

含量,也能促进肝脏内 GST、GR、GSH-Px 等酶的活性,所以,OPS 可能通过增强 GST 等酶的活性,加快 CCl_3 的清除作用,阻止肝细胞脂质过氧化反应,维持细胞膜的正常结构,避免细胞损伤,从而发挥护肝作用。因而 OPS 的保肝机制可能与其对抗自由基脂质过氧化密切相关。

Galati 等^[8]报道仙人掌果汁对 CCl_4 中毒大鼠有保护作用,Ncibi 等^[9]报道仙人掌茎提取物对有机含磷杀虫剂-毒死蜱诱导的肝损伤有保护作用,但至今未见到有关明确指出仙人掌中治疗肝损伤有效成分的报道。然而,OPS 中剂量组的抗氧化系统某些指标优于高剂量组和低剂量组,但改善血清转氨酶活性的能力低于高剂量组,提示 OPS 护肝作用的机制除提高机体抗氧化能力外,还可能存在其它机制,这有待进一步研究。

参考文献:

[1] Bwititi P T. Effects of *Opuntia megacantha* leaves extract on renal elec-

trolyte and fluid handling in streptozotocin (STZ)-diabetic rats[J]. Ren Fail, 2001, 23(2): 149-158.

[2] Laurenz J C, Collier C C, Kuti J O. Hypoglycaemic effect of *Opuntia lindheimeri* Englem in a diabetic pig model[J]. Phytother Res, 2003, 17(1): 26-29.

[3] Galati E M. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study[J]. Ethnopharmacol, 2001, 76(1): 1-9.

[4] 王素芳,黄娇. 仙人掌多糖的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(3): 186-188.

[5] 兰琦杰,曾富华,张松莲. 仙人掌粗多糖提取条件优化[J]. 湛江师范学院学报, 2006, 27(6): 75-79.

[6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第三版. 北京:人民卫生出版社, 2002, 1346.

[7] Palmes D, Spiegel H U. Animal models of liver regeneration[J]. Biomaterials, 2004, 25(9): 1601-1611.

[8] Galati E M, Mondello M R, Lauriano E R, et al. *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice protects liver from carbon tetrachloride-induced injury[J]. Phytother Res, 2005, 19(9): 796-800.

[9] Ncibi S, Ben Othman M, Akacha A, et al. *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(2): 797-802.

邻苯二甲醛柱前衍生化高效液相色谱法测定组织中肌肽含量

杨 菁, 吴国强, 白 剑, 樊 淼, 刘春娜, 王洪新

(辽宁医学院 药物研究所, 辽宁 锦州 121001)

摘 要:目的 建立测定小鼠各组织肌肽含量的高效液相色谱法。方法 采用 C_{18} 色谱柱,以甲醇和 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 3.5)为流动相,用邻苯二甲醛为柱前衍生剂,在柱温 38℃下采用二元梯度洗脱,对小鼠各组织中的肌肽含量进行了测定。结果 肌肽在 0.63~10.00 $\mu\text{g/mL}$ 时峰面积与进样质量浓度有良好的线性关系,其相关系数为 0.999 6。回收率在 98.2%~99.7%之间。检测限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ($S/N=10$)。结论 该法灵敏可靠、专属性强、重现性好。小鼠心脏、肝脏、肾脏、大脑皮层和海马中肌肽含量分别为 123.67, 22.86, 158.86, 76.57, 81.86 mg/g。

关键词: 肌肽; 高效液相色谱法; 荧光检测; 邻苯二甲醛; 含量测定

中图分类号: Q593 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2009)04-0258-03

Determination of carnosine by reversed phased high performance liquid chromatography with precolumn O-phthalaldehyde derivation

YANG Jing, WU Guo-qiang, BAI Jian, FAN Miao, LIU Chun-na, WANG Hong-xin

(The Laboratory of Drug R&D, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China)

收稿日期: 2009-02-13

基金项目: 辽宁省自然科学基金(20072202); 辽宁省教育厅资助课题(20060528)

作者简介: 杨菁(1968-),男,辽宁锦州人,副教授,博士,研究方向为神经生物学及相关药物研究, E-mail: jzyangjing@gmail.com。

Abstract :Purpose To establish HPLC method for the determination of carnosine in tissue. **Methods** The sample was derived with *O*-phthalaldehyde (OPA), and then the derivative sample was separated on Kromail C₁₈ column at 38 °C. A linear gradient elution of A (methanol) and B (0.05 mol/L phosphate buffer, pH 3.5) was used. The flow rate was 1 mL/min, and detected by fluorescence detector with excitation wavelength (λ_{ex}) at 338 nm and emission wavelength (λ_{em}) at 425 nm. **Results** The calibration curve was liner within the ranges of 0.63-10.00 μ g/mL. The correlation coefficient was 0.999 6. The recoveries were between 98.2 %-99.7 %. Detection limit of carnosine was 0.05 μ g/mL ($S/N = 10$). **Conclusion** The result shows that this method is simple, rapid, specific, accurate and reproducible. The contents of Carnosine in rat's heart, liver, kidney, cortex and hippocampus were 123.67, 22.86, 158.86, 76.57 and 81.86 mg/g (wet weight).

Key words: carnosine; HPLC; fluorescence; *O*-phthalaldehyde; determination

肌肽最早在 1900 年由前苏联学者 Gulewitsch 和 Amiradibi 从牛肉提取物中检测到,是一种水溶性的天然二肽化合物^[1]。在生物体内由肌肽合成酶利用 β -丙氨酸和 *L*-组氨酸合成。肌肽具有广泛的生物学作用,如抗氧化、清除自由基、抗糖基化、调节生理 pH 值等^[2]。尽管越来越多的研究表明,肌肽可以预防多种疾病,如阿尔茨海默病^[3]、脑缺血性疾病^[4]等,但在生物体内肌肽的变化规律依然是一个谜^[5],因此检测生物体内肌肽的含量具有重要意义。本文建立了高效液相色谱 (HPLC) 法测定组织中肌肽含量的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪(包括 LC-10Avp 泵、柱温箱、荧光检测器及柱温箱等),日本岛津;KQ-250 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;VCR105 型超声波粉碎机,德国;Mikro 22R 型冷冻离心机,德国。

1.2 试剂与动物

肌肽(含量大于 99.0 %)、邻苯二甲醛(*O*-phthalaldehyde, OPA)为 Sigma 公司产品。甲醇为色谱纯;其余试剂均为国产分析纯。

昆明种小鼠,体重 18 ~ 20 g,雌雄各半,由辽宁医学院动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

对照品溶液的制备:称取肌肽对照品 2.5 mg,加水稀释至 500 mL,即得 5 μ g/mL 肌肽对照品溶液。

供试品溶液的制备^[6]:取小鼠组织 10 ~ 50 mg,加水 1 mL 后,超声粉碎 5 个循环,每个循环为 10 s,间隔 10 s,强度为 90 %。再加入三氟乙酸 10 μ L,混匀,12 000 r/min 离心 20 min,分离上清,上清过 0.22 μ m 微孔滤膜,为供试品溶液。

2.2 对照品和供试品的衍生化

OPA 衍生化溶液的配制:称取 OPA 10.0 mg,加甲醇 1.0 mL, pH 9 的 0.04 mol/L 硼酸钠溶液 9 mL,二巯基乙醇 40 μ L,混匀避光保存。当日使用。

衍生化方法:取供试品或对照品溶液 200 μ L,加入 OPA 衍生化溶液 400 μ L,混匀避光 3 min 内,取 20 μ L 进样。

2.3 色谱条件

色谱柱:Kromail C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 3.5),梯度洗脱(表 1),流速 1.0 mL/min;荧光检测波长 425 nm,激发波长 338 nm。柱温:38 °C;进样量 10 μ L。

表 1 梯度洗脱条件

Tab. 1 HPLC gradient conditions

<i>t</i> /min	流动相 A/ %	流动相 B/ %
0.0	20	80
30.0	25	75
31.0	60	40
35.0	60	40
36.0	20	80
48.0	20	80

2.4 方法学研究

2.4.1 专属性 肌肽对照品与供试品按照含量测定色谱条件进行实验,色谱图见图 1 和 2。表明供试品中杂质不干扰肌肽含量测定。

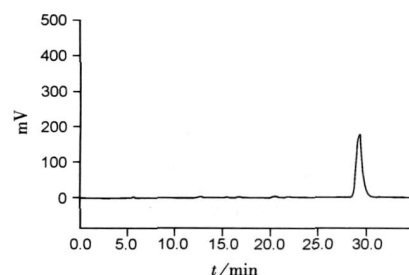


图 1 肌肽对照品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of standard carnosine

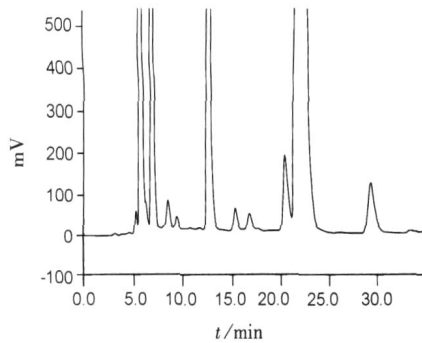


图 2 供试品 HPLC 图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of sample

2.4.2 标准曲线、稳定性、检测限 取 10.00, 5.00, 2.50, 1.25, 0.63 $\mu\text{g/mL}$ 的肌肽对照品溶液, 依法衍生化后各取 10 μL , 分别注入液相色谱仪测定, 以对照品浓度 ($C, \mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 以相应的峰面积 (A) 为纵坐标, 进行回归分析, 回归方程为: $A = 10^6 C + 448\,520$, $r = 0.999\,6$, 说明肌肽在 0.63 ~ 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 内与峰面积呈良好的线性关系。

为考察供试品溶液中肌肽的稳定性, 将供试品溶液在室温放置 0, 3, 9, 12 h 后再衍生进行含量测定, RSD 为 0.91 %, 表明肌肽溶液在未衍生条件下, 室温 12 h 内稳定。

将肌肽对照品溶液逐级稀释进样, 测定其峰高响应值和基线噪声强度, 在 $S/N = 10$ 时, 检出限为 50 $\mu\text{g/L}$ 。

2.4.3 回收率 取已知含量的不同样品组织, 分别准确加入肌肽对照品后, 制备供试品溶液, 衍生化后进行测定, 结果见表 2。本法回收率在 98.2 % ~ 99.7 % 之间。

表 2 肌肽加标回收率 ($n = 3$)

Tab. 2 Recoveries of carnosine ($n = 3$)

组织	平均回收率/ %	$RSD/ \%$
心脏	98.8	1.8
肝脏	99.8	1.3
肾脏	98.2	1.6
大脑皮层	99.0	1.3
脑海马组织	99.7	1.8

2.5 小鼠组织中肌肽含量测定

分别取小鼠的心脏、肝脏、肾脏、大脑皮层、脑海马组织 10 ~ 50 mg, 加水 1 mL, 超声粉碎 5 个循环, 每个循环为 10 s, 间隔 10 s, 强度为 90 %。再加入三氟乙酸 10 μL , 混匀, 12 000 r/min 离心 20 min, 分离上清, 上清过 0.22 μm 微孔滤膜。取上清溶液或对照品溶液 200 μL , 加入 OPA 衍生液 400 μL , 混匀避光 3

min, 取 20 μL 注入液相色谱仪。按外标法以峰面积计算肌肽含量, 结果见表 3。可见, 肾脏和心脏中肌肽含量较高, 而肝脏中含量最少。

表 3 小鼠各组织所含肌肽测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 3 Content of carnosine in mouse tissue ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组织	肌肽 (mg/g 湿重)
心脏	123.67 $\pm$ 25.73
肝脏	22.86 $\pm$ 4.28
肾脏	158.86 $\pm$ 42.36
大脑皮层	76.57 $\pm$ 12.03
脑海马组织	81.86 $\pm$ 19.69

3 讨论

肌肽含量测定有比色法^[7]、HPLC 法及化学发光法^[8]。HPLC 法测定肌肽含量常采用紫外监测器测定^[9-10], 但由于紫外检出限较高, 所需样品量较大 (通常需要几克), 不适合样品量小, 如仅有十几毫克的小鼠海马组织中肌肽含量的测定。本文利用 OPA 对肌肽进行了衍生, 选用 C_{18} 柱、荧光检测来测定肌肽含量, 建立了一种需样品量较少、且更灵敏的测定生物体内肌肽含量的方法。为进一步研究在各种病理情况下肌肽变化规律提供了可靠的手段。

参考文献:

[1] Guioetto A, Calderan A, Ruzza P, et al. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review[J]. Curr Med Chem, 2005, 12(20): 2293-2315.

[2] 沈杰, 刘超, 陈钧辉. 肌肽在医药方面的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(2): 134-137.

[3] Fonteh A N, Harrington R J, Tsai A, et al. Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects[J]. Amino Acids, 2007, 32(2): 213-224.

[4] Dobrota D, Fedotova T, Stvolinsky S, et al. Carnosine protects the brain of rats and Mongolian gerbils against ischemic injury: after-stroke effect[J]. Neurochem Res, 2005, 30(10): 1283-1288.

[5] Bauer K. Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain[J]. Neurochem Res, 2005, 30(10): 1339-1345.

[6] Aristoy M C, Soler C, Toldra F. A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants[J]. Food Chem, 2004, 84: 485-491.

[7] 孔海松, 孔祥平, 许可, 等. 心脑肌肽含量的测定方法[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(2): 104-106.

[8] Achyuthan K E. Low-level chemiluminescence of *N*-beta-alanyl-L-histidine (*L*-carnosine) [J]. Luminescence, 1999, 14: 245-253.

[9] 田颖刚, 谢明勇, 王维亚, 等. 乌骨鸡肌肉中肌肽的鉴定与测定[J]. 分析试验室, 2007, (1): 5-8.

[10] Tranberg M, Stridh M H, Jilderos B, et al. Reversed-phase HPLC with UV detection for the determination of *N*-acetylaspargate and creatine [J]. Anal Biochem, 2005, 343(1): 179-182.