

油脂深加工

AB-8大孔吸附树脂纯化蛋黄卵磷脂的工艺研究

吴昊^{1,2},周旋¹,张椿¹

(1. 徐州工业职业技术学院 化学工程技术学院, 江苏 徐州 221140; 2. 中国矿业大学 化工工程学院, 江苏 徐州 221116)

摘要:采用柱层析法对蛋黄卵磷脂纯化工艺进行研究。结果表明,从3种吸附介质中筛选出AB-8大孔吸附树脂为蛋黄卵磷脂的纯化树脂,并通过静态试验得到其对蛋黄卵磷脂的最大吸附率为92.2%,最佳静态吸附时间是60 min。经过中压制备色谱分离,采用干法上样,用体积分数95%的乙醇洗脱,可得到蛋黄卵磷脂的纯化倍数为4倍,纯度达到83.1%,回收率为97.04%。AB-8大孔吸附树脂使用50个操作周期时,卵磷脂吸附率仍在80%以上。表明AB-8大孔吸附树脂纯化蛋黄卵磷脂具有纯化倍数高、回收率高、时间短、重复性好等优点。

关键词:卵磷脂;分离纯化;大孔吸附树脂;中压制备色谱

中图分类号:TQ645;TS253

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)12-0079-05

Purification process of egg yolk lecithin with AB-8 macroporous adsorption resin

WU Hao^{1,2}, ZHOU Xuan¹, ZHANG Chun¹

(1. Chemical Engineering Institute, Xuzhou College of Industrial and Vocational Technology, Xuzhou 221140, Jiangsu, China; 2. School of Chemical Engineering & Technology, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, Jiangsu, China)

Abstract: The purification process of egg yolk lecithin by column chromatography was studied. The results showed that AB-8 macroporous adsorption resin was selected from three kinds of adsorbents to purify egg yolk lecithin, the maximum adsorption rate was 92.2%, and the optimal static adsorption time was 60 min by static test. After separation by medium pressure preparation chromatography, using dry sample, eluted with 95% ethanol, purification multiple, purity and recovery rate of egg yolk lecithin were four times, 83.1% and 97.04%, respectively. The lecithin adsorption rate was above 80% when AB-8 macroporous adsorption resin was used for 50 cycles of operation. Purification process of egg yolk lecithin with AB-8 macroporous adsorption resin had advantages of high purification multiple, high recovery rate, short time, and good repeatability.

Key words: lecithin; separation and purification; microporous adsorption resin; medium pressure preparation chromatography

卵磷脂是构成人体生物膜和神经递质的重要物质,对生物膜和大脑的生理活动有重要的调节功

能^[1]。同时,卵磷脂还具有降低胆固醇、提高血清中胆碱水平、改善机体神经功能障碍、预防心血管系统疾病等作用,因而引起广泛重视。随着人们对健康的不断追求,高纯度卵磷脂需求越来越大,卵磷脂纯度是影响卵磷脂保健品质量的关键因素^[2-5]。由于技术限制,我国高纯度卵磷脂的来源主要通过进口渠道,这极大地阻碍了我国卵磷脂行业的发展,提高卵磷脂的纯度是现阶段急需解决的难题。

由于卵磷脂纯化工艺复杂,工艺成本较高,已成

收稿日期:2018-04-14;修回日期:2018-08-28

基金项目:江苏省大学生创新创业训练计划项目(201713107006Y);徐州市生化资源综合利用与清洁生产重点实验室开放课题(XGY20160406010);江苏省高职院校教师专业带头人高端研修项目(2017GRFX053)

作者简介:吴昊(1980),男,副教授,博士,研究方向为生物资源综合利用(E-mail) wuhao315425@163.com。

为卵磷脂行业的瓶颈。目前,常用的卵磷脂纯化方法有无机盐复合沉淀法、乙酰化法、膜分离法和柱层析法^[6-7]。其中,无机盐复合沉淀法和乙酰化法要用到有毒化学试剂,回收困难,污染环境;膜分离法虽然纯度高,但回收率低,且操作成本高;柱层析法不仅产品纯度高、设备简单,而且操作灵活、容易实现工业化生产,已成为纯化卵磷脂的主要方法^[6-8]。柱层析固定相介质大多数采用吸附填料,主要有氧化铝、硅胶、大孔吸附树脂等。氧化铝由于不可再生性,不能重复使用;硅胶尽管价格低廉、再生性较好,但吸附的选择性较差、分离纯度不高。大孔吸附树脂理化性质稳定,具有良好的选择性、易解吸附、机械强度大、再生效果好、周期使用长等优点,且对提取物兼有分离和筛选作用,被广泛应用于天然产物的分离纯化^[9-10]。AB-8型大孔吸附树脂是苯乙烯型弱极性共聚体,比表面积大,适宜于弱极性物质的分离纯化,特别是多酚、油脂类物质的纯化^[11]。目前,大孔吸附树脂分离纯化卵磷脂鲜有文献报道。

本文通过对3种吸附介质进行静态吸附试验,筛选出合适的吸附介质,并通过静态吸附、解吸对卵磷脂的大孔吸附树脂纯化工艺进行研究,为卵磷脂的高效综合利用提供技术参数。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

新鲜鸡蛋:徐州家乐福超市;硅胶:60~100目;中性氧化铝:100~200目;AB-8大孔吸附树脂;盐酸、氢氧化钠、无水乙醇、丙酮:分析纯;卵磷脂:标准品,Sigma-Aldrich公司。

1.1.2 仪器与设备

FA1204B电子天平;CW-2000超声-微波协同萃取仪;SHZ-III B循环水式多用真空泵;R-206旋转蒸发仪;QT-3多功能摇床;UV1901PCS紫外分光光度计;80-2离心机;DZG-6090真空干燥箱;Isolera one快速自动制备色谱仪:Biotage。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋黄卵磷脂的粗提工艺

将新鲜鸡蛋煮熟,取适量蛋黄置于研钵中,研磨至混合均匀。称取10g蛋黄,按料液比1:5加入80%乙醇溶液。在超声-微波协同萃取仪中,超声功率50W,微波功率600W,时间30s下进行提取;将萃取瓶中溶液倒入真空抽滤机中进行抽滤,取抽滤液;迅速将抽滤液倒入旋转蒸发仪浓缩至原来体积的一半;加入浓缩液一半的丙酮溶液并不断搅拌,产生沉淀为粗卵磷脂,在真空抽滤机下进行二次抽

滤,滤纸上为卵磷脂,在电热真空干燥箱中干燥即得到卵磷脂粗品。

1.2.2 供试品溶液的制备

精密称取10g卵磷脂粗品于250mL的烧杯中,加入100mL95%的乙醇溶液,搅拌并在室温下过滤,可采用加热的方法帮助其溶解^[12]。取滤液用95%乙醇稀释至一定倍数待用。

1.2.3 吸附介质的预处理及装柱

硅胶、氧化铝:分别称取一定量的硅胶和氧化铝在120℃下分别活化50min和5h。活化后冷却至室温,再分别用95%乙醇浸泡24h,湿法装柱,放置使填料充分沉降。

AB-8大孔吸附树脂:称取一定量的AB-8大孔吸附树脂,用95%乙醇浸泡24h,洗涤至无醇味且无浑浊;用5%盐酸浸泡3h,洗涤至中性;用5%氢氧化钠浸泡3h,洗涤至中性,在水中浸泡^[13]。每次静态解吸完毕,重复以上操作,以达到树脂的再生^[14]。取预处理好的树脂,用蒸馏水充分溶胀,湿法装柱。

1.2.4 吸附介质的静态吸附和解吸试验

称取10g预处理过的3种吸附介质,分别加入30mL质量浓度为20mg/mL粗卵磷脂溶液,在摇床中以100r/min,25℃的条件下振荡8h^[15]后,取样液2mL检测计算其平衡质量浓度,求出静态吸附率。

将吸附饱和的吸附介质倒入烧杯中,滤干,擦去吸附介质表面水分,加入30mL95%的乙醇溶液进行解吸试验,室温下100r/min振荡,静态解吸8h^[16],取样液2mL检测计算其平衡质量浓度,求出静态解吸率。

吸附介质对卵磷脂的吸附率以及解吸率按下式计算。

$$A = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \times 100\%$$

$$D = \frac{C_1 V_1}{(C_0 - C_e) V_0} \times 100\%$$

式中:A为吸附率,%;C₀为起始卵磷脂质量浓度,mg/mL;C_e为平衡后吸附液质量浓度,mg/mL;D为解吸率,%;C₁为解吸液质量浓度,mg/mL;V₀为吸附液体积,mL;V₁为解吸液体积,mL。

1.2.5 大孔吸附树脂静态吸附动力学试验

准确称取5g预处理过的AB-8大孔吸附树脂,准确加入质量浓度为20mg/mL粗卵磷脂溶液60mL。在室温下150r/min振荡,每隔20min检测树脂吸附后卵磷脂溶液的质量浓度变化,直到质量浓度变化很小,此时可以确定树脂吸附已经达到饱

和状态。计算卵磷脂在每隔 20 min 后树脂的吸附率,绘制树脂的静态吸附动力学曲线。

1.2.6 卵磷脂纯化

称取 1 g AB-8 大孔吸附树脂,加入 20 mg/mL 粗卵磷脂溶液 20 mL 饱和吸附 1 h,真空浓缩至干,进行干法上样。而后装入 9 g AB-8 大孔吸附树脂层析柱中,在自动制备色谱仪下设定参数:洗脱液体积 90 mL,平衡流速 1 mL/min,洗脱流速 3 mL/min,吸收波长 204 nm。首先用 1~2 倍柱体积蒸馏水洗脱,再用 95% 乙醇溶液进行洗脱,收集洗脱液,浓缩干燥至恒重,得精制卵磷脂。

1.2.7 卵磷脂的纯度和回收率计算

用下列公式计算样液中卵磷脂纯度、纯化倍数和回收率^[17]。

$$P_1 = \frac{C_1 V_1}{M_1} \times 100\%$$

$$P_2 = \frac{C_2 V_2}{M_2} \times 100\%$$

$$N = \frac{P_2}{P_1}$$

$$R = \frac{C_2 V_2}{C_1 V_1} \times 100\%$$

式中: P_1 为粗卵磷脂的纯度,%; C_1 为粗磷脂样品中卵磷脂的质量浓度,mg/mL; V_1 为粗卵磷脂样品溶液的体积,mL; M_1 为粗卵磷脂样品质量,mg; P_2 为精制卵磷脂的纯度,%; C_2 为精制卵磷脂样品中卵磷脂的质量浓度,mg/mL; V_2 为精制卵磷脂样品溶液的体积,mL; M_2 为精制卵磷脂样品质量,mg; N 为纯化倍数; R 为回收率,%。

1.2.8 卵磷脂含量的测定

精密吸取质量浓度为 1.3 mg/mL 的卵磷脂标准溶液 0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 mL,分别用无水乙醇定容在 5 个 5 mL 的容量瓶中,得到质量浓度为 0.052、0.065、0.078、0.091、0.104 mg/mL 的卵磷脂标准溶液,以不加卵磷脂溶液为空白对照,在 204 nm 下分别测出卵磷脂系列溶液的吸光度^[18]。以卵磷脂标准溶液质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制曲线,得到标准曲线方程为 $Y = 0.1877x - 0.0785$, $r = 0.999$ 。

称取一定质量的样品,用 95% 乙醇溶解定容至一定体积的样品溶液,在 204 nm 下检测样液的吸光度,根据卵磷脂标准曲线方程计算样品中卵磷脂的质量浓度。

1.2.9 紫外吸收光谱鉴定

分别取粗卵磷脂、精制卵磷脂溶液在 190~600

nm 下进行全波段光谱扫描,以标准品吸收曲线的最大吸收峰为对照,对纯化液中的卵磷脂进行定性分析。

1.2.10 AB-8 大孔吸附树脂的再生

先用 2 倍柱体积的 5% 盐酸,流速为 3 mL/min 冲洗,再用蒸馏水洗至中性,而后用 2 倍柱体积的 5% 氢氧化钠,流速为 3 mL/min 冲洗,再用蒸馏水洗至中性待用。

2 结果与讨论

2.1 吸附介质的筛选(见表 1)

表 1 不同吸附介质对卵磷脂的吸附和解吸结果

吸附介质	吸附率/%	解吸率/%
硅胶	85.42	25.35
氧化铝	90.94	26.05
AB-8 大孔吸附树脂	92.20	72.98

由表 1 可知,AB-8 大孔吸附树脂的吸附率是 92.20%,能对卵磷脂有很好的吸附,用 95% 的乙醇进行解吸,解吸率达到 72.98%。硅胶和氧化铝尽管吸附率达到 80% 以上,但其解吸率仅为 25.35% 和 26.05%,故不能选用。由于 AB-8 大孔吸附树脂的吸附率高,而且解吸率也高,可以保证卵磷脂能得到有效的回收^[19],这较其他吸附介质有明显的优势。因此,选择 AB-8 大孔吸附树脂对卵磷脂进行纯化较为合适。

2.2 大孔吸附树脂静态吸附动力学曲线(见图 1)

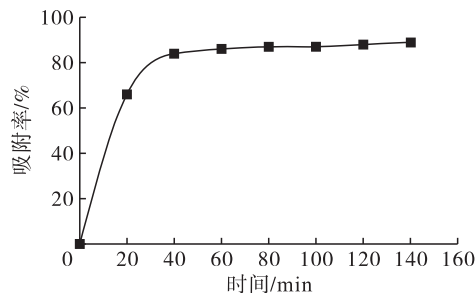


图 1 大孔吸附树脂静态吸附动力学曲线

由图 1 可知,随着吸附时间的延长,AB-8 大孔吸附树脂的吸附效果越好。当吸附时间达到 60 min 时,卵磷脂吸附率达到 86%。这是因为卵磷脂分子不断向树脂内部渗透,随着吸附时间的延长,AB-8 树脂的表面逐渐被卵磷脂分子覆盖^[11],此时树脂的吸附率逐渐达到饱和,但树脂的吸附速率逐渐降低。60 min 后卵磷脂几乎全部被吸附,因此吸附率基本保持不变。综合考虑吸附效率,选择 AB-8 大孔吸附树脂的最佳静态吸附时间是 60 min。

2.3 大孔吸附树脂动态解吸曲线(见图 2)

由图 2 可知,使用 95% 乙醇对卵磷脂进行洗

脱,在洗脱流速 3 mL/min 条件下,卵磷脂能够轻易地被洗脱下来。随着洗脱时间的延长,洗脱液体积逐渐增大,当洗脱液体积达到 60 mL 时,可以获得纯度高的卵磷脂,洗脱液体积超过 60 mL 时,卵磷脂纯度开始下降。因此,确定 AB-8 大孔吸附树脂纯化解吸时洗脱液体积为 60 mL。

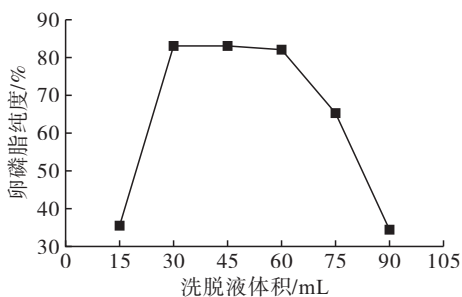


图2 大孔吸附树脂动态解吸曲线

2.4 紫外吸收光谱扫描

图3和图4分别为粗卵磷脂溶液和精制卵磷脂溶液的全波段扫描分析图。

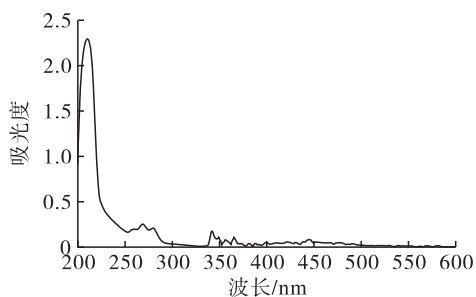


图3 粗卵磷脂溶液的全波段扫描图

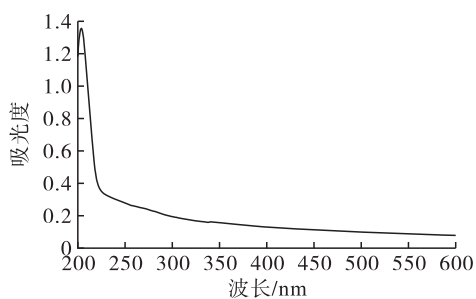


图4 精制卵磷脂溶液的全波段扫描图

由图3和图4对比分析可知,卵磷脂经过 AB-8 大孔吸附树脂纯化后杂峰变少,在 204 nm 处存在最大吸收峰,无其他杂质峰,说明卵磷脂纯度高。

2.5 卵磷脂的纯化结果(见表2)

由表2可知,粗卵磷脂纯度为 20.5%,经 AB-8 大孔吸附树脂纯化后,纯度达到 83.1%,卵磷脂的纯化倍数达到 4 倍,回收率为 97.04%,说明卵磷脂与 AB-8 大孔吸附树脂有较好的结合性和回收效果^[20],AB-8 大孔吸附树脂对卵磷脂的选择吸附性强。

表2 卵磷脂的纯化结果

项目	指标
粗卵磷脂纯度/%	20.5
精制卵磷脂纯度/%	83.1
纯化倍数	4
回收率/%	97.04

2.6 AB-8 大孔吸附树脂的操作稳定性

AB-8 大孔吸附树脂经反复使用后,树脂表面及内部残留许多杂质使柱颜色变深,柱效降低,因而需要再生。考察了树脂再生后的操作稳定性,结果见图5。

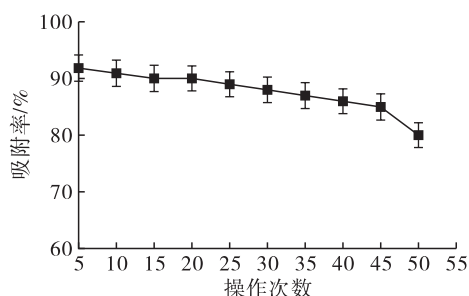


图5 AB-8 大孔吸附树脂操作稳定性

由图5可知,AB-8 大孔吸附树脂使用 50 个操作周期时,卵磷脂的吸附率仍然维持在 80% 以上,表明树脂吸附性能未见明显下降,可见 AB-8 大孔吸附树脂操作性能稳定,可以应用于工业生产。

3 结论

通过对 3 种吸附介质的筛选,选择 AB-8 大孔吸附树脂采用柱层析法进行蛋黄卵磷脂纯化试验。经紫外分光光度计测定,其吸收光谱的最大吸收波长在 204 nm。精制的卵磷脂回收率为 97.04%。试验结果表明 AB-8 大孔吸附树脂能有效富集纯化卵磷脂,纯化后的卵磷脂纯度达到 83.1%,是精制前的 4 倍。本方法一步可获得高纯度的卵磷脂,与无机盐复合沉淀法纯化卵磷脂相比,其工艺简单,操作重复性好,不需要去除前期引入溶剂的影响,还大大减少了多步骤精制带来的损失,是一种经济、快捷的纯化方法。

参考文献:

- [1] 刘颖,肖静静,李硕绵,等. 蛋黄卵磷脂提取方法的研究[J]. 河北农业大学学报, 2013, 36(6):105-108.
- [2] 李涛,王天志. 卵磷脂的研究进展[J]. 中药材, 2002, 25(10):752-756.
- [3] 庞坤,韩立强,李维琳. 卵磷脂的性质及其应用[J]. 安徽农业科技, 2006, 34(9):1772-1773.
- [4] 远山. 大豆卵磷脂的应用[J]. 精细化工原料及中间体, 2007(9):23-24.
- [5] 杨闯. 卵磷脂的特性及其在食品和营养保健方面的应

- 用[J]. 食品科技, 2011, 36(7):73-79.
- [6] 丁丹华, 王文高, 陈凤香, 等. 冷析-膜分离法纯化高纯度蛋黄卵磷脂的工艺研究[J]. 农业机械, 2012(7):113-115.
- [7] KETAL S. Method for perparation of chromatographic pure PC from commercial sunflower [J]. Lecithin Liv Khim, 1986, 19(4):528-533.
- [8] 朱骤海, 何俊婷. 配位吸附柱层析法对卵磷脂分离纯化的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11):395-396.
- [9] ZHANG Y, JIAO J J, LIU C M, et al. Isolating and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by acroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography [J]. Food Chem, 2008, 107:1326-1336.
- [10] 刘安军, 刘慧慧, 郭丹青, 等. 大孔吸附树脂分离纯化枸杞叶总黄酮的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 28(3):292-296.
- [11] 王振宇, 刘春平. 大孔树脂 AB-8 对苹果多酚的分离纯化[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(4):21-24.
- [12] 李召妍. 高纯大豆卵磷脂的制备工艺研究[D]. 山东青岛:中国石油大学, 2010.
- [13] 闫磊, 何再安, 刘焱文. 大孔树脂吸附在黄酮及皂苷类成分分离纯化中的应用[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12):2582-2587.
- [14] 张素华, 王正云. 大孔树脂纯化芦笋黄酮工艺的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(2):182-186.
- [15] 吴昊, 宗志敏, 石金龙. S-8 大孔吸附树脂分离纯化银杏黄酮的工艺研究[J]. 食品科技, 2013, 38(4):224-227.
- [16] 韩山山, 张康逸, 黄健花, 等. 树脂柱色谱纯化甘油磷脂酰胆碱[J]. 中国油脂, 2012, 37(3):47-51.
- [17] 赵思邈, 任悦, 石晨, 等. 不同禽蛋黄中卵磷脂的提取及其水解液成分的鉴定研究[J]. 首都医科大学学报, 2017, 38(1):113-115.
- [18] 陈卫涛, 张德权, 张柏林, 等. 紫外分光光度法测定保健品中卵磷脂的含量[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(3):189-191.
- [19] 刘军伟, 李啸晨, 候婴惠, 等. 大孔树脂纯化生姜多酚的研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(17):35-39.
- [20] 屠鹏飞, 贾存勤, 张洪全. 大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中的应用[J]. 世界科学技术:中医药现代化, 2004, 6(3):22-28.

· 广告 ·

粮油市场报
/ 刊号: CN41-0072 / 邮发代号: 35-17

《粮油市场报》自1985年创刊以来, 密切关注中国粮食流通体制改革进程, 及时反映世界粮食经济格局及变化, 全方位反映中国粮食生产、流通、加工、消费图景, 服务于国家粮食战略, 传递政府主张, 为企业解惑, 为农民引路, 为消费导航, 以其不可替代的权威性、公信力和专业度, 确立了粮油媒体领导品牌。

《粮油市场报》将进一步深耕粮油领域, 拓展并洞察粮油上下游市场, 以更专业更独立的采编理念, 以更权威更独到的新闻品质, 致力服务中国涉农、涉农领域的主流人群, 全方位反映中国粮油市场运行图景。

欢迎订阅《粮油市场报》

粮报微信 粮报微博

发行热线: 0371-68107972 68107966
新闻热线: 0371-86029111 新媒体热线: 0371-68107650
网址: www.grainnews.com.cn(中国粮油网)
微博: http://weibo.com/lyscb