

大豆卵磷脂中二亚油酰磷脂酰胆碱的分离纯化

刘思敏¹, 从艳霞¹, 黄俊圻¹, 陈欢¹, 龚任², 李冰², 张海龙¹, 齐玉堂¹, 张维农¹

(1. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 国粮武汉科学研究设计院有限公司, 武汉 430079)

摘要:以大豆粉末磷脂为原料, 采用 95% 乙醇溶液提纯得到卵磷脂, 再采用反相制备色谱系统分离纯化得到二亚油酰磷脂酰胆碱(DLPC)。探讨了洗脱剂种类、洗脱流速、上样量对分离纯化 DLPC 的影响。结果表明: 以甲醇溶液作为洗脱剂进行洗脱时, 在甲醇体积分数 95%、洗脱流速 28 mL/min、上样量 0.5 g (以 40 g C18 柱填充材料为基准) 时, DLPC 纯度可达 91.2%, 得率为 21.5%; 以乙醇溶液作为洗脱剂进行洗脱时, 在乙醇体积分数 80%、洗脱流速 28 mL/min、上样量 0.75 g (以 40 g C18 柱填充材料为基准) 时, DLPC 纯度可达 92.6%, 得率为 20.1%。从 DLPC 的纯度考虑, 以乙醇溶液作为洗脱剂优于甲醇溶液。

关键词:大豆粉末磷脂; 二亚油酰磷脂酰胆碱; 反相柱色谱; 纯化

中图分类号: TS225.1; TS221 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)03-0132-05

Separation and purification of dilinoleoylphosphatidylcholine from soybean lecithin

LIU Simin¹, CONG Yanxia¹, HUANG Junqi¹, CHEN Huan¹, GONG Ren²,
LI Bing², ZHANG Hailong¹, QI Yutang¹, ZHANG Weinong¹

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. China Grain Wuhan Scientific Research & Design Institute Co., Ltd., Wuhan 430079, China)

Abstract: Lecithin (PC) was obtained from soybean powder phospholipids by purification with 95% ethanol solution, and then dilinoleoylphosphatidylcholine (DLPC) was separated and purified by reverse phase chromatography preparation system. The effects of eluent type, flow rate of eluent and loading amount on the separation and purification of DLPC were investigated. The results showed that the purity of DLPC was 91.2% and the yield was 21.5% when methanol solution was used as eluent with a volume fraction of 95%, the flow rate of elution was 28 mL/min and the loading amount was 0.5 g (based on 40 g C18 column material). The purity of DLPC was 92.6% and the yield was 20.1% when ethanol solution was used as eluent with a volume fraction of 80%, the flow rate of elution was 28 mL/min, and the loading amount was 0.75 g (based on 40 g C18 column material). In terms of the purity of DLPC, ethanol solution as the eluent is superior to methanol solution.

Key words: soybean powder phospholipids; dilinoleoylphosphatidylcholine; reverse phase column chromatography; purification

二亚油酰磷脂酰胆碱(DLPC)是大豆卵磷脂(PC)的主要活性成分^[1], 具有抗氧化^[2]、预防纤维化^[3]、抗炎、调节细胞凋亡、修复和保护细胞膜^[4]等

独特的药用价值及特殊生理功能。但天然存在的 DLPC 含量并不高, 以大豆磷脂为例, 其中的 DLPC 含量仅为 10% 左右。

国内外对磷脂的研究多集中在磷脂大类及磷脂酰胆碱(PC)分子种类的高效液相色谱检测方法和营养功能上^[5-10], 对特异性磷脂分子(如 DLPC、二油酰磷脂酰胆碱这类具有特定脂肪酰种类和位置的磷脂分子)的分离纯化以及合成的相关报道较少。史苏佳等^[11]提出用正相硅胶柱纯化二亚麻酰磷脂

收稿日期: 2021-04-08; 修回日期: 2021-09-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371783)

作者简介: 刘思敏(1996), 女, 硕士研究生, 研究方向为磷脂的纯化与制备(E-mail)1174791899@qq.com。

通信作者: 从艳霞, 博士(E-mail)congyanxia_1@163.com。

酰胆碱,但未提及对 DLPC 的纯化程度,且以正己烷-甲醇-水作为洗脱剂,不利于回收,同时也不利于产品安全和环境友好^[12]。酶法合成 DLPC 具有反应条件温和、溶剂使用量少的特点,但目前该法对 DLPC 含量提高有限。因此,寻找一种高效、绿色环保的方法制备高纯度 DLPC 具有很好的经济效益与社会价值。本文以大豆粉末磷脂为原料,经 95% 乙醇溶液处理后,得到高纯度的磷脂酰胆碱,再将磷脂酰胆碱溶于乙醇,用反相 C18 柱进行分离。考虑到甲醇在有机溶剂中价格低廉,而乙醇在食品加工中无毒无害,本研究考察了甲醇和乙醇作为洗脱剂对 DLPC 的分离纯化效果,以期制备高纯度的 DLPC 提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

大豆粉末磷脂(PC含量30%,DLPC含量8.5%),安徽素之味生物科技有限公司;无水乙醇、乙醚、丙酮、甘油、乙酸铵,均为分析纯;甲醇、正己烷、无水乙醇,均为色谱纯;*L*- α -磷脂酰胆碱标准品(纯度 $\geq 98\%$),百灵威科技有限公司;1,2-二亚油酰基-3-sn-磷脂酰胆碱(DLPC,纯度 $\geq 99\%$),美国Sigma公司。

1.1.2 仪器与设备

CHEETAH™MP 100/200 中压快速纯化制备系统、中压制备型 Claricep Flash C18 色谱柱(20~35 μm , 100 \AA , 40 g)、Venusil XBP C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),博纳艾杰尔公司;Waters2996 高效液相色谱仪(PDA 检测器)、Waters1525 二元 HPLC 泵,Waters 公司;ME204/02 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;YRE2000E 旋转蒸发仪,巩义市予华仪器有限责任公司;DF-101S 型集热式恒温磁力搅拌器,常州国华电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DLPC 的分离纯化

以大豆粉末磷脂为原料,DLPC 的分离纯化工艺流程如图 1 所示。

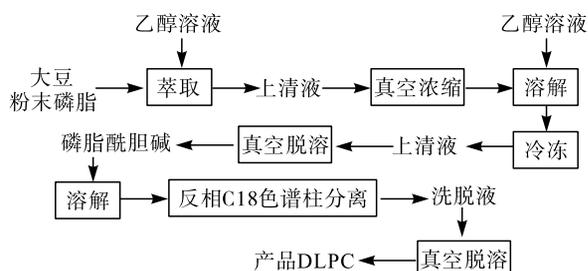


图 1 DLPC 分离纯化工艺流程

1.2.1.1 原料预处理

取 20 g 大豆粉末磷脂于烧杯中,加入 40 mL 95% 的乙醇溶液,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热搅拌均匀,静置,收集上清液,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发除去溶剂,得到磷脂酰胆碱粗提物。取 5 g 磷脂酰胆碱粗提物于具塞圆底烧瓶中,加入 20 mL 95% 的乙醇溶液,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热搅拌溶解,降温至 -7 $^{\circ}\text{C}$,保温 24 h,直接收集上清液,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发除去溶剂,得到高纯度的磷脂酰胆碱(磷脂酰胆碱含量为 90%,其中 DLPC 含量为 28%)。

1.2.1.2 反相 C18 色谱柱分离纯化 DLPC

采用中压制备型 Claricep Flash C18 色谱柱对磷脂酰胆碱中的 DLPC 进行分离纯化。将 1.2.1.1 制备的磷脂酰胆碱溶解于乙醇中(料溶比 0.5:1),以此作为上样原料进行上样,然后用洗脱剂进行洗脱,每 10 mL 收集一玻璃试管,采用 HPLC 分析 DLPC 的纯度,合并 DPLC 纯度大于 50% 的洗脱液,真空脱溶得产品 DLPC。

1.2.2 DLPC 的 HPLC 测定^[8]

1.2.2.1 标准曲线的制作

分别配制质量浓度梯度为 0.10、0.25、0.50、0.75、1.00 mg/mL 的 DLPC 标准溶液,经 0.22 μm 尼龙滤膜过滤后,进行 HPLC 分析。以峰面积(Y)为纵坐标,DLPC 的质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线,得到标准曲线方程($Y = 13\ 074\ 294.896\ 8X + 151\ 506.853\ 7, r^2 = 0.997$)。

HPLC 分析条件:Venusil XBP C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-正己烷-0.05 mol/L 乙酸铵-甘油(体积比 84:6:8:0.6);检测波长 203 nm;流速 1 mL/min;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;进样量 20 μL 。

1.2.2.2 样品处理及测定

对于洗脱液,直接取 1 mL 经 0.22 μm 尼龙滤膜过滤后进行 HPLC 分析。对于 DLPC 产品,取 50 mg DLPC 产品,用 3 mL 乙醇溶解并定容于 25 mL 容量瓶中,再取 1 mL 经 0.22 μm 尼龙滤膜过滤后进行 HPLC 分析。采用面积归一化法计算 DLPC 的纯度。将样品中 DLPC 的峰面积代入 1.2.2.1 标准曲线回归方程,得到 DLPC 含量。分别按式(1)和式(2)计算洗脱液和 DLPC 产品中 DLPC 的得率。

$$Y_1 = c_1 V_1 / m \times 100\% \quad (1)$$

式中: Y_1 为洗脱液中 DLPC 得率; c_1 为洗脱液中 DLPC 含量,mg/mL; V_1 为洗脱液体积,mL; m 为上样量,mg。

$$Y_2 = c_2 V_2 / m \quad (2)$$

式中: Y_2 为产品中 DLPC 得率; c_2 为产品乙醇溶液中 DLPC 含量, mg/mL; V_2 为定容体积, mL; m 为上样量, mg。

2 结果与讨论

2.1 甲醇洗脱体系对 DLPC 分离纯化的影响

2.1.1 洗脱流速的影响

在柱分离过程中洗脱流速是影响分离效果和成本的重要因素,洗脱流速过快时,样品来不及平衡,影响分离效果;洗脱流速过慢时,会导致柱内扩散现象严重,同样会影响分离效果^[13]。此外,洗脱流速过快或者过慢还可能造成溶剂消耗量过大,增加生产成本。因此,有必要确立适宜的洗脱流速。本实验以甲醇作为洗脱剂,固定上样量为 0.5 g (以 40 g C18 柱填充材料为基准,下同),在洗脱流速分别为 12、20、28 mL/min 时,对合并洗脱液的 DLPC 纯度和得率进行分析,结果分别如图 1 和表 1 所示。

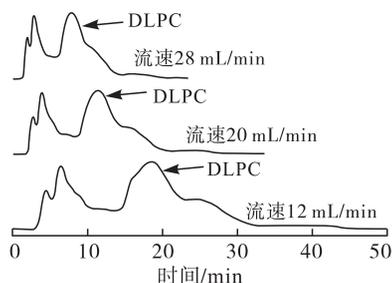


图 1 甲醇洗脱体系下不同洗脱流速时的色谱图

表 1 甲醇洗脱体系下洗脱流速对 DLPC 分离效果的影响

洗脱流速/ (mL/min)	DLPC 纯度/%	DLPC 得率/%	溶剂消 耗量/mL
12	90.7	19.8	270
20	85.1	21.9	290
28	83.7	24.1	280

由图 1 可见,随着洗脱流速的加快,DLPC 在更短的时间内被洗脱出来,但不同结构的磷脂酰胆碱分离效果变差。由表 1 可知,随着洗脱流速的增加,DLPC 纯度降低,得率升高。洗脱流速为 20、28 mL/min 时,DLPC 纯度分别为 85.1% 和 83.7%,二者纯度相差不大,同时二者溶剂消耗量接近;但洗脱流速为 28 mL/min 时 DLPC 得率更高,且洗脱时间更短。相比之下,以 28 mL/min 的洗脱流速进行洗脱在生产上更具有实际价值。

2.1.2 甲醇体积分数的影响

在反相柱分离系统中,洗脱剂中添加适量水分能提高分离效果,但水分含量过高会使反相柱的保留性能大大减弱^[14]。本实验中固定洗脱流速为 28 mL/min,上样量为 0.5 g,以不同体积分数的甲醇为

洗脱剂,对合并洗脱液的 DLPC 纯度和得率进行分析,结果如图 2 和表 2 所示。

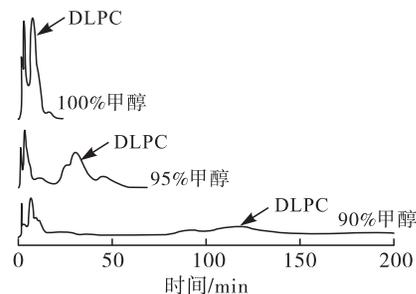


图 2 甲醇洗脱体系下不同甲醇体积分数时的色谱图

表 2 甲醇洗脱体系下甲醇体积分数对 DLPC 分离效果的影响

甲醇体积 分数/%	DLPC 纯度/%	DLPC 得率/%	溶剂消 耗量/mL
100	83.7	24.1	280
95	93.7	21.5	1 148
90	95.5	21.2	4 480

由表 2 和图 2 可见,随着甲醇体积分数的降低,DLPC 纯度提高,在甲醇体积分数为 90% 时,DLPC 纯度高达 95.5%,与 95% 的甲醇相比,以 90% 甲醇作为洗脱剂进行洗脱时,其纯度提高不到 2 百分点,但洗脱时间延长了 3 倍,溶剂消耗量增加了 3 倍。综合考虑,95% 甲醇更适合作为 DLPC 的洗脱剂。

2.1.3 上样量的影响

在制备液相色谱中,样品的上样量是影响分离效果的重要因素之一。固定相负载样品的能力是一定的,上样量过多或者过少都不利于分离。上样量过小,分离效率变低;上样量过大,会导致相邻峰的分度降低,甚至重叠在一起无法分离,分离效果变差^[15]。本实验以 95% 甲醇为洗脱剂,固定洗脱流速为 28 mL/min,以不同的上样量进行上样,对合并洗脱液的 DLPC 纯度和得率进行分析,结果如图 3 和表 3 所示。

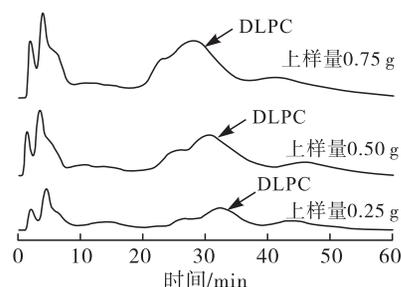


图 3 甲醇洗脱体系下不同上样量时的色谱图

由图 3 可见,不同上样量下 DLPC 的洗脱时间无明显差异。由表 3 可见,整体来看随着上样量的

增加,DLPC 纯度呈下降趋势,而得率呈升高趋势。考虑到将该方法投入到生产中应尽可能提高样品处理量,选择 0.5 g 上样量,既达到 DLPC 较高纯度的要求,又达到更高产量的要求。

表 3 甲醇洗脱体系下上样量对 DLPC 分离效果的影响

上样量/g	DLPC 纯度/%	DLPC 得率/%	溶剂消耗量/mL
0.25	93.7	23.1	1 008
0.50	93.6	23.4	1 148
0.75	88.1	23.7	1 092

2.2 乙醇洗脱体系对 DLPC 分离纯化的影响

2.2.1 洗脱流速的影响

按 2.1.1 分离条件,将洗脱剂甲醇换为乙醇,考察不同洗脱流速对 DLPC 分离效果的影响,结果如图 4 和表 4 所示。

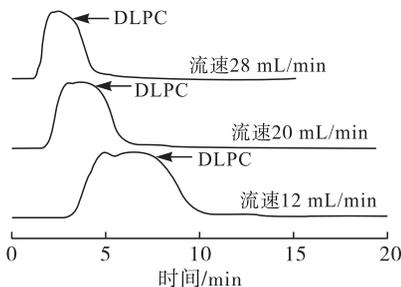


图 4 乙醇洗脱体系下不同洗脱流速时的色谱图

表 4 乙醇洗脱体系下洗脱流速对 DLPC 分离效果的影响

洗脱流速/(mL/min)	DLPC 纯度/%	DLPC 得率/%	溶剂消耗量/mL
12	57.0	21.5	102
20	53.5	22.7	100
28	51.3	23.8	74

由图 4 可见,乙醇作为洗脱剂时,不同结构的磷脂酰胆碱重叠在一个峰上,无法分离。与甲醇相比,乙醇极性更弱,洗脱能力更强,磷脂酰胆碱更快流出,导致分离效果变差。由表 4 可见,在 3 种洗脱流速下,DLPC 纯度介于 50% ~ 60% 之间,得率介于 21% ~ 24% 之间。综合考虑效率和成本,选择洗脱流速为 28 mL/min。

2.2.2 乙醇体积分数的影响

相较甲醇洗脱体系,乙醇对磷脂酰胆碱洗脱能力更强,为了提高分离效果,需考虑更高水分含量对 DLPC 分离效果的影响。按 2.1.2 分离条件,将洗脱剂不同体积分数的甲醇换成不同体积分数的乙醇,考察乙醇体积分数对 DLPC 分离效果的影响,结果如图 5 和表 5 所示。

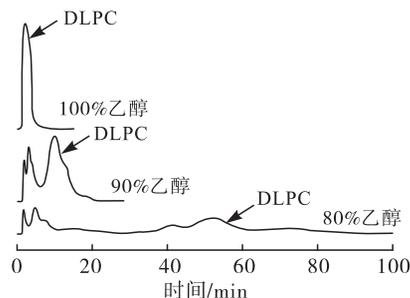


图 5 乙醇洗脱体系下不同乙醇体积分数时的色谱图

表 5 乙醇洗脱体系下乙醇体积分数对 DLPC 分离效果的影响

乙醇体积分数/%	DLPC 纯度/%	DLPC 得率/%	溶剂消耗量/mL
100	51.3	23.8	74
90	77.7	21.8	322
80	96.1	19.7	1 764

由图 5 和表 5 可见,随着乙醇体积分数的降低,DLPC 分离效果得到明显改善。乙醇体积分数为 90% 时,DLPC 纯度仅为 77.7%,远未达到高纯度磷脂酰胆碱的要求;而乙醇体积分数为 80% 时,DLPC 纯度可达 96.1%。因此,选择 80% 乙醇作为洗脱剂。

2.2.3 上样量的影响

以 80% 乙醇为洗脱剂,固定洗脱流速为 28 mL/min,考察上样量对 DLPC 分离效果的影响,结果如图 6 和表 6 所示。

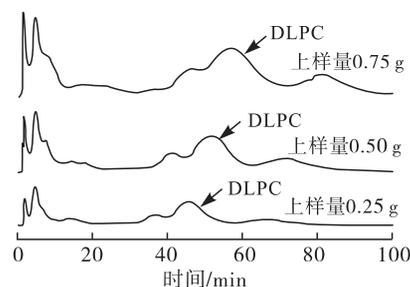


图 6 乙醇洗脱体系下不同上样量时的色谱图

表 6 乙醇洗脱体系下上样量对 DLPC 分离效果的影响

上样量/g	DLPC 纯度/%	DLPC 得率/%	溶剂消耗量/mL
0.25	97.8	19.5	1 540
0.50	96.1	19.7	1 764
0.75	94.9	21.0	2 016

由图 6 可见,不同上样量下 DLPC 的洗脱时间无明显差异。由表 6 可见,随着上样量的增加,DLPC 的纯度略有下降,但都高于 90%,上样量 0.75 g 与 0.50 g 相比,得率上升不到 2 个百分点。综合考虑分离效果和成本,选择上样量为 0.75 g。

2.3 最优条件下产品纯度和得率

对优化的甲醇洗脱体系(95%甲醇,洗脱流速28 mL/min,上样量0.5 g)和乙醇洗脱体系(80%乙醇,洗脱流速28 mL/min,上样量0.75 g)下产品DLPC的纯度和得率进行检测,结果表明,甲醇洗脱体系得到的产品DLPC纯度为91.2%,得率为21.5%,乙醇洗脱体系得到的产品DLPC纯度为92.6%,得率为20.1%。与优化的甲醇洗脱体系相比,乙醇洗脱体系得到的DLPC纯度更高,但得率有所下降,溶剂消耗量也更大。实际工业生产,需结合标准和法规选择合适的洗脱体系。

3 结论

以大豆粉末磷脂为原料提取磷脂酰胆碱,再采用反相制备色谱系统从磷脂酰胆碱中分离纯化DLPC,以不同体积分数的甲醇或者乙醇作为洗脱剂均可实现DLPC的分离纯化,其纯度均能达到90%以上。本实验采用的中压柱色谱分离技术易于工业化,分离效果好,本研究结果将利于推进DLPC的制备及应用。

参考文献:

- [1] 凌文慧. 酶法制备高含量二亚油酰磷脂酰胆碱的研究[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2011.
- [2] NAVDER K P, LIEBER C S. Dilinoleoylphosphatidylcholine is responsible for the beneficial effects of polyenylphosphatidylcholine on ethanol - induced mitochondrial injury in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(4): 1109 - 1112.
- [3] PONIACHIK J, BARAONA E, ZHAO J, et al. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases hepatic stellate cell activation[J]. *J Lab Clin Med*, 1999, 133(4): 342 - 348.
- [4] GUNDERMANN K J, GUNDERMANN S, DROZDZIK M, et al. Essential phospholipids in fatty liver: a scientific update[J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2016(9): 105 - 117.
- [5] AVALLI A, CONTARINI G. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1071(1/2): 185 - 190.
- [6] GLASS R L. Separation of phosphatidylcholine and its molecular species by high - performance liquid chromatography[J]. *J Agric Food Chem*, 1990, 38(8): 1684 - 1686.
- [7] 傅青, 周伟, 金郁. 基于高效液相色谱-串联质谱的磷脂酰胆碱的分离与表征[J]. *中国科技论文在线*, 2018, 13(12): 1356 - 1360.
- [8] 曹栋, 裘爱泳, 王兴国. 大豆磷脂酰胆碱分子类型的研究[J]. *中国油脂*, 2003, 28(12): 49 - 52.
- [9] 张桐栋, 刘永梅, 束海永, 等. 酯酶催化法合成结构化磷脂的研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2019, 32(12): 5 - 7.
- [10] 张维农, 何海波, 冯钰琦, 等. 柱色谱法制备高纯大豆卵磷脂和脑磷脂研究[J]. *中国油脂*, 2004, 29(6): 54 - 58.
- [11] 史苏佳, 曹栋. 一种二亚麻酰磷脂酰胆碱的制备方法: CN104356161A [P]. 2015 - 02 - 18.
- [12] 宋华, 陈福明. 柱层析法分离大豆磷脂[J]. *中国油脂*, 2005, 30(2): 41 - 43.
- [13] WEWERS W, DINGENEN J, SCHULTE M, et al. Selection of chromatographic systems [M]. New York: John Wiley & Sons Ltd., 2005.
- [14] JANDER P, HÁJEK T. Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction - reversed - phase liquid chromatography mechanism, a review [J]. *J Sep Sci*, 2017, 41(1): 145 - 162.
- [15] LAYNE J, FARCAS T, RUSTAMOV I, et al. Volume - load capacity in fast - gradient liquid chromatography effect of sample solvent composition and injection volume on chromatographic performance [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 913(1/2): 233 - 242.

· 公益广告 ·

适度加工, 营养更丰富!

《中国油脂》宣

