

牛肉预煮液中肌肽含量的检测

邢子鑫, 何一航, 朱秋劲*

(贵州大学生命科学学院食品营养与安全系, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 本实验通过对牛肉预煮液进行超滤等处理, 使用高效液相色谱法对预煮液中肌肽进行了初步检测, 结果表明预煮液中肌肽的含量较高, 其含量可达 382.68mg/L。通过加标实验, 进一步确定了该峰就是肌肽。

关键词: 肌肽; 预煮液; 高效液相色谱

Detection of Carnosine Content in Pre-cooked Beef Liquid

XING Zi-xin, HE Yi-hang, ZHU Qiu-jin*

(Department of Food Nutrition and Safety, School of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: After ultrafiltration of pre-cooked beef liquid, the primary detection of carnosine content in it was carried out using HPLC. The results showed that the carnosine in the pre-cooking beef liquid has a higher content, up to 382.68 mg/L. According to the experimental results of spiked pre-cooked beef liquid, the carnosine is further identified.

Key words: carnosine; pre-cooked liquid; HPLC

中图分类号: S879.2; TQ041.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0515-03

肌肽是一种天然的二肽, 它广泛存在于动物的肌肉中, 主要组成是 β -丙氨酰-L-组氨酸。早在 1990 年, 肌肽最先从 Liebig 的肉浸出物中分离而得^[1], 是以晶体的形态存在。在脊椎动物骨骼肌中, 肌肽的含量约为 1.6~20.6mmol/g, 在白肌纤维中的含量比红肌纤维高^[2]。在动物体内, 除了肌肽外, 还有各种不同的氨基乙酰胺-氨基酸, 如鹅肌肽、高肌肽(组氨酸), 高鹅肌肽(γ -氨基丁酰-1-甲基组氨酸)随后亦被从动物的大脑、肌肉等组织中获得, 而含 β -丙氨酰的二肽主要存在于骨骼肌中, 含 γ -氨基丁酰的肽类专门出现在脑中, 原因在于受动物脑中前体物质 γ -氨基丁酸(GABA)的限制。

肌肽作为一种主要存在于动物肌肉中的内源活性肽, 研究发现其纯品所具有的抗氧化性已被广泛认同^[3], 表现为对脂类氧化的抑制及对非脂类氧化损伤的抑制两个方面, 探究其抗氧化机理表现为本身结构含有的咪唑环、与金属离子的螯合作用、清除自由基作用和具有供氢、供电子能力等^[4]。Decker E^[5]等通过添加不同浓度的纯肌肽于绞碎的猪肉中, 并与三聚磷酸钠、 α -生育酚以及 BHT 等抗氧化剂做比较, 结果发现肌肽具有比三聚磷酸钠、 α -生育酚以及 BHT 更好的抗氧化效果, 且肌肽具有一定的护色作用。此外, 肌肽对 Cu^{2+} 的识别与 ATP 探

测胞内游离 Mg^{2+} 离子的机制类似^[6], 还可作为生物传感器敏感元件的制备原料。

肉类预煮液是肉制品生产过程中的副产物, 预煮液中含有大量的可溶性蛋白、氨基酸和其他浸出物等。目前, 肉类预煮液在再利用方面还基本处于空白, 在牛肉、猪肉、羊肉、鸡肉、鸭肉、鱼等畜禽和鱼肉等干肉制品生产过程中, 经预煮或蒸煮的滤液在生产过程中被直接作为废弃物排放。以某牛肉干厂为例, 如果每天生产牛肉干 3~5 吨, 按照 1:1.5 来计算, 则会产生 4.5~7.5 吨的预煮液, 直接排放不仅污染环境, 而且浪费资源。因此对肉类预煮液中有效成分进行探测, 是进一步深加工利用的基础。本研究专门采用超滤、HPLC 等方法对牛肉预煮液进行处理和分析。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、双蒸水、肌肽标品。

Waters 600 高效液相色谱仪 Waters 公司; C_{18} 反相柱 江苏汉邦公司; 超滤杯、针头滤膜(0.45mm)、真空泵、磁力搅拌器、布氏漏斗、滤纸、冰箱、三

收稿日期: 2008-06-24

基金项目: 贵州大学博士基金项目(2007[036]); 贵州大学硕士创新基金项目(校研农 2007009)

作者简介: 邢子鑫(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事畜产品加工研究。E-mail: xingzx2002@163.com

* 通讯作者: 朱秋劲(1969-), 男, 教授, 博士, 主要从事食品营养与安全和畜产品加工研究。E-mail: ls.qjzhu@gzu.edu.cn

氯乙酸。

1.2 样品处理

实验中选用的牛肉取自现场宰杀的牛,牛屠宰后,取其牛柳部位,迅速运回实验室,分割成小块装袋密封冷冻保存。

实验时,首先将冻肉放在冰箱的冷藏中进行低温解冻,解冻完全后,去除表面的可见脂肪,切成小块,按1:1.5的比例加水,然后进行煮制。蒸煮时,先大火煮沸10min,然后小火煮20min。取汤液进行真空抽滤,共抽滤两次,取滤液。向滤液中加入少量1%三氯乙酸,进行4000r/min低速离心20min,使用针头滤膜过滤上清液,最后分别使用500~100000D的滤纸超滤上清液,取滤液备用。

1.3 标准液配制

准确称量肌肽标准品26.50mg,加双蒸水制成2.65mg/ml的标准液;准确移取标准液0.20、0.40、0.60、0.80、1.00ml加水定容至10ml,分别配成53.00、106.00、159.00、212.00、265.00mg/L的对照液。

1.4 HPLC 检测条件

色谱柱选用C₁₈反相柱(250mm×4.6mm);流动相:V_{乙腈}:V_水=20:80,并向其中添加6mmol/L盐酸;流速:1ml/min;进样量:10ml;柱温:20℃。

2 结果与分析

2.1 肌肽鉴定

肌肽标准和预煮液按上述色谱条件进行实验,色谱图如图1~3所示:预煮液色谱中相应峰与肌肽标准品色谱峰保留时间相同,肌肽出峰时间为5.545~5.894min之间,初步判断该峰为肌肽,图1和图2中标品浓度分别为53mg/L和106mg/L。

2.2 色谱分析条件选择

流动相的优选:在实验过程中比较甲醇-水、乙腈-水两个流动相体系对供试品分离效果的影响,结果表明二者均能使供试品中肌肽与其他物质分离,但乙腈-水分离效果好,实验中还比较了流动相中乙腈-水的pH值、乙腈和水比例等因素对分离效果的影响,结果表明:添加0.6mmol/L盐酸有利于分离;未添加盐酸时,肌肽峰出现拖尾;当乙腈和水比例低于V_{乙腈}:V_水=20:80时,肌肽峰拖尾现象严重。从图1~3可以看出在本实验色谱条件下,待测物质色谱峰分离良好,色谱峰较为对称,可以准确测定其峰面积,进行定量分析。

测定波长确定:通过查阅文献以及使用紫外线检测器进行检测扫描,210nm处紫外吸收最大,灵敏度最高,故选择210nm为测定波长。

2.3 标准曲线

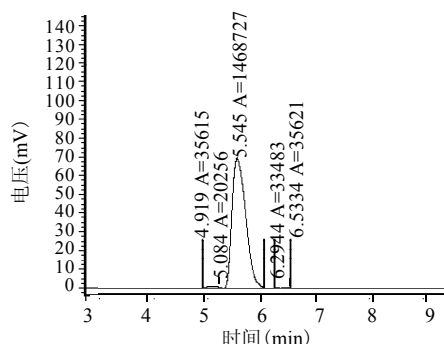


图1 肌肽标准品(53mg/L)

Fig.1 HPLC of carnosine standard (53 mg/L)

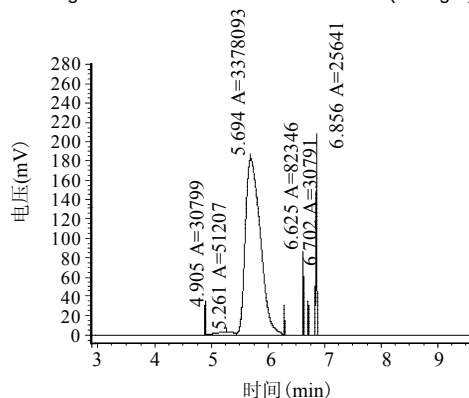


图2 肌肽标准品(106mg/L)

Fig.2 HPLC of carnosine standard (106 mg/L)

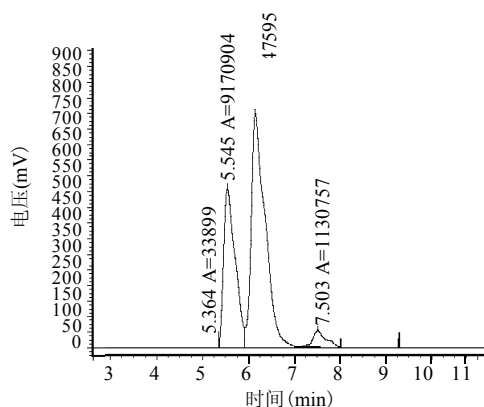


图3 原液经4倍稀释的样品液HPLC分析图谱

Fig.3 HPLC analysis of 4-times water diluent of pre-cooked beef liquid

取图1~3中不同浓度系列肌肽对照品溶液各10μl,分别注入高效液相色谱仪测定,以对照品质量浓度(mg/L)为横坐标,以相应的吸收峰面积为纵坐标,进行回归分析,曲线的回归方程为: $y = 2 \times 10^6 x + 33286$,对照品浓度在13~416mg/L范围内与吸收峰面积呈良好的线性关系,线性相关系数 $r = 0.9987$ 。通过计算,得出样品中的肌肽含量为382.68mg/L。

2.4 加标实验

为了确定该峰是肌肽,进行加标实验(图4),向预

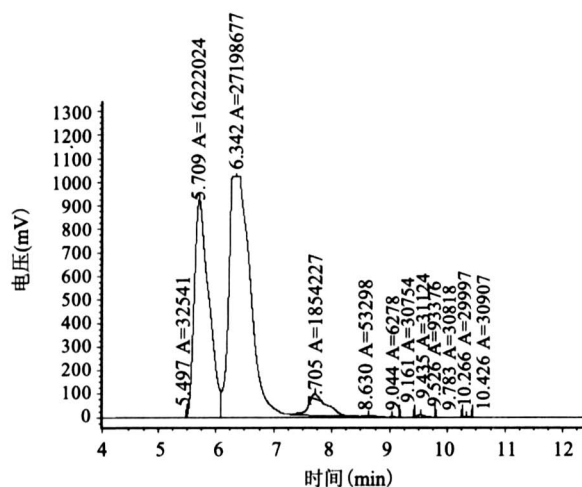


图4 在样品液中添加肌肽标准品的HPLC图谱

Fig.4 HPLC analysis of pre-cooked beef liquid spiked with carnosine standard

煮液中准确添加浓度为106mg/L肌肽标准品溶液,进行测定,测定结果带入回归方程,计算结果与实际添加量进行比较分析,基本可以确定保留时间为5.709min的峰就是肌肽。

3 讨论

国内已有L-肌肽的合成工艺,技术原理为: β -Ala $\rightarrow$ Z- β -Ala $\rightarrow$ Z- β -Ala.Osu $\rightarrow$ Z- β -Ala-His $\rightarrow$ β -Ala-His,其纯度可达99%。合成的肌肽已被广泛用来研究肌肽的生理功能和潜在的应用。但存在合成肌肽与醛类脂肪氧化产物的相互作用生成一种强还原剂胍。在不同来源的商用肌肽中胍含量范围为0.01%~0.20%(W/W)。胍会对挥发性醛、丙醛和硫代巴比妥酸反应产物形成干扰。因

此,胍能潜在的干扰脂类的氧化反应以及脂类氧化反应产物的检测。因此,采用商业合成肌肽必须进行纯化,而且,它的生理功效和化学特性有待重新评价。另外,合成肌肽要耗费化学试剂,易导致环境污染。

HPLC因其具有快速、高效和高回收的特点,近年来应用越来越广泛,尤其是其在分离和制备多肽及蛋白质上具有独特的优越性。本实验采用Waters 600高效液相色谱系统,使用C₁₈色谱柱,对流动相、洗脱方式、洗脱时间、色谱条件以及数据处理方面的因素进行了反复实验和改进。采用乙腈:H₂O的流动相对牛肉预煮液中肌肽的含量进行分析测定,实验结果重现性好。

牛肉预煮液是牛肉加工过程中产生的副产品,过去一直作为废液被倒掉而没有引起相关厂家的重视。这不仅可能导致污染环境,而且也是一种资源的浪费。通过本实验,对预煮液中肌肽进行了初步检测,发现预煮液中肌肽含量较高,样品中的肌肽含量为382.68mg/L,具有较高的利用价值,为后续工作的开展提供理论依据。

参考文献:

- [1] BAUER K. Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain[J]. Neurochemical Research, 2005, 30(10):1339-1345.
- [2] 周理红, 许梓荣. 肌肽的营养研究进展[J]. 中国饲料, 2004(11):27-29.
- [3] 韩立强, 朱松波, 杨国宇. 肌肽——一种有待开发的天然抗氧化剂[J]. 中国畜牧杂志, 2005, 41:233-235.
- [4] 郭爽, 杨国宇, 韩立强. 肌肽的抗氧化特性及其作用机理[J]. 动物科学与动物医学, 2004, 21(2):21-23.
- [5] DECKER E A, GOPALAKRISHNAN J, MEANS W J. Antioxidant activity of mechanically separated pork extracts[J]. Animal Science, 1998 (12):101-110.
- [6] 杨燕军, 陈有亮. 肌肽的抗氧化研究[J]. 肉类工业, 2006(6):25-27.