

鱼头糖脂的提取及初步分析

刘安军, 刘娟娟, 曹东旭, 王玥玮

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 以鲤鱼头为原料, 用氯仿、甲醇方法提取糖脂。以粗脂得率为指标, 通过单因素实验对粗脂的提取条件进行优选, 然后用硅胶柱层析对提取的粗脂进行分离纯化。同时对得到的糖脂进行薄层色谱分析, 选择最优展开剂与显色剂。结果表明鱼头粗脂提取的最佳条件为: 料液比 1:15, 温度为 28 °C, 搅拌时间 24 h。最优展开剂为: 氯仿:甲醇:冰乙酸:水=100:20:12:5; 最优显色剂为碘蒸气。

关键词: 糖脂; 鱼头; 薄层色谱分析

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)12-0044-03

Extraction and Preliminary Analysis of Glycolipids From Fish Head

LIU An-jun, LIU Juan-juan, CAO Dong-xu, WANG Yue-wei

(College of Food Engineering and Biotechnology, TianJin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In this study, glycolipids was extracted from heads of carp cyprinoids with chloroform and methanol. The best extraction conditions were determined by single factor test and as follows: the ratio of solid to liquid of 1:15, extracting temperature of 28 °C and stirring time of 24 h. The achieved crude glycolipid was then purified by column chromatography and the best developing solvents were the mixture of chloroform, methanol and water with their ratio being of 100:20:12:5. Besides, iodine gas was chosen as the best colour developing reagent.

Key words: glycolipids; fish head; thin layer chromatographic analysis

糖脂 (Glycolipids) 是糖类通过其还原末端以糖苷键与脂类连接起来的化合物。因其结构不同, 糖脂在生物体中的作用有所不同。近年来, 化学合成或从天然物中提取很多新的糖脂, 糖脂在医药、化妆品和食品中应用渐渐引起人们的关注^[1]。

鱼类加工会产生大量的下脚料, 包括鱼头、鱼骨、鱼鳞和内脏等, 约占原料鱼的 40%~55%^[2], 鱼头占到 24%~34%, 鱼头除含大量的蛋白质外, 还含多种生物活性物质, 糖脂就是其中重要的活性组分之一。尽管国内外对糖脂的报道很多, 但从鱼头中提取糖脂的研究甚少, 本文探讨了从鱼头中提取糖脂并对其进行优化, 以期开辟一条新的途径合理利用鱼头, 变废为宝。

1 材料和方法

1.1 主要仪器、材料与试剂

1.1.1 主要仪器

E-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); XMTB 恒温水浴锅 (上海德兆仪器仪表有限公司); ESJ205-4 型电子天平 (沈阳龙腾电子称量仪器有限公司)

收稿日期: 2007-07-14

基金项目: 天津科技大学引进人才科研启动基金 (20060422)

作者简介: 刘安军 (1963-), 男, 教授, 研究方向为食品功能因子与保健机理

司); 电动搅拌器 (天津河东利华仪器厂); SHB-III 循环式多用真空泵 (郑州长城科技工贸有限公司)。

1.1.2 主要材料与试剂

可裁剪型硅胶板; 柱层析硅胶 (试剂纯); 氯仿 (分析纯); 甲醇 (分析纯); 丙酮 (分析纯); 冰乙酸 (分析纯); 碘 (分析纯); 苯 (分析纯); 98% 硫酸 (分析纯); 香草醛 (分析纯); 磷钼酸 (分析纯); 蒽酮 (分析纯)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

取 48 g 鱼头糜, 置于 1000 mL 烧杯中, 加入 480 mL 氯仿和 240 mL 甲醇 (氯仿/甲醇 $v/v=2:1$), 放置于 38 °C 恒温水浴锅中, 用电动搅拌器于低速下搅拌 24 h 后进行抽滤。滤液于 55 °C 真空旋转蒸发去除有机溶剂, 并加入适量无水硫酸钠, 除去水分^[3]后得鱼头糖脂粗提物。

1.2.2 单因素试验设计

本研究通过对提取过程中料液比 (m/v)、浸提温度、浸提时间等影响粗脂得率的因素进行单因素试验, 确定最佳的提取条件。

1.2.3 糖脂的分离纯化

将提取的粗脂用活化的硅胶层析柱进行分离纯化, 洗脱液依次为氯仿、丙酮、甲醇, 洗脱下来的物

质分别为中性脂、糖脂、磷脂。收集洗脱溶液，将丙酮收集液于 55 °C 真空旋转蒸发^[3]，得到的浓缩物质在冰柜中保存，待分析时用。

1.2.4 糖脂的红外光谱测定

用氮吹仪将样品溶液中的溶剂吹干，取 1~2 mg 试样与 200 mg 纯 KBr 研细均匀，置于模具中，用 $5 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ Pa 压力在油压机上压成透明薄片测定。试样和 KBr 都应经干燥处理，研磨到粒度小于 2 μm，以免散射光影响。

1.2.5 糖脂组分的 TLC 的检测

用毛细点样管将糖脂制备样品点于活化的硅胶薄层层析板上，置于用展开剂平衡 2 h 的层析缸中，室温下展开。待展开剂前沿走至距层析板顶端约 1 cm 时，取出，自然晾干。然后进行显色处理。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 不同料液比对粗脂提取率的影响

取 48 g 样品按下列料液比加入不同体积 (480 mL, 624 mL, 720 mL, 816 mL, 960 mL) 的氯仿: 甲醇 (v/v=2:1) 混合液，38 °C 下提取 24 h，抽滤，真空旋转蒸发浓缩。结果如图 1。从图 1 知在其它条件相对固定的情况下，料液比对粗脂提取率有很大影响。料液比在 1:10 到 1:20 是逐渐增加趋于平缓的过程。当料液比为 1:15 时即能达到最大的粗脂得率，减少了有机溶剂的用量，一定程度上减少了对操作人员的伤害。

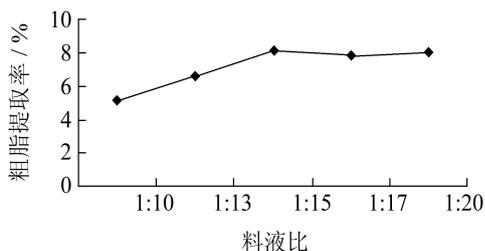


图1 料液比与提取率的关系图

2.1.2 不同温度对提取率的影响

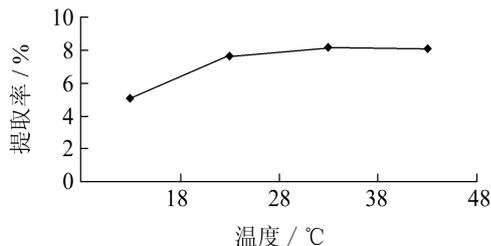


图2 温度与提取率的关系图

图 2 为温度与粗脂提取率的关系图。由图 2 可知，在其它条件相对固定的情况下温度的变化对粗脂提取

率也有较大影响。温度在 18 °C 到 38 °C 范围内，是一个递增趋于平缓的过程。温度为 28 °C，38 °C，48 °C 时提取率较高，考虑到粗脂得率相差不多而且温度较低、能耗少，从成本考虑，选择 28 °C 为最佳提取条件。

2.1.3 不同提取时间对提取率的影响

图 3 为搅拌时间与粗脂提取率的关系图。由图 3 可知，在其它条件相对固定的情况下搅拌时间对粗脂提取率也有较大影响。时间在 12 h 到 30 h 范围内，是一个递增的过程。时间为 24 h，30 h 时提取率较高，考虑到得率相差不多而且搅拌时间较短、能耗少，从成本考虑，选择 24 h 为最佳提取条件。

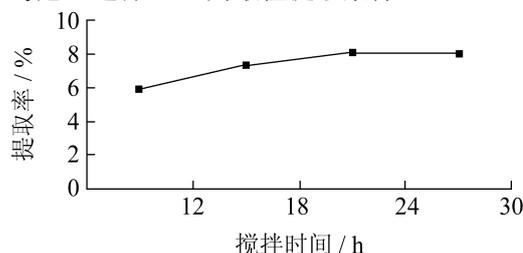


图3 搅拌时间与提取率的关系图

综合上述条件，粗脂提取的最佳条件为：料液比 1:15 (m/v)，温度 28 °C，搅拌时间 24 h。在此条件下，粗脂得率为 8.1%。

2.2 红外光谱分析结果

图 4 为制备糖脂的红外光谱图。

结合糖脂的结构特征可以确定并证实：-OH 为糖环上羟基的吸收峰；1747 cm^{-1} 处 C=O 的吸收峰为酯的特征吸收；1713 cm^{-1} 处 C=O 双键的伸缩振动吸收峰为羧基的特征吸收；1088 cm^{-1} 处的 C-O 吸收峰是醚键基团的特征吸收，表明该分子的亲水基是一糖环。723 cm^{-1} 处的吸收峰是由 4 个以上 -CH₂ 所组成的长链产生的吸收峰。综上所述：该分子是含有脂肪酸侧链的糖环类分子，符合糖脂的一般结构特征，可以确定其确实为糖脂。如图 4。

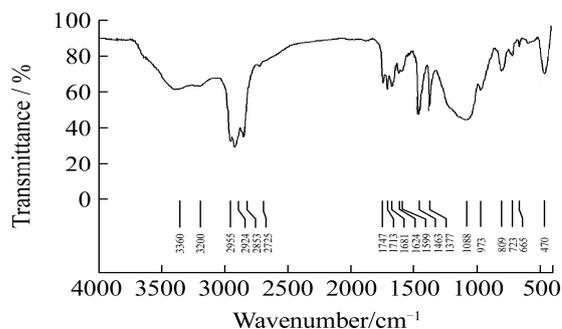


图4 糖脂的红外光谱图

2.3 薄层色谱分析结果

2.3.1 展开剂的选择

选择展开剂是薄层色谱分离成败的关键。

本实验根据提取物质的极性,选择了7种展开体系。分别为:①丙酮:苯:水:乙酸=91:30:6:2;②氯仿:甲醇=3:1^[4];③氯仿:甲醇:水=65:25:4;④氯仿:甲醇:水=60:35:8^[5];⑤氯仿:甲醇:水=75:25:3;⑥氯仿:甲醇:冰乙酸:水=100:20:12:5^[6];⑦氯仿:丙酮:乙酸=6:6:1^[7]。

通过反复实验、比较,展开剂⑥的展开效果最好,其它展开剂虽然也可将糖脂分离,但没有⑥分离得清晰,因此在此后的实验中一直采用⑥氯仿:甲醇:冰乙酸:水=100:20:12:5。

2.3.2 显色剂的选择

本实验选择了4种显色方法。

①在硅胶板上喷淋0.5%的香草醛溶液(0.5%香草醛-乙醇溶液/98%硫酸(v/v=97/3)),自然晾干后,用电吹风加热至显色。

②将硅胶板置于有碘蒸气的烧杯中显色。

③在硅胶板上喷淋3%磷钼酸-乙醇溶液(磷钼酸/乙醇(m/v=3/100)),自然晾干后,用电吹风加热至显色。

④在硅胶板上喷淋蒽酮-硫酸溶液(0.2g蒽酮溶于100mL98%硫酸中),自然晾干后,用电吹风加热至显色。



图5 提取糖脂的薄层色谱图

注:展开剂,氯仿:甲醇:冰乙酸:水=100:20:12:5(v/v/v/v);显色剂,碘蒸气。

试验结果发现香草醛-乙醇溶液、磷钼酸-乙醇溶液显色效果相当,其操作方法都是将显色剂喷淋在硅胶板上,自然晾干后,用热风吹至显色。蒽酮-硫酸溶液具有强烈的腐蚀作用,与硅胶板后面的金属反应产生大量的气泡,染色效果不好。

应用碘蒸气显色方法快速、简单、敏感、无毒。与香草醛乙醇溶液、磷钼酸乙醇溶液比较,糖脂在TLC板上的位置没有变化,说明碘显色剂对显色底物

的位置和结构没有影响;而采用碘显色法进行糖脂显色,方法简单,只需将展开后的TLC板置入碘缸中即可;显色具有反复性。如果将显色后的TLC板从碘缸中取出,显色结果会逐渐消退,但重新置入碘缸中,颜色又会再次出现。这种重复显色特点极大地方便了糖脂的分析研究^[8]。

用硅胶柱分离纯化后的糖脂,进行薄层色谱分析。图5为提取糖脂的薄层色谱分析结果。

3 小结

3.1 鱼头粗脂最佳提取条件为料液比1:15(m/v),温度28℃,搅拌时间24h。在最优条件下,粗脂得率为8.1%。

3.2 根据展开剂的选择原则与试验结果分析鱼头糖脂的薄层层析的最优展开剂系统为氯仿:甲醇:冰乙酸:水=100:20:12:5(v/v/v/v)。试验结果斑点圆且集中。最优的显色方法是碘显色方法。

参考文献

- [1] 易翠平,王立,姚惠源.糖脂分类及其应用[J].粮食与油脂,2003(5):25
- [2] 龚钢明,顾惠,蔡宝国.鱼类加工下脚料的资源化与利用途径[J].中国资源综合利用,2003,7:23-24
- [3] Galina Novik, Andrzej Gamian, Jos'e da Cruz Francisco, Este-ra Szwajcer Dey. A novel procedure for the isolation of glycolipids from *Bifidobacterium adolescentis* 94 BIM using supercritical carbon dioxide[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 121:555-562
- [4] Naoki Maed, Takahiko Had, Chikako Murakami-Nakai, Isoko Kuriyam, Hideki Ichikaw. Effects of DNA polymerase inhibitory and antitumor activities of lipase-hydrolyzed glycolipid fractions from spinach. Journal of Nutritional [J]. Biochemis-try, 2005, 16:121-128
- [5] 张世忠,张建,张积仁.脑胶质瘤中性鞘糖脂抗原的初步研究[J].中华神经外科杂志,1998,14(2):12-13
- [6] 孔令明,冯作山.螺旋藻中糖脂成分的测定研究[J].新疆农业大学学报,2000,23(2):71-74
- [7] 赵宝贞,文德成,黄芬.用柱层析与薄层层析法从面粉中分离糖脂[J].生物化学与生物物理进展,1986(4):56-57
- [8] 张宗城,张积仁,张建.糖脂研究的创新思路[J].医学与哲学,2000,21(2):39-41