

魔芋神经酰胺的提取及其鞘磷脂含量的测定

刘仁萍¹ 杨建奎² 颜焱娜¹ 吴民熙¹ 肖骛轩³ 吴永尧^{1*}

¹湖南农业大学生物科学技术学院; ²湖南农业大学理学院; ³湖南省农业科学研究院,长沙 410128

摘要: 采用回流提取法提取魔芋神经酰胺进行初步的探索,重点分析了溶剂浓度、温度、时间、料液比对魔芋神经酰胺提取量的影响,确定了最佳的提取工艺;并且结合高效液相/蒸发光散射检测器的方法对魔芋结合态神经酰胺-鞘磷脂进行了定性定量分析。

关键词: 魔芋; 鞘磷脂; 高效液相色谱-蒸发光散射器

中图分类号: Q503

文献标识码: A

Extraction of Ceramide from Konjac and Its Sphingomyelin Analysis

LIU Ren-ping¹, YANG Jian-ku², YAN Yan-na¹, WU Min-xi¹, XIAO Wu-xuan³, WU Yong-yao^{1*}

¹College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agriculture University; ²Science of College of Hunan Agriculture University; ³Hunan Academy of Agriculture sciences, Changsha 410128, China

Abstract: The extraction of ceramide from konjac by the refluxing method was studied. The effects of temperature, time, proportion of solute to solvent and extracting solvent on the extraction efficiencies were analyzed. The optimum extraction conditions were made. Combined with HPLC and evaporative light scattering detector (HPLC/ELSD), the sphingomyelin of konjac were analyzed qualitatively and quantitatively.

Key words: konjac; sphingomyelin; HPLC-ELSD

神经酰胺(ceramide),即N-脂酰神经鞘胺醇,是一种广泛存在于真核生物细胞中的信号传导物质,作为一种脂质分子以细胞膜的结构组成成份或胞内自由分子形式存在^[1,2],参与调节细胞的生长、抑制、分化、衰老和凋亡等^[3,4]。近些年来,神经酰胺类物质已成为新兴的功能性医药保健品、食品和化妆品的重要活性成分,具有极大的应用价值^[5],然而无论在低等真核生物还是在高等的动植物细胞中,游离态的神经酰胺含量都比较少,神经酰胺主要作为鞘磷脂的结构单元而存在,鞘磷脂是真核生物膜脂的重要组成成分之一,主要分布在细胞膜的外层^[6]。

魔芋(konjac)属于天南星科(Araceae)魔芋属(*Amorphophallus*)多年生宿根草本植物,其中神经酰胺的含量很高,可达0.15%~0.2%。魔芋作为一种富含神经酰胺类物质的资源植物引起人们极大的兴趣,神经酰胺的前体鞘磷脂通过与发酵结合利用磷脂酶C的定向酶解可将结合态的神经酰胺释放

出来。为了进一步提高魔芋中神经酰胺的提取率,有必要对魔芋中结合态的神经酰胺即鞘磷脂进行分析。

本文对魔芋中的神经酰胺类物质提取进行了研究,并利用高效液相/蒸发光散射检测对魔芋神经酰胺粗品中的结合态神经酰胺即鞘磷脂进行了定性定量分析,以期对魔芋资源的开发利用和神经酰胺类物质的工业化生产提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

鲜魔芋采自本项目组承担的“双百”工程建设基地(桑植两河口乡)栽培大田,随机取样。

1.1.2 试剂和仪器

鞘磷脂(购于Sigma公司),色谱纯的乙腈、甲醇(购于国药集团化学试剂有限公司),其他试剂均为分析纯。液相色谱仪为Agilent 1200(美国),检测器为蒸发光散射检测器(Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) Alltech ELSD3300(美国)。色谱柱为ZORBZX Eclipse XDB-C18(5 μm, 4.6 mm × 250 mm, Ag-

收稿日期: 2009-09-07 接受日期: 2010-01-06

基金项目: 湖南省科技计划重大专项(04NK1002)

* 通讯作者 E-mail: yywu357@sohu.com

ilent 美国)。

1.2 试验方法

1.2.1 魔芋粉的制备

鲜魔芋洗净去皮→切鲜芋片→亚硫酸钠护色→30℃烘干→粉碎,即得魔芋粉。

1.2.2 粗提

准确称取适量魔芋粉(精确到0.0001 g)放入圆底烧瓶中,加入实验设计要求的一定浓度和体积的溶剂,圆底烧瓶上接40 cm冷凝管,在实验设计要求的温度下,冷凝回流提取。提取结束后,离心(4000 r, 10 min)用滤纸过滤,并用一定体积石油醚萃取三次,取石油醚层在旋转蒸发器中蒸干后加入少量石油醚,在超声波清洗器上洗脱得到魔芋神经酰胺粗品。

1.2.2.1 提取溶剂的选择 根据脂类的溶解性,选择三种不同极性的溶剂石油醚、乙酸乙酯、A 溶剂(主要成份为乙醇)进行比较,在料液比为1:10,水浴温度95℃,提取时间为10 h的条件下对魔芋神经酰胺进行回流提取,乙醇提取完毕后用一定体积石油醚萃取,然后对粗提物称重。

1.2.2.2 提取条件的优化 本试验采用回流提取法进行粗提物的提取,对提取效果有影响的因素主要有溶剂用量、浓度差、提取时间和提取的温度。采用正交试验法考察上述因素对粗提物量的影响,确定最佳提取工艺。表头设置见表1。

表1 正交因素水平表

Table 1 Experimental factors and levels

水平 Lever	浓度(%) Concentration	温度(℃) Temperature	固液比(g/mL) Solid- liquid ratio	提取时间(h) Time
1	70	60	1:10	6
2	80	70	1:20	8
3	90	80	1:25	10
4	95	90	1:30	12

1.2.2.3 最佳提取工艺重现性考察

在最佳提取工艺条件下,按照1.2.2的方法操作。

1.2.2.4 不同来源魔芋神经酰胺的提取

在最佳提取工艺条件下,对花魔芋,珠芽魔芋,花魔芋皮,魔芋飞粉进行神经酰胺粗品的提取,按照1.2.2的方法操作。

1.2.3 魔芋中鞘磷脂含量的分析

采用HPLC-ELSD法对鞘磷脂进行含量分析

1.2.3.1 色谱条件

参考文献^[7],将流动相做了改进,采用乙腈/甲醇=98:2,流速:1 mL/min,色谱柱:ZORBZX Eclipse XDB-C₁₈,柱温:35℃,蒸发光散射检测器温度40℃,氮气流速1.5 L/min,检测灵敏度为2。

1.2.3.2 标准品溶液的配制

精密称取标准品鞘磷脂1 mg,置于10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定溶至刻度,摇匀即得。

1.2.3.3 样品溶液的制备

精密称取已制备的魔芋神经酰胺粗品0.5 g,置于50 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定溶至刻度,摇匀即得。

1.2.3.4 标准曲线的绘制

吸取鞘磷脂标准品溶液5、10、15、20 μL注入色谱仪以峰面积的对数(X轴)和鞘磷脂的重量(ug)的对数(Y轴)为坐标,得到鞘磷脂的定量标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 魔芋神经酰胺提取条件的优化

2.1.1 提取溶剂的选择

分析测定了不同溶剂对魔芋神经酰胺提取量的影响,其结果如图1所示,由图可见,在相同条件下中等极性溶剂乙酸乙酯的提取效果最理想,石油醚提取的效果最差,这与溶剂的极性有密不可分的原因。然后在相同条件下先经A溶剂提取,然后用石油醚萃取后获得的粗品与直接用乙酸乙酯提取获得的粗品相差不大。由于二者对魔芋神经酰胺提取的影响相差微小,且乙酸乙酯的价格较高,在提取过程中加热挥发较严重,不太适宜工业化生产,而且魔芋葡甘聚糖湿法提取所采用的也是A溶剂,考虑二者的结合所以本试验选用A溶剂作为提取溶剂。

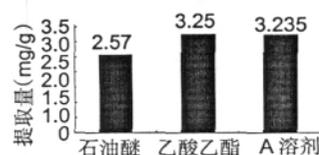


图1 不同溶剂对提取量的影响

Fig. 1 The effect of different solution on extraction

2.1.2 正交试验

由表2和3可以看出,回流提取的四个主要因素其影响程度由大到小依次为A>B>D>C,即A溶剂浓度>温度>提取时间>固液比,对魔芋神经酰

胺提取量影响最大的是 A 溶剂浓度,最小的是固液比,通过实验表明回流提取的最佳工艺条件是 A₄B₃C₁D₂,即 A 溶剂浓度为 95%,温度 80 ℃,提取时间 8 h,固液比为 1:10。

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

序号 No.	A(浓度%) Concentration	B(温度℃) Temperature	C(固液比) Solid-liquid ratio	D(提取时间 h) Time	结果(mg/g) Result
1	70	60	1:10	6	0.385
2	70	70	1:20	8	0.525
3	70	80	1:25	10	0.760
4	70	90	1:30	12	2.340
5	70	60	1:20	10	3.435
6	80	70	1:10	12	1.935
7	80	80	1:30	6	2.600
8	80	90	1:25	8	3.565
9	80	60	1:25	12	3.380
10	90	70	1:30	10	3.210
11	90	80	1:20	8	3.595
12	90	90	1:10	6	3.235
13	95	60	1:30	8	3.470
14	95	70	1:25	6	3.190
15	95	80	1:20	12	3.755
16	95	90	1:10	10	4.105
K1j	1.002	2.667	2.505	2.353	
K2j	2.884	2.215	2.737	2.789	
K3j	3.355	2.678	2.724	2.878	
K4j	3.630	3.311	2.905	2.853	
Rj	2.628	1.096	0.400	0.525	
因素主次	1	2	4	3	
优水平	A4	B3	C1	D2	

表 3 方差分析表

Table 3 Variance analysis

变异来源 Variation source	平方和 Squares	自由度 DOF	F 值 F value	F _a	显著水平 Level
浓度	16.832	3	12.233	9.280	*
温度	2.473	3	1.916	9.280	
固液比	0.323	3	0.254	9.280	
提取时间	0.729	3	0.573	9.280	
误差	1.27	3			

* $P < 0.05$

2.1.3 最佳提取工艺的重现性考察

按照选定的试验条件 A₄B₃C₁D₂ 进行重复试

验,结果见表 4,本优选项下重复试验的重现性较好,最高提取量可达 4.34 mg/g, RSD 为 1.48%。

表 4 重现性试验结果

Table 4 The resultsof repeated experiment

样品 Sample	总量(g) Total	提取率(mg/g) Extraction rate	平均值 Average	RSD%
1	0.209	4.18		
2	0.210	4.20		
3	0.217	4.34	4.24	1.48
4	0.213	4.25		
5	0.211	4.22		

2.1.4 不同来源魔芋神经酰胺粗品的含量分析

不同来源魔芋神经酰胺粗品进行定量分析,结果见图 2。

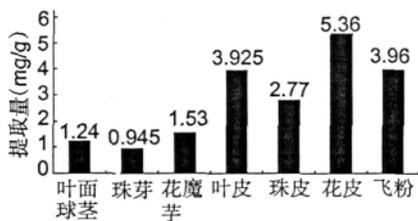


图 2 不同来源魔芋神经酰胺粗品的含量

Fig. 2 The konjac ceramide content of different source

在相同条件下,不同品种的魔芋粉神经酰胺粗品的含量表现出种间差异,而且魔芋不同部位神经酰胺粗品的含量也有差异。

2.2 魔芋中鞘磷脂的分析

2.2.1 鞘磷脂的标准曲线

$Y = 0.6911X - 5.6874 R^2 = 0.9942$

2.2.2 精密度与稳定性试验

精密吸取标准品溶液分别在 0、4、6、24、72 h 进样五次,每次进样 10 μL,峰面积分别为 142.6、153.1、149.4、152.9、139.7,峰面积 RSD = 4.13%,表明鞘磷脂在 72 h 内稳定,仪器精密度良好。

2.2.3 样品测定

对花魔芋、花魔芋皮、珠芽魔芋、魔芋飞粉总脂中的鞘磷脂进行测定,鞘磷脂标准品及每种样品色谱分离图见图 3~5。

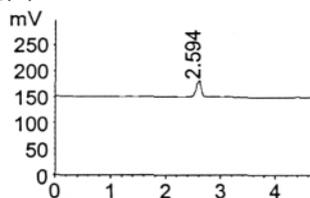


图 3 鞘磷脂的分离色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of sphingomyelin

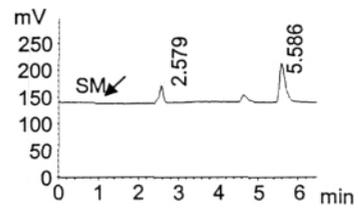


图 4 花魔芋的分离色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of Amorphophallus Konjac

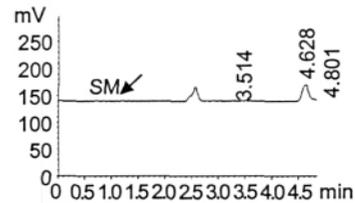


图 5 珠芽魔芋的分离色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of Amorphophallus bulbifer (Roxb.) Blume

每种样品的鞘磷脂含量分析结果见表 5。

表 5 样品中鞘磷脂的含量

Table 5 The content of SM in the extracted solution

样品 Sample	鞘磷脂的含量(%) Content of sphingomyelin
花魔芋	2.88
花魔芋皮	1.99
珠芽魔芋	2.5
魔芋飞粉	3.9

通过对不同来源魔芋中鞘磷脂的含量分析发现,以上四种样品中均含有较多的鞘磷脂。魔芋飞粉是在精粉加工过程中,由魔芋表皮等部分组成的粉末飘落到石臼周围而形成的,其鞘磷脂含量最高,这可能是由于魔芋干法加工过程中形成的飞粉使其鞘磷脂得到了变相的富集。

2.2.4 重现性试验

精密吸取样品溶液,连续进样 5 次,每次进样 5 μL,峰面积分别为 1027.3、1025.9、1058.4、1034.6、1041.8,峰面积的 RSD = 1.28%,表明该方法重现性良好。

2.3 回收率试验

在样品溶液中加入一定量的鞘磷脂标准品,连续进样五次,每次进样 10 μL,计算其回收率,结果见表 6。

表6 回收率实验结果

Table 6 The results of recovery tests for samples

序号 No	加入标准 品的量(μg) Adding the content of standard	样品 含量(μg) Content of sample	回收率(%) Recovery	平均回 收率(%) Average	RSD(%)
1			92.7		
2			93.8		
3	0.5	1.44	95.6	93.5	1.39
4			93.1		
5			92.3		

3 结论

3.1 采用经典的提取方法-回流提取法对魔芋神经酰胺进行提取,以期提取完全,并对其提取溶剂和提取条件进行了优化,从而获得最大的提取量。实验结果表明:在A溶剂浓度为95%,温度80℃,提取时间8h,固液比为1:10的条件下对魔芋神经酰胺进行提取获得了最佳的效果,最高提取量可达4.34 mg/g。并且在最优条件下对不同来源的魔芋神经酰胺进行提取,发现品种间、同一品种的不同部位均存在着或多或少的差异。

3.2 利用HPLC-ELSD法对魔芋中的鞘磷脂进行了定性定量分析,发现花魔芋、花魔芋皮、珠芽魔芋、魔芋飞粉中均有鞘磷脂的存在,花魔芋和珠芽魔芋这两个品种间存在种间差异,但是差别不是很大;花魔芋粉和皮中的含量相差很大,表明鞘磷脂在粉中存

在较多。魔芋飞粉是在魔芋精粉加工过程中形成的分子小、重量轻的粉末,其鞘磷脂的含量最高。因而不不管是魔芋粉还是魔芋飞粉均可与发酵结合利用磷脂酶C的定向酶解获得较高的神经酰胺,应用前景很乐观。

参考文献

- Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Annu Rev Biochem*, 1981, 50: 733-764.
- Merrill AH Jr, Hannun YA, Bell RM. Sphingolipids and their metabolites in cell regulation. *Adv Lipid Res*, 1993, 25: 1-24.
- Ballou LR, Lauderkind SJ, Rosloniec EF, et al. Ceramide signaling and the immune response. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1301: 273-276.
- Xin H(辛宏), Yan XT(颜兴涛), Hao XH(郝秀华), et al. Induction of apoptosis by ceramide in human promyelocytic cells and its mechanism. *Chinese Journal of Immunology*(中国免疫学杂志), 1999, 15: 223-227.
- Sun QJ(孙庆杰). Research and development of natural ceramide. *China Oils Fats*(中国油脂) 2003, 28(2): 11-15.
- Hannun YA, Bell RM. Function of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*, 1989, 243: 500-507.
- Dong W(董伟), Zhou JZ(周建中), Li JX(李建新), et al. Separation and quantification of erythrocyte membrane phospholipid by high performance liquid chromatography. *Chin J Hematol*(中华血液学杂志), 1995, 16: 43.

(上接第550页)

- Shanker K, Fatima A, Negi AS, et al. RP-HPLC method for the quantitation of glabridin in Yashti-madhu (*Glycyrrhiza glabra*). *Chromatographia* 2007, 65: 771-774.
- Li J(李佳), Song XB(宋新波), Yu BL(余保林), et al. Content determination of glabridin in *G. glabra* L. with

HPLC. *Tianjin J Tradit Chin Med*(天津中医药) 2008, 25: 157-158.

- Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中国药典), Vol. I. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 59-60.