

高效液相色谱法评价海洋生物中半胱亚磺酸脱羧酶活性

张千伟, 徐红萍, 毛丽沙, 金火喜* (浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江舟山 316022)

摘要 [目的]建立磺基丙氨酸(CA)的高效液相色谱分析法,并以CA为底物,评价不同海洋生物组织中半胱亚磺酸脱羧酶(CSD)的活性。[方法]以Agilent Eclipse XDB-C₁₈为色谱柱,采用邻苯二甲醛(OPA)进行柱前衍生,检测波长为315 nm,对衍生化过程及色谱条件进行了优化。[结果]当CA:OPA(物质的摩尔比)=1:2、衍生时间2 min、流动相甲醇:乙酸钠=65:35(V/V)、流速1 mL/min时,CA具有最优的检测效果。在该条件下,CA浓度在10~500 μg/mL具有良好的线性关系($R^2 > 0.99$),平行样品的相对标准偏差为0.9%~8.6%,保留时间为1.4~1.5 min。不同海洋生物组织中CSD活性检测结果显示,在所选择的海洋贝类、头足类、鱼类中,贻贝、疣荔枝螺和大黄鱼均未检测到CSD活性;蛭子、血蛤、芝麻螺和鱿鱼中CSD活性较低。不同组织比较,海鲈鱼肝脏中CSD活性最高,达21.8 U/mg,而肉和鳃中则未检测到CSD活性。[结论]不同海洋生物体内牛磺酸的合成途径不尽相同。

关键词 海洋生物;半胱亚磺酸脱羧酶;磺基丙氨酸;高效液相色谱

中图分类号 TS201.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)01-0212-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.01.062



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Evaluation of Cysteine Sulfinate Decarboxylase Activity in Marine Life by High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Qian-wei, XU Hong-ping, MAO Li-sha et al (School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022)

Abstract [Objective] A method of high performance liquid chromatography (HPLC) was established and used to evaluate the activities of cysteinesulfinate decarboxylase (CSD) in different marine life by determining the cysteic acid (CA). [Method] The Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column was used for pre-column derivatization with o-phthalaldehyde (OPA) at a detection wavelength of 315 nm. The derivatization process and chromatographic conditions were optimized. [Result] The optimal condition for CA analysis was: CA:OPA = 1:2 (n/n), derivatization time 2 min, the mobile phase methanol:sodium acetate = 65:35 (V/V), and the flow rate of 1 mL/min. The relative standard deviations (RSD) of the parallel samples were 0.9%~8.6% and the retention time was 1.4~1.5 min. The linear range ($R^2 > 0.99$) was in the range of 10~500 μg/mL. The results of CSD activity detection in different marine organisms showed that the CSD activity was not detected in mussel, rock whelk and large yellow croaker, but very low in razor clam, blood clams, furrowed planaxis and sleeve-fish. The activity of CSD in the liver of sea perch was the highest, reaching 21.8 U/mg, while it was not detected in meat and gill. [Conclusion] The synthesis pathways of taurine in different marine organisms are different.

Key words Marine life; Cysteinesulfinate decarboxylase; Cysteic acid; High performance liquid chromatography

牛磺酸,又称β-氨基乙磺酸,是动物体内含硫氨基酸代谢的最终产物之一。牛磺酸广泛分布于哺乳动物和海洋生物中,像哺乳动物的脑、肝脏及贝类、螺类等海洋生物中牛磺酸的含量均十分丰富^[1-5]。牛磺酸被认为具有广泛的生理学功能,如保护细胞膜、解毒以及抗氧化等^[6-7]。研究证明,牛磺酸还具有促进大脑发育、增强人体免疫和改善视力等功效^[8-10]。

牛磺酸的生物合成途径较为复杂^[11],不同的生物体内其合成途径存在一定差异。研究发现,通过半胱氨酸双加氧酶(CDO)催化半胱氨酸形成半胱亚磺酸(CSA),再经半胱亚磺酸脱羧酶(CSD)催化脱羧生成牛磺酸,最后氧化成牛磺酸是生物体内合成牛磺酸最主要的途径^[12]。除此之外,某些生物还可以通过CSA—磺基丙氨酸(CA)—牛磺酸途径或半胱胺—亚牛磺酸—牛磺酸途径等旁路途径来合成牛磺酸。例如,蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)中具有较高的半胱胺双加氧酶(CAD)活性^[11],可以通过CA脱羧形成牛磺酸^[13]。在上述途径中,CSA和CA的脱羧反应均由同一个酶CSD催化。目前,有关牛磺酸生物合成途径的研究主要集中在

主要途径上,对CA脱羧生成牛磺酸途径的研究鲜有文献报道。据此,该研究以CA为底物,对不同海洋生物组织中CSD的活性进行检测和筛选,弥补国内该研究领域的空白,为进一步明确不同海洋生物体内牛磺酸的合成途径提供参考。

从海洋生物组织样品中提取CSD粗蛋白,加入底物CA,在缓冲体系中进行反应,通过分析反应前后CA含量的变化可评价样品中CSD的活性。氨基酸通过异硫氰酸苯酯、单磺酰氯、邻苯二甲醛(OPA)等衍生化后可在高效液相色谱上进行检测^[14-16],其中OPA衍生法因安全、简便、快速的特点而被广泛应用。该试验采用OPA为衍生剂,甲醇-乙酸钠为流动相,拟建立峰形良好、快速灵敏的CA检测方法,利用该方法评价不同海洋生物中CSD的活性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试材。贻贝、血蛤、芝麻螺、疣荔枝螺、海鲈鱼等海洋生物购于舟山市乐购超市。

1.1.2 药品与试剂。磺基丙氨酸(CA)、牛磺酸、邻苯二甲醛(OPA)、牛血清蛋白、甲醇、乙酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸铵、硼酸、氢氧化钠、巯基乙醇和考马斯亮蓝G-250等药品和试剂均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.1.3 仪器与设备。1200高效液相色谱仪(美国Agilent公司);FS-1高速匀浆机(江苏金坛市环宇科学仪器厂);SHZ-

基金项目 舟山市科技局浙江海洋大学专项(2016C41002);国家自然科学基金面上项目(21476212)。

作者简介 张千伟(1994—),男,安徽滁州人,硕士研究生,研究方向:食品加工与安全。*通信作者,讲师,博士,硕士生导师,从事海洋药物、生物催化与生物转化研究。

收稿日期 2018-09-03;修回日期 2018-09-12

88A 水浴恒温振荡器(苏州市培英实验设备有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液的配制 衍生试剂:准确称取 0.01 g OPA 于 1 mL 甲醇中,超声波辅助下溶解,再加入 10 μ L 巯基乙醇,用 0.4 mol/L 的硼酸钠缓冲液(pH 9.5)定容至 10 mL 即可,现配现用。CA 标液(1 mg/mL):准确称取 0.05 g CA 固体,溶解于 50 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液中(pH 7.4)。牛血清蛋白标准液(0.1 mg/mL):准确称取 0.01 g 牛血清蛋白溶解于 100 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液中。考马斯亮蓝试剂:准确称 50 mg 考马斯 G-250,将其溶于 50 mL 95%乙醇中,再加入 50 mL 85%磷酸,定容至 500 mL。

1.2.2 CA 高效液相检测。取 CA 溶液 250 μ L 至离心管中,加入一定量的衍生剂,在 37 $^{\circ}$ C 水浴下进行衍生化反应。反应液经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,立刻进行 HPLC 分析。色谱条件:色谱柱 Agilent XDB-C₁₈(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m),流动相甲醇-乙酸钠溶液,波长 315 nm。根据峰形、峰面积、保留时间等指标对流动相比比例、流速、衍生剂用量、衍生化时间等条件进行优化。

1.2.3 CA 标准曲线绘制。将 CA 标准液(1 mg/mL)用超纯水依次稀释成 0.50、0.40、0.20、0.10、0.05、0.02、0.01 mg/mL 7 个质量浓度梯度。按照“1.2.2”步骤,在最优条件下对 CA 浓度进行测定。以 CA 质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.4 精密度试验。分别取 0.01、0.10 和 0.50 mg/mL 的 CA 标准溶液,按照“1.2.2”步骤,在最优条件下对 CA 浓度进行测定。每种质量浓度平行测定 3 次,记录峰面积,并计算相对标准偏差。

1.2.5 样品中 CSD 活性检测。将新鲜的海洋生物洗净,取肉、内脏、鳃等组织部分。分别称取 20 g,加入 50 mL 磷酸盐缓冲液,在循环水控温下,匀浆 30 min。将匀浆液置于 8 000 r/min 下离心 20 min,去沉淀。上清液在 4 $^{\circ}$ C 下用 70% 硫酸铵盐析 4 h,10 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。沉淀中加入 50 mL 磷酸盐缓冲液,并置于同种缓冲液中透析 12 h,中途更换一次缓冲液。试验组取透析后的粗酶液 1 mL,加入 0.05 mol/L 的 CA 溶液 1 mL,再加入 0.2 μ mol 磷酸吡哆醛和 4.0 μ mol 巯基乙醇。另取 0.05 mol/L 的 CA 溶液 1 mL,加入 1 mL 磷酸盐缓冲液、0.2 μ mol 磷酸吡哆醛和 4.0 μ mol 巯基乙醇,作为空白组。将试验组和空白组均于 37 $^{\circ}$ C、120 r/min 条件下反应 2 h,反应液按照“1.2.2”方法检测 CA 的含量。在上述反应条件下,每分钟催化反应掉 1 nmol CA 所需的酶量定义为一个酶活单位(U)。

1.2.6 粗酶液的蛋白浓度测定。采用考马斯亮蓝法测定粗酶液中蛋白质浓度。配制一系列浓度梯度的牛血清标准蛋白液,各取 1 mL 标准液,加 5 mL 考马斯亮蓝试剂,摇匀后在 595 nm 测吸光度。以牛血清蛋白浓度为横坐标、A_{595 nm} 为纵坐标,绘制牛血清蛋白标准曲线。取 1 mL 样品粗酶液,加 5 mL 考马斯亮蓝,摇匀后测 A_{595 nm},依照牛血清蛋白标准曲线计算样品蛋白浓度。

2 结果与分析

2.1 流动相比比例选择 选用甲醇与 0.05 mol/L 的乙酸钠作为流动相,分别选择体积比 20:80、30:70、40:60、50:50 和 65:35 进行试验,结果如表 1 所示。由表 1 可知,在所选的所有体积比下,CA 均能达到很好的分离效果,但保留时间随着甲醇比例的增加而缩短。综合考虑峰面积(较大为宜)及保留时间(较短为宜),确定流动相甲醇-乙酸钠的比例为 65:35。

表 1 流动相比比例对 CA 检测的影响

Table 1 The effect of the ratios of mobile phase on detection of cysteic acid

比例(甲醇:乙酸钠) Ratio (methanol:sodium acetate)	峰面积 Peak area	保留时间 Retention time//min
20:80	8 003	3.45
30:70	6 247	2.31
40:60	9 718	1.87
50:50	7 738	1.55
65:35	9 959	1.43

2.2 流动相流速优化 流动相的流速是高效液相色谱检测法的一个重要因素,流速过慢,峰形变宽,保留时间延长,效率降低;流速过快则峰面积太小,导致灵敏度降低。该试验选择甲醇-乙酸钠(65:35, V/V)为流动相,考察了不同流速(0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 mL/min)对 CA(1 mg/mL)检测的影响。从表 2 可以看出,流速对 CA 的出峰时间及峰面积均有显著影响,随着流动相流速的不断增大,保留时间逐渐缩短,峰面积则不断下降。综合考虑峰面积和保留时间,选择 1.0 mL/min 为最终流动相的流速。

表 2 流动相流速对 CA 检测的影响

Table 2 The effect of the flow rate of mobile phase on detection of cysteic acid

流速 Flow rate//mL/min	峰面积 Peak area	保留时间 Retention time//min
0.6	18 290	2.41
0.8	13 250	1.80
1.0	9 959	1.43
1.2	9 301	1.20
1.5	7 883	1.10

2.3 衍生剂用量选择 该研究采用 OPA 对 CA 进行衍生化,OPA 的用量对衍生化产物的浓度有直接影响。OPA 用量不足,衍生化反应不完全,目标物质峰面积减小;OPA 用量过多,则会导致药品的浪费。该试验考察了 OPA 的不同用量(CA 与 OPA 的摩尔比分别为 2:1、1:1、1:2、1:3 和 1:5)对 CA 检测的影响,结果如表 3 所示。由表 3 可知,随着 OPA 用量的增加,CA 峰面积也逐渐增加;当 OPA 与 CA 的摩尔比超过 2:1 时,峰面积趋于稳定,说明 OPA 已经过量。所以,最终选择 OPA 与底物 CA 的摩尔比为 1:2。

2.4 衍生化时间优化 该试验考察了底物 CA 与衍生试剂 OPA 反应的时间对峰面积的影响,结果如图 1 所示。由图 1 可知,随着反应时间的增加,峰面积从 0.5 min 时的 7 335 迅速增加至 2 min 时的 11 109,说明 CA 与 OPA 反应迅速。然而,随着反应时间的继续延长,峰面积有缓慢下降的趋势,说

明衍生化产物不是十分稳定,会慢慢分解。所以,该试验采用衍生时间为2 min。

表3 衍生剂量对CA出峰的影响

Table 3 The effect of derivative amount on peak area of cysteic acid

衍生剂量 (CA:OPA)	峰面积 Peak area	保留时间 Retention time//min
2:1	9 690.7	1.462
1:1	12 670.0	1.468
1:2	13 480.0	1.472
1:3	13 462.0	1.472
1:5	13 470.0	1.475

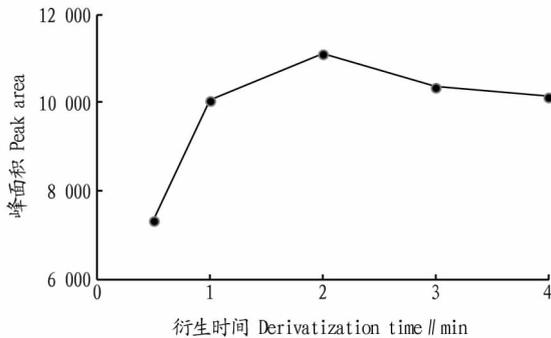


图1 衍生化时间对峰面积的影响

Fig. 1 The effect of derivatization time on peak area of cysteic acid

2.5 CA 色谱图与标准曲线 在上述最优条件下,CA 标样(1 mg/mL)的色谱图如图2,可见其峰型美观,且没有杂峰干扰。以CA 质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制CA 标准曲线,如图3所示。当CA 在10~500 $\mu\text{g/mL}$ 时,CA 质量浓度与峰面积呈良好的线性关系,回归方程为 $y = 12\,134x + 9.519$ ($R^2 = 0.991$)。

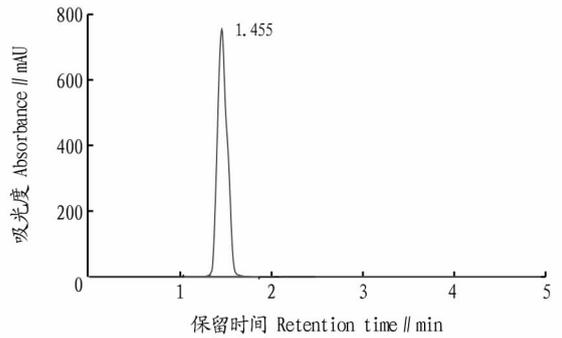


图2 CA标准色谱图

Fig. 2 The standard chromatogram of cysteic acid

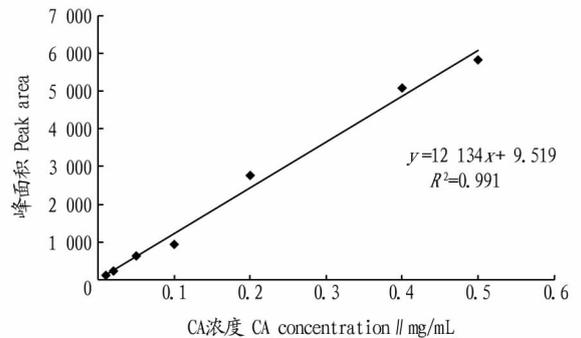


图3 CA标准曲线

Fig. 3 The standard curve of cysteic acid

2.6 精密度试验 选择3个不同质量浓度的CA标样,分别为低质量浓度(10 $\mu\text{g/mL}$)、中质量浓度(100 $\mu\text{g/mL}$)和高质量浓度(500 $\mu\text{g/mL}$),同一样品重复测定3次,峰面积见表4。这3种质量浓度的CA标样相对标准偏差分别为8.6%、0.9%和4.9%,说明该方法精密度较高,具有良好的重复性。

表4 精密度试验结果

Table 4 The results of precision test

标样浓度 Standard sample concentration $\mu\text{g/mL}$	峰面积 Peak area			平均值 Average value	标准偏差 (SD)	相对标准偏差 (RSD) // %
	1	2	3			
10	69.4	59.2	61.0	63.2	5.4	8.6
100	979.9	971.7	989.7	980.4	9.0	0.9
500	6 100.9	5 551.7	5 994.5	5 882.4	291.3	4.9

2.7 海洋生物样品中CSD活性的评价 该试验选择了舟山海域常见的几种海洋生物,将其组织经洗净、匀浆、盐析和透析后得粗酶液。粗酶液中蛋白含量按“1.2.6”中方法进行测定,其牛血清蛋白标准曲线如图4所示。由图4可知,牛血清蛋白标准曲线有良好的线性关系。分别向各组织样品初酶液中加入底物CA,37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min条件下维持2 h,检测反应前后CA含量的变化,从而评价样品中CSD的活性。

从表5可以看出,在所选择的海洋生物中,贻贝、疣荔枝螺和大黄鱼体内未检测到CSD活性,而蛭子、血蛤、芝麻螺和鱿鱼体内均检测到CSD活性。该结果说明,贻贝、疣荔枝螺和大黄鱼不具有通过CA合成牛磺酸的能力,而蛭子、血蛤、芝麻螺和鱿鱼则可以通过这个途径合成牛磺酸。针对海鲈

鱼和美国红鱼不同组织的检测结果发现,不同组织中CSD活性也有明显差异。海鲈鱼肠和肝中CSD活性的活性分别达6.0和21.8 U/mg,而肉和鳃中则未检测到CSD活性;美国红鱼肠中检测到很低的CSD活性,其他组织中则未检测到CSD活性。柳小英等^[17]报道这些组织中均含有一定量的牛磺酸,结合该试验结果,说明同一种生物的不同组织可以通过不同的途径来合成牛磺酸。

海洋生物尤其是海洋贝类、螺类、鱼类等,其体内牛磺酸的含量十分丰富,是获取天然牛磺酸的宝库。牛磺酸在不同组织中的含量差异较大,一般来说,肝脏中牛磺酸含量较高。CSD是很多生物体内牛磺酸合成的关键限速酶,其活性的大小往往决定了牛磺酸含量的高低。CSD可以介导牛磺酸合

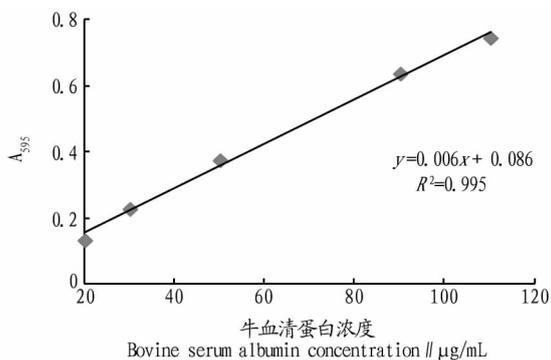


图 4 牛血清蛋白浓度标准曲线

Fig. 4 The standard curve of bovine serum albumin concentration

成的 2 条途径,但不同生物组织内的 CSD 对 CSA 和 CA 的活性有所差异。研究发现,蓝鳃太阳鱼肝脏内 CSD 对 CSA 的活性远远大于 CA,真鲷肝脏内 CSD 则对 CA 的活性大于 CSA,而来自虹鳟鱼肝脏的 CSD 对 CA 基本没有活性^[12-13]。所以,该研究以 CA 为底物,检测海洋生物体内 CSD 的活性,可一定程度上分析不同海洋生物体内牛磺酸的合成途径,为揭示牛磺酸的合成机制提供一定的参考基础。

表 5 不同海洋生物组织中 CSD 活性

Table 5 CSD activity in different marine organisms U/mg

海产品 Marine products	肠 Intestine	肝 Liver	肉 Flesh	鳃 Gill
蛰子 Razor fish	—	—	3.2	—
血蛤 Blood clams	—	—	2.2	—
贻贝 Mytilidae	—	—	ND	—
芝麻螺 Sesame screw	—	—	3.8	—
疣荔枝螺 Thais clayigera	—	—	ND	—
鱿鱼 Squid	—	—	3.3	—
海鲈鱼 Sea bass	6.0	21.8	ND	ND
美国红鱼 <i>Sciaenops ocellatus</i>	1.4	ND	ND	ND
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	ND	ND	ND	ND

注:“—”表示未检测,ND 表示未测到

Note:“—” means not detected,ND means not detected

3 结论

该试验建立了磺基丙氨酸的高效液相色谱分析方法。采用 OPA 进行衍生,检测波长 315 nm,流动相甲醇:乙酸钠=65:35(V/V),流速为 1 mL/min,CA:OPA=1:2,衍生时间 2 min。该方法在 10~500 μg/mL 质量浓度范围内具有良好

的线性关系($R^2 > 0.99$),相对标准偏差为 0.9%~8.6%。以 CA 为底物,利用该方法评价不同海洋生物中 CSD 的活性,结果发现,不同的海洋生物中 CSD 活性差异较大,其中海鲈鱼肝脏中活性最高,而大黄鱼、贻贝和疣荔枝螺中未检测到 CSD 活性。该研究表明不同海洋生物体内牛磺酸的合成途径有所差异。

参考文献

- [1] LI J H, LING Y Q, FAN J J, et al. Expression of cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) in male reproductive organs of mice [J]. *Histochemistry and cell biology*, 2006, 125(6): 607-613.
- [2] MIYAZAKI T, MATSUZAKI Y. Taurine and liver diseases: A focus on the heterogeneous protective properties of taurine [J]. *Amino acids*, 2014, 46(1): 101-110.
- [3] PINTO W, RÖNNESTAD I, JORDAL A E O, et al. Cloning, tissue and ontogenetic expression of the taurine transporter in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis*) [J]. *Amino acids*, 2012, 42(4): 1317-1327.
- [4] HIGUCHI M, CELINO F T, TAMAI A, et al. The synthesis and role of taurine in the Japanese eel testis [J]. *Amino acids*, 2012, 43(2): 773-781.
- [5] MATSUNARI H, HASHIMOTO H, IWASAKI T, et al. Effect of feeding rotifers enriched with taurine on the growth and survival of larval amberjack *Seriola dumerili* [J]. *Fisheries science*, 2013, 79(5): 815-821.
- [6] KIM C, CHA Y N. Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects [J]. *Amino acids*, 2014, 46(1): 89-100.
- [7] 费东亮, 王宏军. 牛磺酸对染镉鸡脾淋巴细胞膜氧化损伤的保护作用 [J]. *畜牧与兽医*, 2014, 46(8): 65-67.
- [8] 曾德寿, 高振华, 赵京辉, 等. 牛磺酸对肉仔鸡生产性能、免疫器官发育及抗氧化能力的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(6): 774-778.
- [9] RAK K, VÖLKER J, JÜRGENS L, et al. Neurotrophic effects of taurine on spiral ganglion neurons *in vitro* [J]. *Neuroreport*, 2014, 25(16): 1250-1254.
- [10] FUNKE S, AZIMI D, WOLTERS D, et al. Longitudinal analysis of taurine induced effects on the tear proteome of contact lens wearers and dry eye patients using a RP-RP-Capillary-HPLC-MALDI TOF/TOF MS approach [J]. *Journal of proteomics*, 2012, 75(11): 3177-3190.
- [11] GOTO T, MATSUMOTO T, TAKAGI S. Distribution of the hepatic cysteamine dioxygenase activities in fish [J]. *Fisheries science*, 2001, 67(6): 1187-1189.
- [12] TAPPAZ M, ALMARGHINI K, LEGAY F, et al. Taurine biosynthesis enzyme cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) from brain: The long and tricky trail to identification [J]. *Neurochemical research*, 1992, 17(9): 849-859.
- [13] GOTO T, MATSUMOTO T, MURAKAMI S, et al. Conversion of cysteine into taurine in liver of fish [J]. *Fisheries science*, 2003, 69(1): 216-218.
- [14] UBUKA T, OKADA A, NAKAMURA H. Production of hypotaurine from L-cysteinesulfinate by rat liver mitochondria [J]. *Amino acids*, 2008, 35(1): 53-58.
- [15] 叶思平, 陈悦娇, 陈海光, 等. 高效液相色谱测定益智仁中的牛磺酸含量 [J]. *食品科学*, 2013, 34(10): 204-206.
- [16] 陈申如, 胡阳, 倪辉, 等. 高效液相色谱法测定牡蛎中牛磺酸含量 [J]. *中国食品学报*, 2013, 13(2): 193-198.
- [17] 柳小英, 毛丽沙, 鲍敏洁, 等. 高效液相色谱法测定海洋生物中牛磺酸的含量 [J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(31): 1-3, 11.