

文章编号: 1673-1689(2011)04-0511-07

基于 SDS 增溶的共聚物胶束中辅酶 Q₁₀ 含量分析

李丽^{1,2}, 夏书芹*^{1,2}, 李雪琦^{1,2}, 张晓鸣^{1,2}, 贾承胜^{1,2}, 乐琳^{1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 对酪蛋白-葡聚糖共聚物胶束作为输送体系而言, 所包埋营养素的总量是评价其质量的重要指标。表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)在将共聚物胶束解体的同时使辅酶 Q₁₀ 增溶于水中, 从而便于进行定量分析。实验结果表明: 当 SDS 浓度为 0.31 mol/L、孵育温度 30 ℃、硼氢化钠 7 mg/mL、用量 100 μL、还原时间 3~5 min 时, SDS 增溶法的加样回收率在 (98.77 ± 1.60)% ~ (95.90 ± 0.80)% 之间。同时, 共聚物中酪蛋白单元的内源荧光和外源荧光光谱分析显示, 当 SDS 浓度为 0~0.5 mol/L 时, SDS 会部分改变酪蛋白单元的疏水结构; 且 SDS 浓度为 0.31 mol/L 时, SDS 与酪蛋白单元疏水区的相互作用几乎不受温度的影响。

关键词: 增溶; 共聚物胶束; 十二烷基硫酸钠; 辅酶 Q₁₀

中图分类号: TS 252.59

文献标识码: A

Determination of Content of Coenzyme Q₁₀ in Copolymer Micellers with SDS Solubilization

LI Li^{1,2}, XIA Shu-qin*^{1,2}, LI Xue-qi^{1,2}, ZHANG Xiao-ming^{1,2},
JIA Cheng-sheng^{1,2}, YUE Lin^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The total content of nutrient is an important index for evaluating the quality of casein-dextran copolymer micellers as a delivery system. Sodium dodecyl sulfate (SDS) as a surfactant can be used to disorganize copolymer micellers and make coenzyme Q₁₀ solubilize in water for quantitative analysis. In this study, the recovery rate of coenzyme Q₁₀ from blank casein-dextran copolymer micellers ranged from (98.77 ± 1.60)% to (95.90 ± 0.80)% with conditions as follows: SDS concentration 0.31 mol/L, incubation temperature 30 ℃, sodium borohydride (7 mg/mL) dL, reduction time 3~5 min. The analysis of synchronous and exogenous fluorescence spectra indicated that the hydrophobic region of casein unit of copolymer was partly changed during solubilization at SDS concentration form 0 to 0.5 mol/L. The interaction between SDS and hydrophobic region was not influenced by temperature when the concentration of SDS was 0.31 mol/L.

Key words: solubilization, copolymer micellers, sodium dodecyl sulfate, coenzyme Q₁₀

收稿日期: 2010-05-30

基金项目: 国家 863 计划项目 (2007AA100403); 食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题 (SKLFF-TS200904)。

* 通信作者: 夏书芹 (1979-), 女, 江苏南通人, 工学博士, 副教授, 主要从事功能性食品配料与添加剂研究。

Email: sqxia@jiangnan.edu.cn

辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 是一种脂溶性微量营养素^[1], 存在于活细胞的线粒体中, 其缺乏经常会引起多种疾病。但 CoQ₁₀ 水溶性差, 口服摄取后经胃肠道吸收率低。因此, 各国学者采用多种手段提高其溶解性和生物利用率。较早的方法从改善 CoQ₁₀ 自身结构入手, 通过酯化方法可以明显提高血药浓度^[2], 但是不能提高各器官的 CoQ₁₀ 含量。随着纳米技术的发展, 输送体系在营养素的包埋、增溶、控释、靶向释放等方面表现出良好的特性, 因而逐渐受到研究者的重视, 已见报道的包括乳剂、多重乳状液、纳米粒等^[3-5]。这些输送体系所用的材料或多或少涉及表面活性剂, 尽管制备工艺已较成熟, 但不属于公认的安全原料范畴而不能广泛应用于食品中^[6]。

天然生物大分子材料如蛋白质和多糖, 由于来源广泛、价格便宜、细胞相容性和生物降解性高, 与传统材料相比具有更好的应用前景^[7-8]。蛋白质与多糖经美拉德偶联反应形成共聚物, 其多羟基的特点可改善复合物的亲水-亲油平衡, 其多糖的无规线团结构特质可改善复合物的热稳定性, 同时, 多糖大分子可改善复合物的界面空间稳定性, 与蛋白质相比具有明显的优势, 因此可以作为构建纳米输送体系的理想基材。目前, 基于酪蛋白-葡聚糖共聚物制得的纳米粒已用于包埋 β 胡萝卜素^[9]。

输送体系中营养素的总量是评价其品质的重要指标, 而其定量主要基于体系中营养素的有效释放。目前基于蛋白质-葡聚糖共聚物为壁材的输送体系中营养素含量测定方法报道较少。已见报道的是采用胃蛋白酶和胰蛋白酶水解共聚物, 释放包埋的 β 胡萝卜素以供分析^[9], 但酶处理具有作用条件温和、反应时间长 (24 h)、且反应不彻底等问题, 不适合快速检测。十二烷基硫酸钠 (SDS) 是强烈的蛋白质变性剂, 当浓度较低时, 可以破坏蛋白质胶束的水化膜, 使其失去稳定性而沉淀; 当浓度的增加至与蛋白质链的结合达到饱和时, SDS 自由胶束与 SDS-聚合物混合胶束共存于体系。同时, SDS 作为一种亲水性较强的表面活性剂 (HLB 值 10.6), 也能显著改善脂溶性物质在水中的溶解性。因此, SDS 作为增溶增敏剂被广泛应用于化学分析领域。基于此, SDS 增溶可将共聚物胶束解体从而将营养素释放, 并且营养素也处于增溶后的胶束中, 以便定量测定。

作者以 CoQ₁₀ 为营养素模型, 采用 SDS 对酪蛋白-葡聚糖共聚物胶束和 CoQ₁₀ 体系增溶, 以供紫外分光光度法测定 CoQ₁₀ 的总量, 并与酶 (或酸) 水解

释放营养素结合有机溶剂萃取的方法进行了比较。通过浊度测定、蛋白质内源荧光以及外源荧光的变化追踪孵育温度和 SDS 浓度对增溶效果的影响, 确定还原剂 NaBH₄ 的用量及反应时间。旨在建立一种简单、快速、可行的蛋白质-多糖共聚物胶束中营养素总量的分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

辅酶 Q₁₀ 原料 (98.0% ~ 101.0%): 日清制药公司产品; 辅酶 Q₁₀ 标准品 (98%)、胃蛋白酶、苾 (荧光光谱级): Sigma 公司产品; Alcalase: 诺维信公司产品; N 酶: 日本株式会社产品; 酪蛋白、葡聚糖 (右旋糖酐 2 万) (分析纯): 国药集团化学试剂有限公司产品。

501 型超级恒温水浴: 上海实验仪器厂产品; ZX98-1 型旋转蒸发仪: 上海有机研究所产品; 超高压均质机 NS1001 L2K: 意大利 Niro Soavi 公司产品; UV-1600 紫外可见分光光度计: 上海美普达仪器有限公司产品; 荧光分光光度计 F-7000: 日本日立公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 酪蛋白-葡聚糖共聚物胶束的制备 采用美拉德反应法制备共聚物^[10]。酪蛋白和葡聚糖摩尔比为 1:7, 美拉德反应时间为 20 h。

采用乙醇注入-超高压均质法制备胶束。将酪蛋白-葡聚糖共聚物溶于 55 °C 水中, 控制酪蛋白质量浓度为 1 mg/mL, 搅拌 10 min 以充分溶解。称取 CoQ₁₀ 加入到 2 mL 无水乙醇中于 55 °C 水浴中溶解, 边搅拌边用注射器快速将其注入共聚物水溶液中, 搅拌 30 min, 旋转蒸发除去乙醇 (55 °C, 真空度 0.1 MPa), 迅速冷却, 用稀盐酸溶液调整 pH 值为 4.6, 高压均质处理, 4 °C 静置过夜。

1.2.2 基于蛋白质的酶解测定共聚物胶束中 CoQ₁₀ 总量 取 1 mL 待测样品, 加入酶液 (胃蛋白酶、Alcalase、N 酶) 孵育 24 h。反应结束后, 按有机溶剂洗涤法将 CoQ₁₀ 富集以供定量分析^[11]。在待测样中加入 5 mL 石油醚, 振荡充分混合后, 2 000 r/min 离心 5 min, 移取上层有机相于另一试管中, 加入 5 mL 石油醚重复萃取一次, 合并有机相, 用氮气吹干, 定容至 10 mL。采用相同方法处理空白样品作为对照, 测定处理液在 275 nm 处以 NaBH₄ 还原前后的吸光值之差 ΔA。

采用紫外分光光度法测得 CoQ₁₀ 在乙醇溶液中的标准曲线^[12], 得到回归方程为:

$\Delta A = 0.0015 \times CoQ_{10} - 0.0079 (R^2 = 0.9994)$ 。

1.2.3 基于蛋白质的酸解测定共聚物胶束中 CoQ₁₀ 总量 取 1 mL 待测样品, 加入 1 mL 浓盐酸, 80 °C 孵育 2 h, 按 1.2.2 所述方法测定 CoQ₁₀ 含量。

1.2.4 基于 SDS 增溶的共聚物胶束中 CoQ₁₀ 总量的分析方法

1) SDS 浓度及孵育温度对增溶效果的影响分析 透光率的测定 取 0.5 mL 待测样液于 10 mL 具塞刻度试管中, 移入一系列浓度的 SDS 水溶液 3 mL, 振摇, 孵育, 用去离子水定容至刻度。测定处理液在 600 nm 处的透光率。

内源荧光光谱分析 SDS 浓度及孵育温度对增溶效果的影响 将 0.5 mL 空白胶束移入试管, 加入一系列浓度的 SDS 水溶液, 孵育, 定容至 10 mL。在激发波长为 295 nm, 荧光发射和激发狭缝宽度均为 2.5 nm 的条件下, 分析 280~400 nm 范围内的荧光光谱^[13]。

外源荧光光谱分析 SDS 浓度及孵育温度对增溶效果的影响 配置芘的乙醇储备液。移取 100 μL 储备液于试管中, 用氮气吹干。将 0.5 mL 空白胶束移入试管, 振荡后置于 40 °C 水浴中超声 40 min, 继续孵育 24 h。加入一系列浓度的 SDS 水溶液, 孵育后定容。芘的最终浓度为 10⁻⁶ mol/L。激发波长为 335 nm, 荧光发射和激发狭缝宽度均为 2.5 nm, 测定芘在 350~550 nm 范围内的荧光光谱。第一发射峰(373 nm I₁)与第三发射峰(384 nm I₃)的荧光强度比值 I₁/I₃ 表征芘所处微环境的极性^[13]。

2) 还原剂用量及反应时间的确定 取 0.5 mL 待测样液于 10 mL 具塞刻度试管中, 移入 1 mol/L 的 SDS 水溶液 3 mL, 振摇, 于 30 °C 下孵育 20 min, 用去离子水定容至刻度, 加入硼氢化钠溶液, 测定 275 nm 处的吸光值。

3) CoQ₁₀ 在 SDS 溶液中的标准曲线 配置 CoQ₁₀ 乙醇溶液, 移入 SDS 水溶液增溶, 振摇并定容至刻度, 即得 CoQ₁₀ 标准溶液。回归方程为: $\Delta A = 0.0014 \times C - 0.0093 (R^2 = 0.999)$ 。

4) SDS 增溶法的回收率分析 移取 1 mL 空白胶束, 分别加入梯度 CoQ₁₀ 乙醇溶液, 加入 SDS 水溶液进行增溶。测定 CoQ₁₀ 总量, 计算方法的回收率。

1.2.5 产率计算方法 产率 = (产品中 CoQ₁₀ 总量 / 理论添加 CoQ₁₀ 总量) × 100%

1.2.6 数据处理与分析 所有试验结果至少重复 3 次取平均值, 并计算标准偏差(S. D.)。结果采用 $X = \bar{X} \pm S. D.$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 酶解与酸解对共聚物胶束中 CoQ₁₀ 释放量的影响

蛋白质是氨基酸经肽键连接构成的生物大分子, 采用蛋白酶可将肽键断裂, 使蛋白质分解为多肽, 从而使包埋在胶束中的营养素释放出来以便定量分析^[14]。通过比较几种常用蛋白酶的分析结果发现, 产品中 CoQ₁₀ 含量均小于理论添加量的 70%, 且不同酶之间存在差异, 这可能与酶的作用方式有关(见表 1)。当水解反应进行到一定程度后酶活降低, 使反应不彻底。且肽段间疏水作用和二硫键的存在使胶束内核少量酪蛋白单体仍牢固结合, 同时酶解产生的游离单肽链因倾向于能量最低状态, 故自发卷曲(非直链形式)缠绕于微球内核, 导致 CoQ₁₀ 释放不完全^[15]。

强酸也可将蛋白质水解, 且水解程度较酶高, 故选择浓酸对共聚物胶束进行作用。蛋白质经浓盐酸水解后, 一级结构被严重破坏, 疏水结构塌陷, 释放出大量 CoQ₁₀, 测得含量较酶法高, 但仍不足理论添加量的 80%。此外, 酶水解反应耗时、反应不彻底; 酸水解反应需在高温、浓酸下进行, 因此两者皆不适合作为分析测定的方法。

表 1 水解方式对胶束中 CoQ₁₀ 含量测定的影响

Tab. 1 Effect of hydrolysis method on the determination of CoQ₁₀ content in micelles

水解方式	产率/ %
胃蛋白酶	66.94 ± 2.16
N 酶	63.85 ± 0.98
Alcalase	43.47 ± 7.03
酸解浓盐酸	75.07 ± 0.66

2.2 SDS 及共聚物对 CoQ₁₀ 含量测定的影响

CoQ₁₀ 的紫外分光光度法测定主要是基于 CoQ₁₀ 中的 = O 以及 C=C 双键在 275 nm 处有特征吸收 A₁, 当加入适量的还原剂硼氢化钠后, = O 被还原为 -OH, 此时测得的仅是 C=C 双键在 275 nm 处的吸收 A₂, 吸光值之差 ΔA 反映的即是 = O 的特征吸收值。为探究 SDS 以及共聚物是否对 CoQ₁₀ 紫外吸收产生干扰, 对 CoQ₁₀-SDS 体系、CoQ₁₀-乙醇体系、共聚物-SDS 体系进行紫外扫描(见图 1)。

由图 1 可见, CoQ₁₀-SDS 体系和 CoQ₁₀-乙醇体系在 275 nm 处都有较强且独立的吸收峰。共聚物-SDS 体系在 275 nm 处有微弱吸收, 吸光值约 0.1,

经硼氢化钠还原后,吸光值几乎不变,不会对 CoQ_{10} 总量测定造成干扰(见图2)。因此利用 275 nm 处的吸光值之差与浓度的对应关系对 CoQ_{10} 进行定量分析。

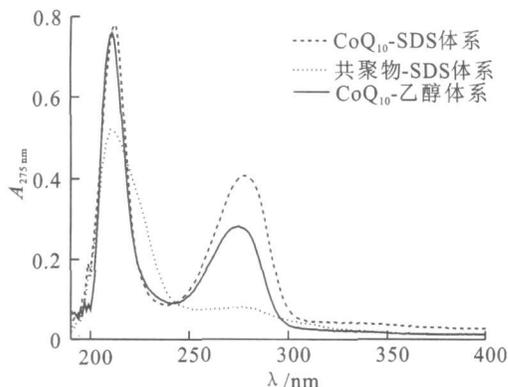


图1 DS和共聚物对 CoQ_{10} 紫外吸收光谱的影响

Fig. 1 Effect of SDS and copolymer on UV spectrum of CoQ_{10}

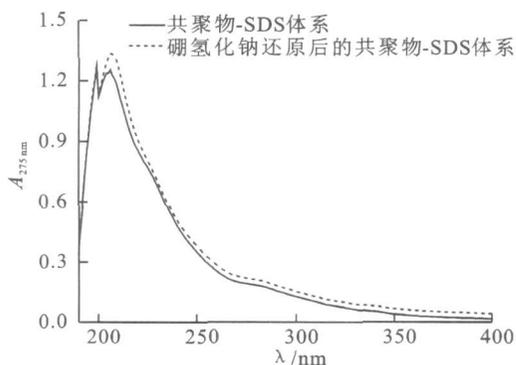


图2 硼氢化钠还原前后共聚物-SDS体系的紫外吸收光谱

Fig. 2 UV spectrum of copolymer-SDS solution prior to and after being reduced by NaBH_4

2.3 SDS浓度对 CoQ_{10} 增溶效果的影响

SDS与负载了 CoQ_{10} 的共聚物胶束结合并对其有增溶作用,以透光率的方法检测不同浓度的SDS与共聚物在溶液中混合胶束的形成。100%透光率表明共聚物胶束完全解体并形成混合胶束。如图3(a)所示,随着SDS浓度(C_{SDS})的增加,透光率逐步上升,当溶液中 C_{SDS} 为 0.31 mol/L 时,透光率达到100%,此后趋于平衡。这表明在SDS的作用下,共聚物和 CoQ_{10} 所处的微环境发生改变,导致在水相中的溶解度提高。

酪蛋白中色氨酸和酪氨酸残基的特殊荧光光谱可作为研究蛋白质性质的重要手段^[16]。酪蛋白中有3个色氨酸残基位于疏水区,可以对蛋白疏水区的变化提供有力证据^[17-18]。研究表明,299 nm 处的发射吸收峰为酪氨酸残基所贡献,350 nm 处的发射吸收峰为色氨酸残基所贡献。由图4(a)可见,随

着 C_{SDS} 增加,295 nm 处酪氨酸残基的荧光强度在 C_{SDS} 小于 0.002 mol/L 时迅速降低,0.002~0.004 mol/L 缓慢降低,大于 0.006 mol/L 时则基本不变。350 nm 处色氨酸残基的荧光强度在 C_{SDS} 小于 0.004 mol/L 时缓慢降低,0.006~0.31 mol/L 逐渐升高,0.31 mol/L 时达到最大。这表明 SDS 导致酪蛋白单元的二级结构发生改变,对共聚物胶束结构造成了破坏,改变了胶束疏水微环境。文献报道也显示蛋白质和 SDS 混合液中,当 SDS 浓度低于临界聚集浓度(cac , 0.002 2 mol/L) 时,SDS 单体渗透进入蛋白质胶束,使蛋白质的疏水结构有一定程度膨胀,极性增大;当浓度大于 SDS 临界胶束浓度(cmc , 0.0035 mol/L) 时,SDS 自身聚集成胶束,且大量聚集,使蛋白质疏水性增强,此时溶液中存在 SDS 聚集体和蛋白质形成表面张力非常低的复合物,同时溶液中也分布着 SDS 胶束聚集体^[19-20]。

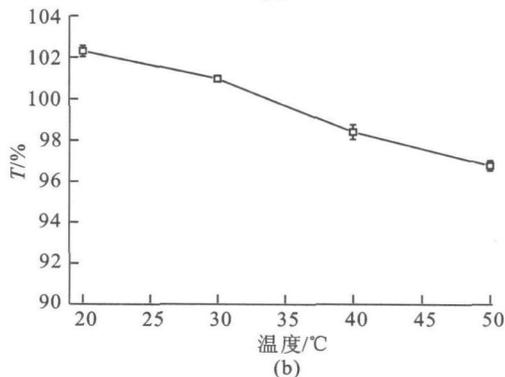
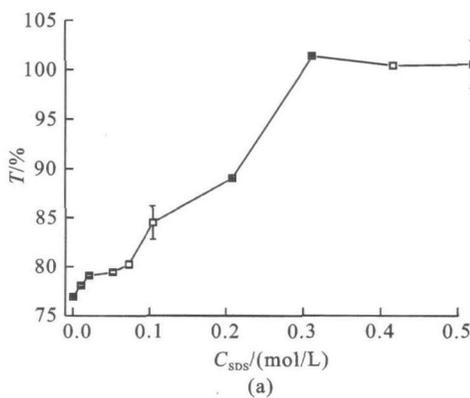


图3 SDS浓度(a)与孵育温度(b)对负载了 CoQ_{10} 的共聚物胶束的增溶效果

Fig. 3 Effect of SDS concentration (a) and incubation temperature (b) on the solubilizing curve of CoQ_{10} -copolymer micellers

芘是一种疏水性探针,在水中的溶解度约为 7.0×10^{-7} mol/L,其荧光寿命较长,常用来探测所处区域的极性。由图4(b)可见,共聚物-SDS体系中,随着 C_{SDS} 的增加, I_1/I_3 逐渐降低,在浓度大于 0.004 mol/L 以后则基本保持不变。SDS 溶液中,当 C_{SDS} 小于 0.004 mol/L 时, I_1/I_3 大幅度下降,随

后则无显著变化;胶束-SDS 体系中 SDS 浓度低于 0.004 mol/L 时, I_1/I_3 均明显小于 SDS 溶液, 芘所处环境的疏水性较高, 说明含有共聚物-SDS 混合胶束的体系比单纯 SDS 溶液疏水性强。当 C_{SDS} 继续增大, I_1/I_3 几乎不变, 且两个体系差异不显著, 此时体系中大量形成 SDS 胶束, 可使处于共聚物胶束疏水区的芘探针转移到 SDS 胶束中。

综合透光率、酪蛋白内源荧光和外源荧光光谱分析结果, 当 C_{SDS} 增加到一定程度, 会部分改变蛋白质的疏水结构, 从而使共聚物胶束解体, 形成混合胶束, 同时大量 SDS 胶束也使 CoQ₁₀ 增溶于体系中, 体系透光率接近 100%, 达到很好的增溶效果, 实验最终选择增溶共聚物胶束体系中 SDS 浓度为 0.31 mol/L。

一般情况下, 反应时间是除浓度外影响反应的另一重要因素。实验中通过测定不同浓度 SDS 增溶液的透光率随时间的变化, 发现在 2 h 内, 各增溶液的透光率几乎没有改变。说明 SDS 浓度低于 0.31 mol/L 时, SDS 增溶效果并没有随着时间的延长而积累。

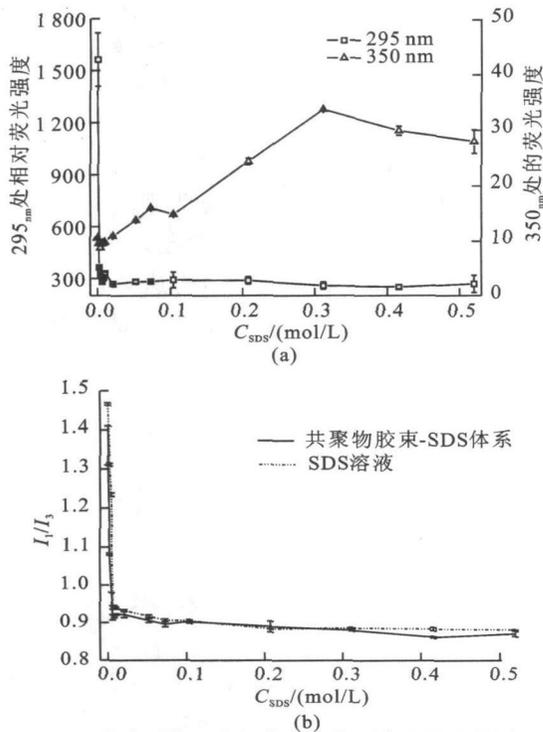


图4 SDS 浓度对体系内源荧光和外源荧光强度的影响
Fig. 4 Effect of SDS concentration on the endogenous (a) and exogenous (b) fluorescence intensity

2.4 温度对 SDS 增溶效果的影响

温度改变分子间的作用包括增溶物与表面活性剂间的作用, 以及表面活性剂与溶剂间的作用。当温度升高时, 热运动使表面活性剂的胶束空间增

大, 提高增溶物在胶团中的溶解度, 但对离子型表面活性剂的临界胶束浓度和胶束聚集数影响较小。图 3(b) 表明, 在实验范围内, 低温下增溶效果较好, 20 °C 和 30 °C 孵育后透光率均接近 100%。升高孵育温度, 透光率下降, 这可能与蛋白质的溶解性有关。大多数蛋白质的溶解度在 0~40 °C 范围内随温度的升高而提高, 但酪蛋白属于高疏水性蛋白, 温度和溶解度呈负相关。当体系中温度较高时, 热能增加导致蛋白质结构展开, 原在结构内部的非极性基团暴露, 促进了聚集和沉淀作用, 使其溶解度下降。图 5(a) 和 (b) 分别为不同温度下内源荧光强度和 350 nm 处外源荧光强度的变化, 表明在实验温度范围内, 荧光强度几乎不受温度的影响, 说明当体系中 SDS 浓度较高时 (0.31 mol/L), SDS 和酪蛋白疏水区的相互作用对温度不敏感。实验选择孵育温度为 30 °C。

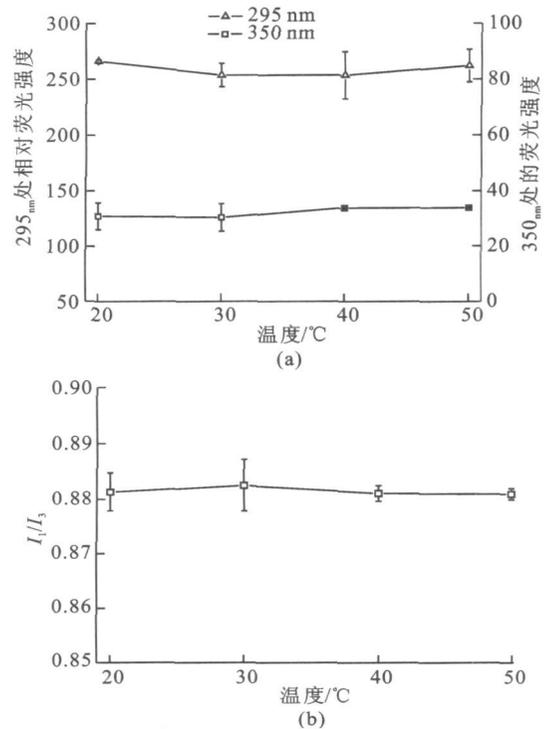


图5 孵育温度对体系内源荧光和外源荧光强度的影响
Fig. 5 Effect of incubation temperature on the endogenous (a) and exogenous (b) fluorescence intensity

2.5 硼氢化钠溶液用量及还原反应平衡时间的确定

硼氢化钠 (7 mg/mL) 加入量为 30 μ L 时, 还原反应速率较乙醇溶液中慢, 约在第 9 min 达到平衡; 当加入量为 100 μ L, 还原反应速率和乙醇溶液中基本相同, 3 min 即可达到平衡; 加入量增加至 200 μ L, 还原反应速率进一步提高, 反应达到平衡的时间缩短为 2 min, 同加入量 100 μ L 相比, 提升幅度并不大 (见图 6)。因此, 测定 0.31 mol/L SDS 增溶

体系中的 CoQ_{10} 含量时, 硼氢化钠的加入量为 100 μL , 反应时间确定为 3~5 min。

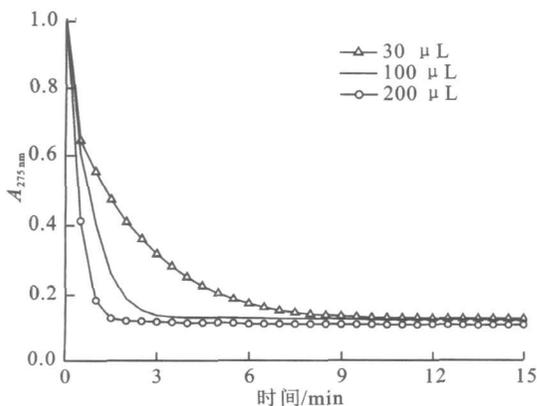


图6 硼氢化钠用量及作用时间对 $A_{275\text{nm}}$ 的影响

Fig. 6 Effect of NaBH_4 concentration and reaction time on the A_{275}

2.6 SDS 增溶法的回收率及共聚物胶束中 CoQ_{10} 的产率

采用 SDS 增溶法对不同质量浓度的 CoQ_{10} -空白胶束混合液中 CoQ_{10} 质量浓度进行测定(见表 2), 由表 2 可见, 基于 SDS 增溶共聚物胶束的回收率较高, 均在 95% 以上, 适应浓度范围较广(RSD)均在 3% 以内。

采用 SDS 增溶释放共聚物胶束中的 CoQ_{10} , 采用紫外分光光度法进行定量分析, 共聚物胶束的产率如表 3 所示。结果表明, 对于不同理论载量的 CoQ_{10} 共聚物胶束, SDS 增溶法的 RSD 均较低。此外, 比较发现, 随着载量的提高, 共聚物胶束对 CoQ_{10} 的包埋能力有所下降, 部分 CoQ_{10} 可能由于未被胶束化, 在超高压均质等工艺中损失。

表 2 SDS 增溶法的回收率

Tab. 2 Recovery rates of SDS solubilization method

添加量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得量/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	(回收率± 标准偏差)/%	RSD/%
189	186.67	98.77 ± 1.60	1.62
315	311.04	98.74 ± 2.89	2.92
441	422.91	95.90 ± 0.80	0.84

表 3 不同载量 CoQ_{10} 共聚物胶束的产率

Tab. 3 Yield rate of copolymer micellers with different CoQ_{10} loading capacity

理论载量/%	(产率±标准偏差)/%	RSD/%
1	99.80 ± 1.52	1.52
5	90.77 ± 2.47	2.72
10	82.70 ± 1.58	1.91

3 结 语

采用 SDS 增溶法将共聚物胶束解体释放包埋在其中的 CoQ_{10} , 再以紫外分光光度法进行定量分析, 该方法操作简单、省时、准确性较好, 可作为定量评价天然大分子纳米输送体系质量的分析方法。较优的增溶条件为: SDS 浓度 0.31 mol/L、孵育温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 、硼氢化钠(7 mg/mL)用量 100 μL 、还原时间 3~5 min。采用内源和外源荧光光谱分析初步探讨 SDS 对 CoQ_{10} 胶束的增溶机制, 发现 SDS 通过部分改变酪蛋白单元的疏水结构达到快速增溶的效果, 从而使 CoQ_{10} 充分释放, 以便定量分析。

参考文献(References):

- [1] Palamakula A, Khan M A, Evaluation of cytotoxicity of oils used in coenzyme Q_{10} self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS)[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004 (273): 63-73.
- [2] Turunen M, Appelkvist E L, Sindelar P, et al. Blood concentration of coenzyme Q_{10} increases in rats when esterified forms are administered[J]. *Biochemical and Molecular Action of Nutrients*, 1999, 129 (12): 2113-2118.
- [3] Junya H, Yoshihiro K, Zhogn L F, et al. Physicochemical and pharmacokinetic characterization of water-soluble Coenzyme Q_{10} formulations[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 363 (1-2): 112-117.
- [4] Schmidts T, Dobler D, Nissing C, et al. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, 338 (1): 184-192.
- [5] Pariya T, Kiyoshi K, Makoto H, et al. Improvement of the oral bioavailability of coenzyme Q_{10} by emulsification with fats and emulsifiers used in the food industry[J]. *Food Science and Technology*, 2009, 42 (1): 385-390.
- [6] Chen L Y, Remondetto G E, Subirade M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2006, 17 (5): 272-283.
- [7] 曹正兵. 丝素蛋白自组装行为及其在生物医药方面的应用研究[D]. 上海: 复旦大学, 2005.

- [8] 夏文水, Sindyikengera Severin. 食品中乳蛋白的重要作用[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24 (6): 100– 105.
XIA Wen-shui, Sindyikengera s. Significance of milk proteins in food[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24 (6): 100– 105. (in Chinese)
- [9] Pan X Y, YAO P, Shao Z Z. Simultaneous nanoparticle formation and encapsulation driven by hydrophobic interaction of casein-graft-dextran and β -carotene[J]. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2007, 315 (2): 456– 463.
- [10] 潘晓赟. 基于酪蛋白的纳米粒子制备及其应用的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [11] M algorzata J R, Latowski D, Strzalka K. Incorporation of plastoquinone and ubiquinone into liposome membranes studied by HPLC analysis: The effect of side chain length and redoxstate of quinone[J]. **Chemistry and Physics of Lipids**, 2001, 110 (1): 85– 94.
- [12] 夏书芹, 许时婴. 吐温 80 增溶-紫外分光光度法测定辅酶 Q₁₀ 脂质体的载量及包封率[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31 (10): 131– 135.
XIA Shu-qin, XU Shi-ying. Determination of loading capacity and encapsulation efficiency of coenzyme Q₁₀ liposomes by tween 80 solubilization and UV spectrophotometry[J]. **Food and Fermentation industries**, 2005, 31 (10): 131– 135. (in Chinese)
- [13] 刘燕. 酪蛋白胶束结构与功能特性的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2007.
- [14] 张晓鸣, 高梅娟, 颜袅, 等. 酶解大豆蛋白制备风味增强肽[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28 (1): 9– 13.
ZHANG Xia-ming, Gao Mei-juan, YAN Niao, et al. Enzymatic preparation of soy protein flavor-enhancing peptide[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28 (1): 9– 13. (in Chinese)
- [15] 刘瑞, 齐崑, 苏荣欣, 等. 酪蛋白溶解与酶解行为的动态光散射[J]. 过程工程学报, 2006, 6 (4): 614– 618.
LIU Rui, QI Wei, SU Rong-xin et al. The dissolution and enzymatic hydrolysis of casein by dynamic light scattering [J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**, 2006, 6 (4): 614– 618. (in Chinese)
- [16] 曹蕊, 曹玉华. 荧光法研究头发光损伤[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27 (4): 30– 33.
CAO Rui, CAO Yu-hua. Study on ultraviolet damage of hair with fluorescence spectrometry[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27 (4): 30– 33. (in Chinese)
- [17] Michael H A, Harold M F J, Markus W G. Conformational analysis of the hydrophobic peptide α_{s1} -casein(136-196) [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1999, 1431 (2): 410– 420.
- [18] Farrell H M, Wickham E D, Unruh J J, et al. Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and FT IR spectroscopy and correlation with micellization[J]. **Food Hydrocolloids**, 2001, 15 (4– 6): 341– 354.
- [19] Sonia F S, Dino Z, Hannes F. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering[J]. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2003, 262 (2): 400– 408.
- [20] Goddard E D. Polymer/Surfactant interaction: interfacial aspects[J]. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2002, 256 (1): 228– 235.