

蓝蛤中 L-肉碱含量的检测*

THE DETERMINATION OF L-CARNITINE IN *Aloididae aloidis*

吴海歌 刘发义 李光友

(国家海洋局第一海洋研究所海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

关键词 蓝蛤, L-肉碱, 含量检测

肉毒碱(Carnitine)简称肉碱,化学名称 β -羟基-L-三甲基氨基丁酸,是一类非蛋白氨基酸。有D型和L型,其中只有L-肉碱(L-Carnitine)有生理活性,又称维生素B₁₂。早在1905年Gulewitsch等就从肉抽提物(Liebig's meat extract)中发现肉碱;1959年Fritz发现肉碱能促进脂肪代谢速率(称之 β -氧化),确定了左旋肉碱对人体脂肪氧化的重要作用;1993年美国食品及药品管理局专家委员会确认L-肉碱为G.R.A.S(公认安全无毒),其原料及制剂均被美国药典第22,23版收载。沈同^[1]在其《生物化学》一书中明确表述L-肉碱是动物体内脂肪代谢不可缺少的物质;由于其在生物体代谢过程中所起的重要作用,已经在医疗、保健、食品等领域得到广泛的应用^[1],如作为药物可用于治疗心血管疾病、神经系统疾病、脂肪肝、胃病等;作为功能性食品可用于运动食品、减肥食品、抗衰老食品、婴儿食品等;作为饲料添加剂可添加于水产养殖动物和家禽等动物的饲料中,因此市场潜力很大。

虽然世界各国研究人员对肉碱的生理、生化、营养和临床等方面进行了深入而广泛的研究,但是国内对L-肉碱的研究甚少,尤其是关于检测L-肉碱含量的报道还未见报道。除牛肉等肉食品外,国外也已有海洋贝类牡蛎、蛤蜊中含有丰富的L-肉碱的报道^[2]。本研究报告蓝蛤L-肉碱含量的检测结果,以期为低值贝类的综合利用,以及胶州湾和环渤海蓝蛤资源的开发利用提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

蓝蛤(*Aloididae aloidis*)于1999年10月采自青岛市红岛浅海滩涂;牛肉在实验当日购于市场。

L-肉碱标准品购于Sigma公司。实验所用试剂均为分析纯。

1,2-二氯乙烷的处理:为了保证实验结果的准确,将分析纯的1,2-二氯乙烷在分液漏斗中与1/5体积的1 mol/L NaOH混合振荡,去掉水相后,再与1/5体积的1 mol/L HCl混合振荡。最后用1/2体积的蒸馏水洗3~4次,以除去其中可能存在的离子。

异戊醇处理同上。

CM25离子交换柱:取1g CM25葡聚糖凝胶,用2 mol/L NaOH转为Na⁺型,并用蒸馏水洗至中性,将其悬浮于蒸馏水中,慢慢且均匀地注入10 mm×150 mm层析柱中,依次用12 ml蒸馏水、0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH=7.0)淋洗以平衡层析柱,再用12 ml蒸馏水淋洗后备用。

1.2 方 法

参考Friedman 1958年^[4]和Myron等1962年^[5]报道的方法。L-肉碱的羟基在酸性条件下与乙醇反应变成酯,酯在弱碱条件下被溴酚蓝染色,颜色的深浅与L-肉碱的浓度呈正比关系。用1,2-二氯乙烷将染色后的L-肉碱抽提出来,用分光光度计测定。

1.2.1 标准曲线的绘制 准确称取L-肉碱标准品10.92 mg,溶于20 ml无水乙醇,加入5滴浓盐酸,松松加一玻璃塞,于80℃水浴中振荡55 min,去塞,蒸发出酸和酒精。然后用60% K₂HPO₄,无水Na₂CO₃,0.75%溴酚蓝和1,2-二氯乙烷4种制剂配

* 国家海洋局青年基金资助项目99604号。

第一作者:吴海歌,出生于1975年,在读硕士研究生。青岛市高科园仙霞岭路国家海洋局第一海洋研究所生物制品中心(266061),E-mail:haige-hu@163.com

收稿日期:2001-02-16;修回日期:2001-05-16

制成如下标准液：0, 7.80, 15.60, 23.40, 31.20, 39.00, 46.80 ml/L。具体操作为：向处理过的 L 肉碱中加入 60% K₂HPO₄, 无水 Na₂CO₃ 和 0.75% 溴酚蓝, 放置 10 min 后, 加 1, 2-二氯乙烷, 使 4 种试剂的比例为 1:0.3:0.5:5 (V/W/V/V), 剧烈振荡 10 min, 静置 2 min, 用 721 分光光度计于 602 nm 处测吸光值, 所得结果以最小二乘法计算得回归方程: $Y = 41.518X - 72.418$, $r = 0.9846$ 其中: Y 为标准液的浓度, X 为吸光值, r 为线性相关系数。

1.2.2 实验粗材料的处理 因为牛肉的 L 肉碱含量最高, 为了检验实验方法, 实验同时测定了牛肉中 L 肉碱的含量。新鲜的蓝蛤或牛肉与 5 倍体积 (W/V) 的 95% 乙醇匀浆, 过滤; 残渣用 1 倍体积的 95% 乙醇洗涤; 合并滤液。取 1 ml 滤液, 加入 1 ml 0.15 mol/L Ba(OH)₂ 和 1 ml 5% ZnSO₄·7H₂O 溶液, 搅拌出现絮状, 以 12 000 r/min 转速离心 10 min; 用蒸馏水清洗沉淀 3 次, 合并上清液, 并定容至 10 ml。向 1 ml 上清液中加入 1 ml 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH=7.0), 过事先准备好的离子交换柱, 用 15 ml 蒸馏水洗脱交换柱, 收集洗脱液, 于 80℃ 烘箱中干燥, 得干燥的蓝蛤或牛肉洗脱物。

1.2.3 样品中 L 肉碱含量的检测 向干燥的洗脱物中加入 10 ml 无水乙醇和 2 滴浓盐酸, 加一石塞, 稍松, 于 80℃ 水浴中振荡 55 min, 去塞, 蒸干; 加入 1 ml 60% K₂HPO₄, 300 mg 无水 Na₂CO₃, 0.5 ml 0.75% 溴酚蓝, 静置 10 min, 加入 5 ml 1, 2-二氯乙烷, 剧烈振荡 10 min 后, 静置 2 min, 用 721 分光光度计于 602 nm 处测吸光值, 将所得结果代入回归方程, 计算样品中 L 肉碱含量。

2 结果

对蓝蛤、牛肉中 L 肉碱含量的测定结果见表 1。为了便于比较, 同时将牡蛎、蛤蜊^[3]的相应数值一并列出。由表 1 可以看出, 牛肉中 L 肉碱的含量最高, 而 3 种海洋贝类中蓝蛤的 L 肉碱含量略高于牡蛎和蛤蜊的, 即每克蓝蛤中含 L 肉碱 0.248 mg。

3 讨论与小结

蓝蛤是一种低值海洋贝类, 个体很小 (只有黄豆大小俗称海砂子), 在渤海湾和胶州湾有大量分

表 1 蓝蛤中 L-肉碱的含量

样品(g)	含量(mg)
蓝蛤	0.248
牡蛎	0.231
蛤蜊	0.238
牛肉	0.953

布, “八五”期间河北黄骅地区在浅海滩涂上通过人工增殖, 10 000 m² 的滩涂一年就采捕蓝蛤 5 600 t, 资源非常丰富。由表 1 可以看出, 与牡蛎、蛤蜊相比, 低值贝类蓝蛤中 L 肉碱含量却最高。据小仓阳 1980 年报道, L 肉碱作为饲料添加剂能促进动物生长、提高免疫力并改善其肉质, 使鱼虾类条形好、色泽好、不掉鳞、耐运输、经济效益显著。实践证明蓝蛤是一种很好的生物饵料, 以蓝蛤为饵料的对虾生长速度很快, 这可能与其中含有较多 L 肉碱有一定的关系。随着人们生活水平的提高, 保健意识的增强, 对 L 肉碱的需求必将大大增加。而目前 L 肉碱只有瑞士、意大利、日本等少数几个国家能生产, 国内对该物质的研究开发甚少, 需求全靠进口, 价格十分昂贵。由于蓝蛤中 L 肉碱含量较高, 资源非常丰富, 所以有望成为开发 L 肉碱的原材料, 进而开发出 L 肉碱为主要原料的药物、功能食品、饲料添加剂等, 以弥补国内市场的不足。

参考文献

- 赖卫华, 许杨, 陆豫. 左旋肉碱的生理功能、应用及制备, 食品工业科技, 1998, 6: 75~77
- 崔德山编译. 含 L-肉毒碱的食品原料“卡尔尼奇”, 食品文摘, 1999, 7: 11~13
- 沈同, 王镜岩主编. 生物化学. 第 2 版(下册). 北京: 北京大学出版社, 1990. 153~154
- Friedman. Determination of carnitine in biological materials, *Ach. Biochem Biophys*, 1958, 75: 24~30
- Myron A. M., George W.. Studies on the distribution of free carnitine and the occurrence and nature of bound carnitine, *Ach. Biochem. Biophys.*, 1962, 98: 146~153

(本文编辑: 刘珊珊)