

比色法测定 *L*-肉碱酯化体系中的酰基肉碱*

田金强^{1,2}, 王 强^{1,2}, 周素梅²

1(江南大学食品学院 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡, 214122)

2(中国农业科学院农产品加工研究所, 北京, 100094)

摘 要 以乙酰-*L*-肉碱为例阐明了 *L*-肉碱酯化体系中酰基-*L*-肉碱比色测定的方法。显色反应在有机溶液-盐溶液两相体系中进行, 有机溶液为每 100 mL 1,2-二氯乙烷-异戊醇混合溶液(体积比 96:4)加入 0.05 g 溴酚蓝, 12~25 °C 显色反应条件下, 盐溶液为每 100 mL 55% K_2HPO_4 水溶液加入 14 g Na_2CO_3 。两相显色体系的乙酰-*L*-肉碱含量在 0.004 5~0.025 4 g 范围内同显色反应吸光度成线性关系($R^2 > 0.99$)。 *L*-肉碱酯化体系加标回收率为 99.53%~103.33%, 相对偏差低于 4.30%, 检测限为 0.441 mg, 准确度、精密度和灵敏性均较好。该方法不受 *L*-肉碱的干扰, 为酰基-*L*-肉碱的制备研究提供了有效、经济、快速的检测方法。

关键词 酰基-*L*-肉碱, 乙酰-*L*-肉碱, 比色法, 酯化

酰基-*L*-肉碱是 *L*-肉碱的酯化产物, 广泛用于食品、功能食品、医药、化妆品等领域^[1,2]。不同酯化形式的 *L*-肉碱(如乙酰-*L*-肉碱、丙酰-*L*-肉碱、丁酰-*L*-肉碱、异戊酰-*L*-肉碱等)其营养、保健功能、药效和应用范围不同, 研究开发很有必要。酰基-*L*-肉碱可以由 *L*-肉碱和脂肪酸(或脂肪酸衍生物)通过化学催化酯化或酶法催化酯化来合成。目前, 酰基-*L*-肉碱的检测方法有酶法、气相色谱化学电离质谱法(GC-CIMS)、高效液相色谱法(HPLC)和质谱法(MS)^[3]。酶法是一种间接的检测方法, 通过测定酰基-*L*-肉碱水解后生成 *L*-肉碱的量来计算其含量, 测定结果受酯化底物 *L*-肉碱的影响, 很多方面满足不了科研要求, 同时酶法所用试剂尤其是酶制剂价格昂贵。以上其它方法均需要高级昂贵的仪器设备, 不适合国内研究需要。因此, 建立一种有效、经济、快速的酰基-*L*-肉碱检测方法是必要的。比色法是一种常用的检测方法, 由于其具有操作简单、设备价格便宜等特点而广泛应用于国内研究。文中采用比色法测定酰基-*L*-肉碱。

1 实验部分

1.1 实验原理

酰基-*L*-肉碱的比色测定, 显色反应在有机溶液-盐溶液两相体系中进行, 有机溶液为溴酚蓝的二氯乙烷-异戊醇混合溶液, 盐溶液为 K_2HPO_4 - Na_2CO_3 混合盐的水溶液。作为显色剂的溴酚蓝为阴离子两性

试剂, 在 pH 9.8~12 的条件下可以和带有一 N^+ (CH_3)₃ 的酰基-*L*-肉碱结合, 以离子对的形式进入有机相中。而没有形成离子对的过量溴酚蓝则进入盐水相中。进入有机相中溴酚蓝的量和体系中酰基-*L*-肉碱的含量成线性关系, 由此可以通过测定有机相的吸光度来计算体系中酰基-*L*-肉碱的含量。若显色反应采用有机溶液-水(或含低浓度盐)体系, 以上离子对和溴酚蓝则均进入水相, 加入一定量的 K_2HPO_4 , 由于其盐析等作用可使离子对进入有机相, 从而使形成离子对的溴酚蓝和过量溴酚蓝相分离。异戊醇的添加, 使两相界面更加清晰。

1.2 仪器与试剂

UV-1201 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), WH-3 微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器有限公司), LXJ-IIB 离心机(上海安亭科学仪器厂)。乙酸乙酯(上海化学试剂公司), 异戊醇(天津市永大化学试剂开发中心), 1,2-二氯乙烷、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、 Na_2CO_3 、乙腈、甲醇为北京化工厂产品。以上试剂均为分析纯。溴酚蓝(符合 GB/T12592-1990, 北京化学试剂公司), 乙酰-*L*-肉碱(纯度 99%, 东北制药总厂), 水为 1 次蒸馏。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂配制

0.05% 溴酚蓝的 1,2-二氯乙烷-异戊醇溶液(有机溶液): 将 0.05 g 溴酚蓝溶解于 100 mL 1,2-二氯乙烷和异戊醇的混合液中(体积比 96:4), 用定量中速滤纸过滤。

K_2HPO_4 - Na_2CO_3 水溶液(盐溶液): 将 Na_2CO_3 溶解于一定浓度的 K_2HPO_4 水溶液中, 离心后取上

第一作者: 在读博士, 副教授。

* 中国农业科学院杰出人才基金资助

收稿日期: 2007-11-16, 改回日期 2008-2-22

清液。

1.3.2 测试步骤

样品加入直径 20 mm 的离心管→加入 2.00 mL 盐溶液,轻摇离心管使样品溶解→加入 5 mL 有机溶液,漩涡振荡 1 min→静置 10 min→漩涡振荡 10 min→4 200 r/min 离心 1 min→取上层有机相 600 nm 比色测定。以不含样品的同样处理液作为对照。

1.3.3 L-肉碱酯化体系加标回收率的测定

本试验由 L-肉碱和乙酸乙烯酯在脂肪酶催化下合成乙酰-L-肉碱,未进行反应的 L-肉碱酯化体系含有乙腈、L-肉碱、乙酸乙烯酯和脂肪酶(Novozym435)。在未反应酯化体系中添加已知量的 L-肉碱标样,以上物质用甲醇定容到 10 mL 容量瓶中,取 5 mL 溶液移入直径 20 mL 的离心管,真空去除溶剂后即可按上述步骤比色测定。

1.3.4 检测限试验

对空白样品(真实空白)进行 20 次重复测定,以 3 倍标准偏差和标准曲线斜率的比值计算检测限。

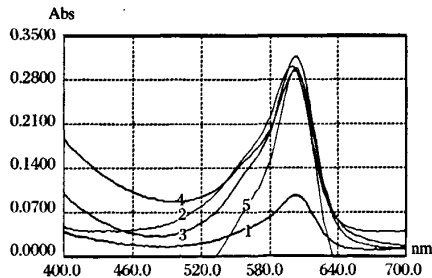
1.3.5 处理差异显著性检验方法

采用 DPS 软件进行邓肯氏差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 显色反应的最大吸收波长

对不同盐溶液的显色反应在 400~800 nm 进行光谱扫描,找出最大吸收波长。图 1 表明,不同盐溶液的显色反应最大吸收波长均在 600 nm 左右。



1—55%K₂HPO₄ 的 Na₂CO₃ 饱和溶液;2—6 g Na₂CO₃/100 mL 55%K₂HPO₄;3—8 g Na₂CO₃/100 mL 55%K₂HPO₄;4—12 g Na₂CO₃/100 mL 55%K₂HPO₄;5—14 g Na₂CO₃/100 mL 55%K₂HPO₄

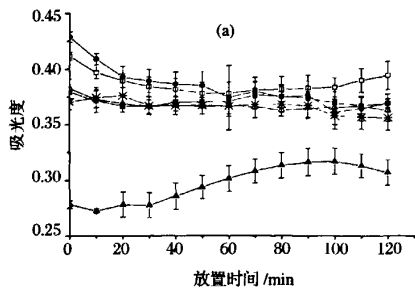
图 1 不同盐溶液的显色反应波长扫描光谱

(注:显色体系乙酰-L-肉碱含量 0.0100 g,室内温度 13 ℃)

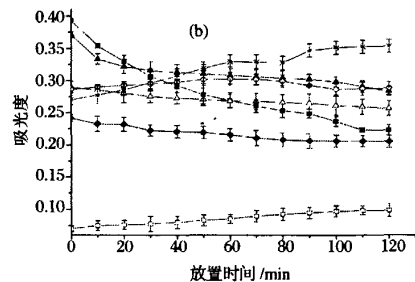
2.2 最佳盐溶液组成的确定

显色反应 2 h 之内吸光度波动不能太大,以保证 1 次测定多个样品时结果的准确性。另外,体系条件应使显色反应吸光度尽可能大,吸光度越大该方法越

敏锐。不同盐溶液组成显色反应吸光度的稳定性及其大小见图 2。



—▲— 55%K₂HPO₄ 的 Na₂CO₃ 饱和溶液 —■— 14 g Na₂CO₃/100 mL 55%K₂HPO₄ —●— 12 g Na₂CO₃/100 mL 55%K₂HPO₄ —△— 10 g Na₂CO₃/100 mL 55%K₂HPO₄ —◆— 8 g Na₂CO₃/100 mL 55%K₂HPO₄ —□— 6 g Na₂CO₃/100 mL 55%K₂HPO₄



—◇— 60%K₂HPO₄ 的 Na₂CO₃ 饱和溶液 —◆— 50%K₂HPO₄ 的 Na₂CO₃ 饱和溶液 —■— 30%K₂HPO₄ 的 Na₂CO₃ 饱和溶液 —★— 6 g Na₂CO₃/100 mL 60%K₂HPO₄ 1—▲— 5 g Na₂CO₃/100 mL 50%K₂HPO₄ —△— 10 g Na₂CO₃/100 mL 50%K₂HPO₄

图 2 不同盐溶液组成显色反应吸光度随时间的变化

(注:显色体系乙酰-L-肉碱含量 0.0120 g,室内温度 13 ℃)

由图 2 可知,4 g Na₂CO₃/100 mL 60% K₂HPO₄、60% K₂HPO₄ 的 Na₂CO₃ 饱和溶液、10 g Na₂CO₃/100 mL 55% K₂HPO₄、12 g Na₂CO₃/100 mL 55% K₂HPO₄、14 g Na₂CO₃/100 mL 55% K₂HPO₄,以上盐溶液显色反应的吸光度稳定性均较好。但最终确定 14 g Na₂CO₃/100 mL 55% K₂HPO₄ 为最佳,这主要基于以下考虑:4 g Na₂CO₃/100 mL 60% K₂HPO₄ 和 60% K₂HPO₄ 的 Na₂CO₃ 饱和溶液显色反应的吸光度较低,且两种溶液的黏度较大,给量取等操作带来不便;8 g Na₂CO₃/100 mL 55% K₂HPO₄、10 g Na₂CO₃/100 mL 55% K₂HPO₄、12 g Na₂CO₃/100 mL 55% K₂HPO₄、14 g Na₂CO₃/100 mL 55% K₂HPO₄ 显色反应的吸光度非常接近,因此,选择 14 g Na₂CO₃/100 mL 55% K₂HPO₄ 可以缓冲由于乙酰-L-肉碱(带有-COOH)和 Na₂CO₃ 的中和引起的显色反应吸光度的波动。

2.3 不同乙酰-L-肉碱含量显色反应吸光度随时间的变化

如上所述,14 g Na_2CO_3 /100 mL 55% K_2HPO_4 可以缓冲由于乙酰-L-肉碱和 Na_2CO_3 中和引起的吸光度的波动。但若体系中乙酰-L-肉碱超过一定量,盐溶液可能失去缓冲作用。图3中描述了不同乙酰-L-肉碱含量显色反应吸光度随时间的变化。

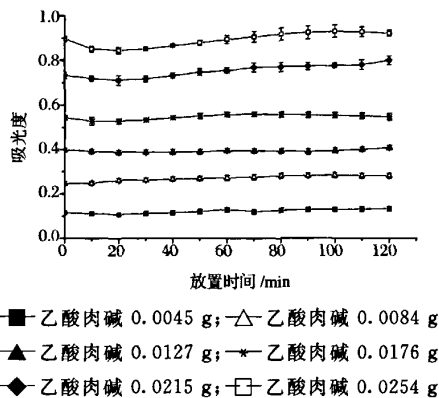


图3 显色体系不同乙酰-L-肉碱含量吸光度随时间的变化
(室内温度 13℃)

由图3可知,显色体系乙酰-L-肉碱含量在0.0045 g~0.0254 g,显色反应的吸光度均能在2 h之内保持稳定。

2.4 显色反应标准曲线

由图4可知,显色体系乙酰-L-肉碱含量在0.0045 g~0.0254 g范围内同显色反应吸光度成线性关系($R^2 > 0.99$),比色测定时4 min后读数标准曲线的拟合度最高, $R^2=0.9984$,由此求出相关系数 $r=0.9992$ 。

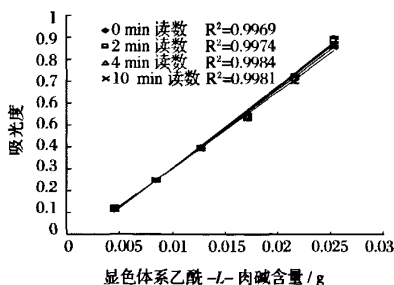


图4 显色反应标准曲线
(室内温度 13℃)

2.5 温度对测定结果的影响

盐溶液的极性、溶解性等性质和受温度影响的水分活度密切相关^[4,5],同时,从热力学的角度,温度影响着萃取反应的萃取平衡常数^[4],因此温度影响本方法的测定结果。由表1可知,14 g Na_2CO_3 /100 mL

55% K_2HPO_4 的盐溶液,在12~25℃,同样乙酰-L-肉碱含量的显色反应吸光度没有显著的变化,但在25~30℃吸光度变动较大,需要重新设定盐溶液组成等反应条件。

表1 不同温度条件下显色反应的吸光度

显色反应温度/℃	12	25	30
吸光度	0.418	0.434	0.133
	0.422	0.428	0.129
	0.428	0.429	0.136
平均值	0.423 ± 0.0050^A	0.430 ± 0.0032^A	0.133 ± 0.0035^B

注:显色体系乙酰-L-肉碱含量0.0129 g,不同字母间表示差异极显著(0.01水平)。

2.6 L-肉碱对测定结果的影响

由表2可知,L-肉碱对测定结果没有显著影响。究其原因,L-肉碱分子结构中游离的-OH使其较酰基-L-肉碱增加了亲水性,在显色反应中L-肉碱和溴酚蓝形成的离子对被保留在盐水相。

表2 添加L-肉碱和未添加L-肉碱显色反应吸光度的比较

处理	添加L-肉碱	未添加L-肉碱
吸光度	0.424	0.421
	0.428	0.422
	0.423	0.426
平均值	$0.425 \pm 0.0026^*$	$0.423 \pm 0.0026^*$

注:显色体系乙酰-L-肉碱含量0.0129 g,肉碱0.05 g,室内温度13℃,相同字母间表示差异不显著(0.05水平)。

2.7 L-肉碱酯化体系中标样加入回收率试验

L-肉碱酯化体系中标样加入回收率为99.53%~103.33%,相对标准偏差低于4.30%,准确度和精密度均较好,符合测定要求(见表3)。

表3 标准加入回收率

乙酰肉碱加入量/g	回收量/g	回收率/%	相对标准偏差/%
0.00450	0.00465 ± 0.0002	103.33	4.30
0.0129	0.0133 ± 0.0003	103.10	2.26
0.0215	0.0214 ± 0.0008	99.53	3.74

注:室内温度13℃

2.8 检测限

空白样品吸光度重复20次的测定结果为:0.0329、0.0320、0.0294、0.0325、0.0239、0.0301、0.0211、0.0220、0.0192、0.0322、0.0283、0.0327、0.0323、0.0197、0.0210、0.0305、0.0322、0.0246、0.0197、0.0307,由此得出本方法的检测限为0.441 mg。

3 讨论

本文以乙酰-L-肉碱为例报道了酰基-L-肉碱的检测方法,但该方法适用于所有酰基化形式L-肉碱

的定性、定量检测,不过不同的酰基-L-肉碱需要对盐溶液组成进行适当的调整。

本方法的显色反应是在有机溶液-盐溶液两相体系中的,而在有机溶液-盐溶液-水或有机溶液-水体系中,溴酚蓝-酰基肉碱离子对会被萃取到水相中,因此本方法操作过程中应严防水分混入。

1,2-二氯乙烷的毒性相对较大,能否采用较低毒性的 1,1-二氯乙烷(毒性仅为前者的 1/10)还有待于进一步研究。

参 考 文 献

1 Kamm B, Kamm M, Kiener A. Polycarnitine-a New Bio-material[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005,(67): 1~7

2 Pedro Lozano, Mirta Daz, Teresa de Diego, et al. Ester Synthesis From Trimethylammonium Alcohols in Dry Organic Media Catalyzed by Immobilized *Candida antarctica* Lipase B[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, (82): 352~358

3 Monika Möder, Andreas Kiebling, Heinz Löster. Current Methods for Determination of L-Carnitine and Acylcarnitines[J]. Monatshefte für Chemie, 2005, (136):1 279 ~1 291

4 丁明玉. 现代分离方法与技术[M]. 北京:化学工业出版社,2006.63~64

5 王 璋,许时婴,江 波,等译. 食品化学(第三版)[M]. 北京:轻工业出版社,2003.34~35

Colorimetry Method for Determination of Acylcarnitines in System of Esterification of L-carnitine

Tian Jinqiang^{1,2}, Wang Qiang^{1,2}, Zhou Sumei²

1(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2(Institute of Food Science & Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

ABSTRACT Acetyl-carnitine was sampled to demonstrate colorimetry method for determination of Acylcarnitines in system of esterification of Carnitine. Color reaction was performed in organic solution-salt solution biphasic system. The organic solution was 1,2-Dichloroethane-Isoamyl alcohol mixture (V/V=96 : 4) added Bromophenol blue (per 100 mL added 0.05 g). The salt solution was 55%K₂HPO₄ aqueous solution added Na₂CO₃ (per 100 mL added 14 g), under the temperature of color reaction between 12 °C to 25 °C. There was a linear relationship ($R^2 > 0.99$) between OD value and Acetyl-carnitine content which range ranges from 0.0045 g~0.0254 g in above-mentioned biphasic system. To analyze the system of esterification of Carnitine, the recovery was 99.53%~103.33%, the RSD was below 4.30%, and the detection limit was 0.441 mg. The method was not disturbed by Carnitine. Taken together, an effective, economic and rapid method for determination of Acylcarnitines in system of esterification of Carnitine was established.

Key words acylcarnitines, acetyl-carnitine, colorimetry method, esterification

信
息
窗

粉丝废水中提取食用蛋白技术获得成功

日前,被喻为“废水里捞金”的粉丝浆液中提取分离蛋白技术在烟台双塔食品股份有限公司获得成功,产品达到了食品级要求,这一技术突破,填补了从绿豆、豌豆中提取植物蛋白的国内空白,解决了招远市百年来对粉丝深加工的一个难题。

该技术采用碱溶酸沉、絮凝剂促凝、酶水解和生物发酵技术脱苦脱腥,以及挤压改性技术,从绿豆、豌豆粉丝浆液中提取淀粉的同时提取分离蛋白和膳食纤维。经资深专家组成的项目鉴定委员会鉴定,蛋白回收率达到 95.5%,膳食纤维回收率 95%以上,分离蛋白的纯度达 90%以上,口感、功能性等各项指标均达到国际先进水平。

该项技术是烟台双塔食品股份有限公司先后同北京西贝技术研究所、武汉工业学院食品学院等科研单位历时 5 年研发成功的,在经过研发、小试、中试等生产试验阶段后,已进入工业化生产阶段。

绿豆和豌豆是招远很多粉丝企业生产的原料,此前提取蛋白只是停留在饲料级上,而食用级蛋白的提取成功,将大大提高粉丝行业的经济效益,增加产品的科技含量和附加值,而且能有效解决粉丝生产过程中的环境污染问题。