

四种海螺中左卡尼汀及其酰化物含量比较

曹玉^{1,2}, 王晨静², 赵霞³, 李存友³, 王宏广³, 王春波³, 管华诗¹

(1 中国海洋大学医药学院, 山东青岛 266100; 2 青岛大学医学院附属医院;

3 青岛大学医学院)

摘要: 目的 比较斑玉螺、疣荔枝螺、海螺、钝拟蟹守螺中左卡尼汀(LC)及其代谢产生的酰化物乙酰左卡尼汀(ALC)和丙酰左卡尼汀(PLC)的含量。方法 海螺样品以3倍量的3%高氯酸匀浆提取后,用1-氨基蒽衍生化,荧光衍生化高效液相色谱法(HPLC)检测各种海螺中LC、ALC、PLC含量。结果 荧光衍生化HPLC精密度<4%、回收率96%~103%、稳定性<3.8%,均满足方法学要求。4种海螺中LC、ALC、PLC含量:LC:钝拟蟹守螺>疣荔枝螺>斑玉螺>海螺;ALC:钝拟蟹守螺>疣荔枝螺>斑玉螺>海螺;PLC:钝拟蟹守螺>斑玉螺>海螺>疣荔枝螺。结论 4种海螺中均能检测出LC、ALC、PLC,以钝拟蟹守螺中含量最高。

关键词: 左卡尼汀;乙酰左卡尼汀;丙酰左卡尼汀;高效液相色谱法;螺

doi: 10.3969/j.issn.1002-266X.2013.21.005

中图分类号: R977.2 文献标志码: A 文章编号: 1002-266X(2013)21-0014-03

Determination of L-carnitine and its acylates in four sea snails

CAO Yu¹, WANG Chen-jing, ZHAO Xia, LI Cun-you, WANG Hong-guang, WANG Chun-bo, GUAN Hua-shi

(1 School of Medicine and Pharmaceutics, Ocean University of China, Qingdao 266100, P. R. China)

Abstract: Objective To detect the contents of L-carnitine (LC), acetyl-L-carnitine (ALC) and propionyl-L-carnitine (PLC) in four sea snails (*Natica tigrina*, *Thais clavigera* Kuster, *Busycon canaliculatu*, *Cerithidea obtusa* Lamarck).

Methods The samples were homogenated and extracted by 3% perchloric acid, and derivatized with 1-AA (1-aminoanthracene), and then the contents of LC, ALC and PLC in four sea snails were detected by HPLC-FL with precolumn derivatization. **Result** The contents of LC, ALC and PLC were (39.67 ± 11.80) μmol/100 g, (7.91 ± 1.85) μmol/100 g and (2.26 ± 0.66) μmol/100 g respectively in *Natica tigrina*; (44.02 ± 12.30) μmol/100 g, (9.64 ± 1.56) μmol/100 g and (0.71 ± 0.13) μmol/100 g in *Thais clavigera* Kuster; (9.20 ± 1.51) μmol/100 g, (3.55 ± 1.03) μmol/100 g and (1.61 ± 0.50) μmol/100 g in *Busycon canaliculatu*; and the contents of LC, ALC and PLC in *Cerithidea obtusa* Lamarck were (162.51 ± 34.09) μmol/100 g, (33.47 ± 13.41) μmol/100 g and (11.03 ± 1.84) μmol/100 g respectively. **Conclusion** LC, ALC and PLC were all detected in four sea snails, and the contents of LC, ALC and PLC were the highest in *Cerithidea obtusa* Lamarck.

Key words: L-carnitine; acetyl-L-carnitine; propionyl-L-carnitine; high performance liquid chromatography; snails

左卡尼汀(LC),又叫左旋肉碱、肉毒碱、维生素BT,与其酰化产物乙酰左卡尼汀(ALC)和丙酰左卡尼汀(PLC)等共同构成人体内的卡尼汀群,是动物体内脂肪代谢不可缺少的营养素,在食品加工、动物养殖、医疗保健等领域应用广泛^[1]。目前,关于LC的研究多集中在牛、羊等肉类食品,在海洋产品中研究较少,而同时观察海洋产品中LC及其代谢产物

的研究鲜见报道。斑玉螺、疣荔枝螺、海螺、钝拟蟹守螺均为海洋中药食两用的海洋产品,是沿海地区居民餐桌上的常见食品。2012年5~12月,我们采用荧光衍生化高效液相色谱法(HPLC)对4种海螺中LC、ALC、PLC的含量进行了检测,以期为我国海洋螺类药用资源的开发以及沿海地区居民通过海洋食品摄入LC提供理论依据。

基金项目: 国家科技支撑计划(2008BAI54B02); 青岛市科技计划基础研究项目[11-2-4-2-(3)-jch]。

作者简介: 曹玉(1974-)男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:药代动力学。E-mail: caoyu1767@126.com

通讯作者: 管华诗(1939-)男,博士生导师,研究方向:海洋药物。E-mail: hsguan@ouc.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料 实验仪器: Waters2695 高效液相色谱仪、Waters474 荧光检测器(美国 Waters 公司), HL130HS 血液透析仪(埃及 Haidylena 公司), METTLER AE240 电子天平(博特勒—托利多仪器上海公司), Milli-Q Biocel 纯水发生器[密理博(上海)贸易有限公司], 离心机(德国雅培公司), MS1 Minishaker 涡旋振荡器(Minishaker 公司)。药品及试剂: LC、ALC、PLC、L-氨基蒽(1-AA)均购自 Sigma 公司, 1-乙基-(二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)购自 Fluka 公司, 乙腈(色谱纯)购自美国 Honeywell International Inc, 丙酮、乙醚、氯仿、乙酸铵均为国产分析纯。斑玉螺、疣荔枝螺、海螺、钝拟蟹守螺均为鲜活海螺, 购自青岛台东水产批发市场。

1.2 方法

1.2.1 样品提取及制备 ①样品及空白样品提取: 分别取 4 种新鲜海螺肉 50 g, 加入 3 倍量的 3% 高氯酸溶液, 匀浆机中匀浆 3 min(3 000 r/min), 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 NaOH 调整 pH 为 7.8。取 5 mL, -20 °C 冷冻保存待测。其余样品置入血液透析器中, 4 °C 下用 1.5% 腹膜透析液 1.5 mL/min 透析 24 h 后分装冻存, 用于配置标准品。②衍生化试剂: 取 1-AA 160 mg, 丙酮溶解至 10 mL, 即得 EDC 溶液。取 EDC 1 600 mg, 用 0.01 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(pH 3.5)溶解至 10 mL。

1.2.2 标准曲线配置 分别取 LC(9.88 mg)、ALC(4.79 mg)、PLC(6.39 mg), 用水溶解至 10 mL, 精密量取适量, 加入空白样品溶液, 配置混合标准液, 其中 LC 浓度分别为 5、10、20、50、100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$, ALC 浓度分别为 0.4、1、2、4、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$, PLC 浓度分别为 0.2、0.5、1、2、5、10、25、50

$\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.3 高效液相色谱条件 色谱柱: Hypersil C18 柱(4.6 mm \times 200 mm 5 μm); 流动相: 0.1 mol/L 乙酸铵—乙腈(67:33); 流速为 1.0 mL/min; 波长: Ex 248 nm, Em 418 nm; 进样量: 50 μL 。

1.2.4 LC、ALC、PLC 含量检测 取各样本的标准样和待测样提取液 100 μL , 加入 500 μL 乙腈沉淀蛋白, 10 900 r/min 离心 5 min, 取上清液 500 μL , 加入 400 μL 磷酸缓冲液(pH 3.5), 20 μL 稀盐酸(1 mol/L), 混匀后加入 1-AA 溶液 100 μL , 缓慢加入 100 μL EDC, 室温避光衍生化 30 min。然后用乙醚(3 mL)萃取 2 次, 弃掉乙醚相, 在水相中加入 800 μL 磷酸缓冲液(pH 9.1), 涡旋后用氯仿(3 mL)萃取 2 次, 取水相 400 μL , 加同等量的磷酸缓冲液(pH 3.5), 混匀后取 50 μL 进样分析。取每种海螺的各浓度标准溶液 6 份, 处理后进样分析, 以峰面积的均值为纵坐标, 以标准溶液的浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 通过精密性、回收率、稳定性实验进行方法学考察, 每种海螺分别取 6 份待测样品, 分别计算浓度, 取平均值, 得到待测样品的浓度, 计算每 100 g 样品中含有 LC、ALC、PLC 的量。

2 结果

2.1 选择性实验结果 取空白样品、标准溶液、提取样本处理后进样分析, 得空白样品色谱图、标准溶液色谱图和待测样本色谱图(为钝拟蟹守螺的色谱图, 其余三种产品色谱图相似, 略)。见图 1。结果显示, 在测定时间范围内, 空白样品无测定成分的干扰; 标准溶液中 LC、ALC、PLC 分别在 7.233、10.328、14.137 min 出峰, 峰形良好, 分离完全, 无干扰; 待测样本中分别在对应的保留时间内检测出相应的成分。

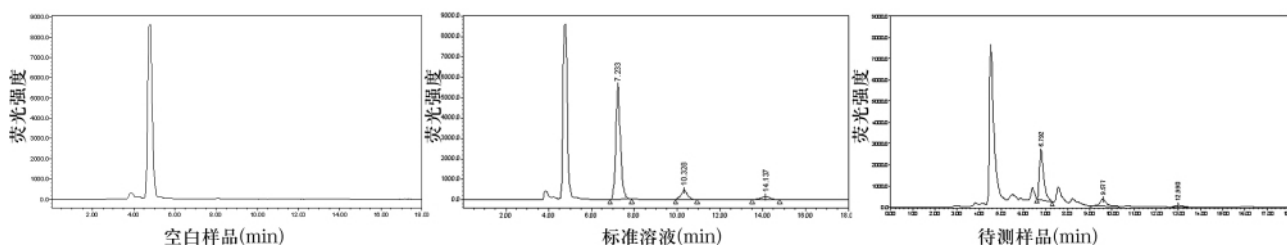


图 1 钝拟蟹守螺的 LC、ALC 和 PLC 高效液相色谱图

2.2 标准曲线 荧光衍生化 HPLC 精密性 < 4%、回收率 96% ~ 103%、稳定性 < 3.8%, 证明该方法稳定、准确、灵敏, 能达到检测的目的。其标准曲线方程以及检测限、相关系数见表 1。

2.3 各样品 LC、ALC、PLC 含量 见表 2。

3 讨论

LC 是由俄国科学家 Guliewitsch 和 Krimberg 于 1905 年在肌肉提取物中发现的^[2], 并鉴定其结构式为 L- β -羟基- γ -三甲氨丁酸。它的基本功能是与长链脂肪酸结合, 带动长链脂肪酸向线粒体内膜的转运, 使脂肪酸在线粒体酶的作用下发生 β -氧化, 再将脂肪酸 β -氧化的产物转运出线粒体, 最终有利于

表 1 四种海螺样品的 LC、ALC、PLC 标准曲线方程

样品名称	标准曲线方程	r	检测限(μmol/L)
斑玉螺			
LC	Y = 7.344 9X + 0.012 6	0.999 1	5 ~ 800
ALC	Y = 5.425 2X + 6.520 8	0.998 6	0.4 ~ 100
PLC	Y = 4.213 7X + 0.504 7	0.999 3	0.2 ~ 50
疣荔枝螺			
LC	Y = 7.154 0X - 20.920 0	0.999 3	5 ~ 800
ALC	Y = 6.739 5X + 6.984 4	0.998 7	0.4 ~ 100
PLC	Y = 5.824 6X + 1.637 3	0.997 9	0.2 ~ 50
海螺			
LC	Y = 7.606 6X - 52.972 0	0.998 9	5 ~ 800
ALC	Y = 6.000 1X + 7.928 0	0.998 8	0.4 ~ 100
PLC	Y = 4.696 2X + 0.978 8	0.996 4	0.2 ~ 50
钝拟蟹守螺			
LC	Y = 7.556 0X - 1.569 5	0.999 1	5 ~ 800
ALC	Y = 6.504 1X + 9.997 8	0.997 3	0.4 ~ 100
PLC	Y = 5.683 7X + 0.662 6	0.997 8	0.2 ~ 50

表 2 四种海螺样品的 LC、ALC、PLC 含量(μmol/100 g)

样品	LC	ALC	PLC
斑玉螺	39.67 ± 11.80	7.91 ± 1.85	2.26 ± 0.66
疣荔枝螺	44.02 ± 12.30	9.64 ± 1.56	0.71 ± 0.13
海螺	9.20 ± 1.51	3.55 ± 1.03	1.61 ± 0.50
钝拟蟹守螺	162.51 ± 34.09	33.47 ± 13.41	11.03 ± 1.84

脂肪的进一步分解^[3,4]。人体内的卡尼汀群来源主要有内源性和外源性两种,内源性的 LC 主要在肝、肾和大脑中合成^[5];外源性的主要来自药物和肉类食品^[6],正常人体内的 LC 25% 自身合成、75% 来自食物,在动物的骨骼肌中含量最高。1993 年美国 FDA 专家委员会确认 LC 安全、无毒,美国药典第 23 版开始收载 LC 原料和制剂。LC 在医疗上主要用于治疗慢性肾疾病引起的肉碱缺乏、心肌疾病和心率失常、调节血脂及血压等,在神经系统疾病、内分泌系统疾病以及减肥和男性不育症也有效果;作为保健品和食品添加剂可用于减肥、运动保健、抗衰老、婴儿奶粉以及其他食品中;作为饲料添加剂添加在水产养殖饲料中,可以提高生长速度,降低饲料系数,改善鱼肉品质,提高鱼类繁殖率^[7],市场潜力巨大。ALC 经 ALC 转移酶在人体的脑、肝脏处被合成,能够促进线粒体在脂肪酸氧化过程中对乙酰辅酶 A 的摄取,增加乙酰胆碱的生成,并刺激蛋白质和膜磷脂的合成。能够迅速通过血脑屏障,改善神经能量,修复神经作用机制并调节中枢神经系统中乙酰胆碱的生成,能够有效治疗和预防老年性痴呆。PLC 为肉毒碱乙酰转移酶刺激剂,可剂量依赖性扩张微血管,选择性的保护内皮细胞不受组织缺氧或过氧化酶制剂引起的损伤。目前,临床上主要用于充血性心力衰竭、外周血管疾病、间歇性跛行等疾病。随着卡尼汀群的研究越来越受到重视,其临床

应用亦越来越广泛。

本研究在前期^[8,9]对血浆、尿液等样品含量测定的基础上,建立了从海螺肉中提取 LC、ALC、PLC,并用荧光衍生化 HPLC 检测其含量,样本衍生化后色谱峰分离良好,干扰少,检测时间短,且灵敏度高、检测限低,且室温条件下即可衍生化反应,操作简便。经精密度、稳定性和回收率实验证明均能达到检测的要求,适用于食品、药品、组织以及治疗性检测需要。在方法学实验条件的探索过程中,考虑到四种海螺制备标准曲线时均需要制备空白溶液以排除内源性 LC 的干扰,本实验在前期研究的基础上采用透析器透析方法制备各样品卡尼汀群的空白溶液^[8]。空白样品的色谱图显示,采用透析法可以有效去除内源性 LC 的干扰及其样本中其他未知物质的干扰,符合本实验检测海洋产品的质量要求。检测结果显示,钝拟蟹守螺中 LC、ALC、PLC 含量最高,其次为疣荔枝螺、斑玉螺,海螺中含量最低。提示沿海居民常食钝拟蟹守螺可以摄取较多的 LC、ALC 和 PLC,同时也为下一步通过提取制备卡尼汀群原料提供理论依据。

参考文献:

- [1] 赖卫华,许杨,陆豫.左旋肉碱的生理功能、应用及其制备[J].食品工业科技,1998,(6):75-77.
- [2] Kerner J, Hoppel C. Generic disorders of carnitinemetabolism and their nutritional management[J]. Annu Rev Nutr, 1998,18: 179-206.
- [3] Reda E, D, Iddio S, Nicolai R, et al. The carnitine system and body composition[J]. Acta Diabetol, 2003,40(Suppl 1): S106-S113.
- [4] Giafranco G, Roberta S, Gianni B. Carnitine metabolism in uremia[J]. Am J Kidney Dis, 2001,38(4):63-67.
- [5] Angsten G, Cederblad G, Meurling S. Reference ranges for muscle carnitine concentration in children[J]. Ann Clin Biochem, 2003,40(Pt 4):406-410.
- [6] 林锋.左卡尼汀在全肠外营养中的应用[J].中华胃肠外科杂志,2003,3:42-44.
- [7] 朱志强.左旋肉碱在水产养殖中的应用现状[J].海洋与渔业,2011,6:61-62.
- [8] Cao Y, Wang YX, Liu CJ, et al. Comparison of pharmacokinetics of L-carnitine, acetyl-L-carnitine and propionyl-L-carnitine after single oral administration of L-carnitine in healthy volunteers[J]. Clin Invest Med, 2009,32(1):E13-E19.
- [9] 栾海云,李金莲,王少华,等.柱前衍生化 HPLC 法检测兔血浆和肝组织中左卡尼汀及其代谢物的含量[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(6):636-640.

(收稿日期:2013-02-04)