与脑发育的关系。研究表明,牛磺酸在哺乳动物的胎儿和新生儿脑中浓度高,之后便逐渐减少,至成熟时则达到一定的浓度,是所有哺乳动物中枢神经系统组织中游离氨基酸的主要成分之一,并都发现了这种发育期的浓度变化规律,表明了它在大脑发育中的作用。对于癫痫病患者,其牛磺酸浓度降低并常伴有谷氨酸代谢紊乱,而牛磺酸对之有抗发病作用和矫正氨基酸平衡失调作用,能使对抗癫痫药具耐药性的 $1/3$ 癫痫患者的发作次数减少 50% 以上,且无任何副作用,表明它在成熟大脑中也有一定的作用。据陈蕾 1994 年的研究结果,动物在缺乏牛磺酸时,中

枢神经系统发育受阻,智力低下,补充牛磺酸后,不仅脑发育正常,而且学习记忆能力显著增强。韩晓滨等曾对牛磺酸与大鼠脑发育的关系进行了实验研究。他们将断乳大鼠随机分成两组:(1) 补充 0.6% 牛磺酸;(2) 对照组。然后从大鼠的行为、大脑发育和人体细胞体外培养 3 个方面对牛磺酸与大鼠脑发育的关系及其机制进行了探讨。结果表明:(1) 补充牛磺酸大鼠在学习、记忆等方面均显著优于对照组大鼠 ($P < 0.01$)。(2) 补充组大鼠在脑重量上显著重于对照组大鼠 ($P < 0.05$)。(3) 补充组大鼠大脑中游离牛磺酸、锌、铜、铁及其他 16 种游离氨基酸含量显著高于对照组大鼠 ($P < 0.01$)。(4) 牛磺酸具有促进细胞代谢活性的作用。上述结果表明,牛磺酸具有促进大脑发育的作用。1985 年 Sturman 以猫为模型,确立了牛磺酸与动物脑发育的关系,但牛磺酸与人脑的关系报道较少。

人体内牛磺酸来源主要有两条:体内自身合成及通过食物摄取。人类主要依靠摄取食物中牛磺酸来满足机体需要。特别是婴幼儿由于其合成牛磺酸的半胱氨酸亚硫酸脱羧酶 (CSAD) 酶活性较低,因此牛磺酸必须从食物中摄取,其主要来源就是母乳。研究发现,用牛乳代替母乳喂养婴幼儿时,其发育始终不如吃母乳的幼儿。这是因为,牛乳中牛磺酸的含量仅为母乳中含量的 $1/21 \sim 1/30$ 。但据调查,我国城市母乳满足婴幼儿者不足 30% ,农村地区近年也呈下降趋势,因此,在宣扬母乳喂养的同时,还应在牛乳及制品中添加牛磺酸,以补充或强化婴幼儿摄入体内的牛磺酸含量。目前,牛磺酸奶粉在我国已有报道。

研究还发现,牛磺酸对小鼠、大鼠、猴、人的生长发育有一定的促进作用,并被认为是一种生长调节物质,但机理至今未明。可能是因为牛磺酸能刺激大鼠的生长激素分泌。近来实验发现^[1],牛磺酸对锌的吸收和转运具有促进作用,能明显增加⁶⁵Zn 在肠道内的

收稿日期:2000-01-09;修回日期:2000-06-19

吸收及其在体内各主要组织脏器的含量。而锌是儿童生长发育必需的微量元素,是人体核酸合成酶的构成部分,对抗衰老、增强儿童营养、防治儿童营养不良或缺铁性贫血的治疗,均会收到明显的疗效。从这层意义上讲,牛磺酸有促进人体发育的作用。但也有研究发现,大鼠摄入过量的牛磺酸,其生长发育受到抑制,仔鼠的死亡率亦升高,认为牛磺酸具有一定的条件性毒性作用。

2 鱼、贝类中牛磺酸含量的测定

2.1 原料预处理

首先,将鱼、贝类待测部位放入绞碎机中绞碎。这里应注意的是,鱼、贝类中牛磺酸的含量随其部位而有所不同,如卵巢、内脏等部位含量相对较多,而其肌肉组织中含量则相对较少。因此,处理时应小心分离待测部位,以保证测定结果的准确性。然后,准确称取一定量已绞碎的待测样品,用磷酸盐缓冲液(pH6.8)溶解样品,移入容量瓶中定容。充分摇动容量瓶,然后放入超声波振荡器中振荡10~15 min。取一定量经振荡的样液在5 000 r/min条件下离心30 min,过滤,取上清液备用。

2.2 样品测定

随着牛磺酸的研究及应用的迅速发展,牛磺酸的定量检测方法也亟待建立和改进,现将目前常用的测牛磺酸的方法介绍如下。

2.2.1 柱后衍生离子色谱法

样品经预处理,在阳离子交换柱中被分离,再与邻苯二甲醛(OPA)进行柱后衍生反应,由荧光检测器检测定量,该方法具有灵敏度高、定量准确等优点,但是分离需使用的是钠离子交换柱,该柱子价格昂贵,这给此测定方法的推广应用带来了困难。

2.2.2 柱前衍生离子色谱法

样品经简单的预处理后,按比例加入定量的OPA衍生反应试剂,在碱性条件下与样液中牛磺酸生成具强荧光的物质,在开始衍生反应1 min后,立即终止反应,通过ODS C18反相柱分离,在荧光下检测定量。柱前衍生剂为含有0.5 g OPA和5 ml α -巯基乙醇的0.2 mol/L(pH 9.5)硼酸缓冲液。流动相为55%的0.05 mol/L乙酸钠溶液和45%的甲醇。荧光检测器波长为: E_x :335 nm和 E_m :455 nm。该方法具有前处理简单,操作方便,检测灵敏度高等特点,只须在一般的HPLC仪器上使用普通的反相柱就可进行牛磺酸的测定。其中,准确的控制衍生反应是整个测定的关键。

2.2.3 分光光度法

2.2.3.1 茚三酮比色法

用酸性阳离子交换树脂分离,柱后茚三酮显色,于440 nm下检测牛磺酸含量。

2.2.3.2 酚试剂比色法

试样用酸性阳离子交换柱分离,将试液与磷酸盐缓冲液混合,加入酚试剂和NaClO溶液反应,于630 nm下检测牛磺酸含量。

2.2.3.3 邻苯二甲醛比色法

样品经简单预处理后,用强酸性阳离子交换树脂分离,在磷酸盐缓冲液和尿素存在的条件下,牛磺酸可与OPA试剂反应,用醋酸酸化后,可得到紫红色产物,在560 nm下检测其含量。

上述3种比色法测牛磺酸时,提取液中 γ -氨基丁氨酸、甘氨酸、赖氨酸会对测定结果产生一定的影响,为充分除去这些干扰因素,作者认为M. K. Gai-tonde的方法值得借鉴:将提取液通过一双柱联合体,上柱为Zeo-Karb 225(H+型,10 cm)下柱为Dowex 1-X10(碳酸盐型,12 cm),试样通过后,用一定量水洗,将DOWEX柱拿掉,用0.1 mol/L的醋酸在氮气的压力下洗脱,直到所有的碳酸盐被醋酸盐交换,便可得到游离氨基酸,将中性洗脱液蒸发至干,残渣溶于水中,然后再进行检测。

2.2.4 过草酸酯化学发光法

以邻苯二甲醛和2-巯基乙醇为衍生剂,然后将牛磺酸衍生物与草酸双-(2,4,6-三氯苯基)酯和 H_2O_2 反应的产物反应,计数化学发光30 min。

2.2.5 氨基酸分析仪测定法

氨基酸分析仪分析氨基酸主要是通过强酸性阳离子交换树脂对氨基酸的吸附、洗脱、分离来完成的。陈玉珍等曾用此法测定了食品中牛磺酸的含量。经过精密度和准确度试验,发现此法测牛磺酸重现性好,变异系数小。在牛磺酸浓度0.2 mol/L时,峰位置和峰面积的变异系数(C_v 值)为0.16%和1.85%($n=10$),明显低于规定技术指标(1.0%和2.5%)。对0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mol/L浓度的牛磺酸加标回收试验,回收范围为95%~108%($n=12$)。

2.2.6 柱上荧光衍生HPLC法

牛磺酸用水从原料中抽提出来,样液的蛋白质除去后再将其纯化。然后牛磺酸经一复合柱进行层析,流动相为乙腈和硼酸碱盐缓冲液,衍生剂为邻苯二甲醛和2-巯基乙醇。此方法回收率大于90%,灵敏度高,应用此法测得鸡蛋中的牛磺酸为 1.26 ± 0.15 mg/100 g,而用其他方法则没有测出。

参考文献

- 1 崔志清等.中国药理学通报,1996,12(4):374

(本文编辑:刘珊珊)