

蛋黄来源磷脂酰乙醇胺的富集、纯化及脂肪酸组成研究

唐顺之^{1,2}, 江程^{1,2}, 关伟键^{1,2}, 王国财^{1,2}, 牟肖男^{1,2},
李继荣^{1,2}, 吴伟锋^{1,2}, 许文东^{1,2}

(1. 中药提取国家工程中心, 广州 510006; 2. 白云山汉方现代药业有限公司, 广州 510240)

摘要:对蛋黄粉进行磷脂酰乙醇胺(PE)富集、分离纯化,采用单因素实验考察富集环节中丙酮-无水乙醇配比、溶剂倍量、洗脱时间、洗脱次数对富集PE含量的影响,并用正交实验进行优化;采用气相色谱分析了纯化蛋黄磷脂酰乙醇胺的脂肪酸组成。结果表明:PE富集的最优方案为溶剂丙酮-无水乙醇配比3:1、溶剂倍量2倍、洗脱时间1h、洗脱2次,富集后PE含量达到52%,富集率为70%;经硅胶柱层分离纯化后,PE纯度达99%;蛋黄磷脂酰乙醇胺骨架含有7种脂肪酸,不饱和脂肪酸含量为55.52%,其中花生四烯酸含量达16.40%。

关键词:蛋黄粉;磷脂酰乙醇胺;富集;纯化;脂肪酸组成

中图分类号:Q545;TS201.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)12-0084-04

Enrichment, purification and fatty acid composition of phosphatidyl ethanolamine from egg yolk

TANG Shunzhi^{1,2}, JIANG Cheng^{1,2}, GUAN Weijian^{1,2}, WANG Guocai^{1,2},
MOU Xiaonan^{1,2}, LI Jirong^{1,2}, WU Weifeng^{1,2}, XU Wendong^{1,2}

(1. Chinese Medicine Engineering Technique Research Center, Guangzhou 510006, China;
2. Guangzhou Hanfang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510240, China)

Abstract: The phosphatidyl ethanolamine (PE) from egg yolk powders was enriched and then separated and purified. The effects of the ratio of acetone to absolute ethanol, solvent amount, elution time and elution times on the PE content after enrichment were studied by single factor experiment, and optimized by orthogonal experiment. The fatty acid composition of purified phosphatidyl ethanolamine from egg yolk was analyzed by gas chromatography. The results showed that the optimal enrichment conditions were obtained as follows: ratio of acetone to absolute ethanol 3:1, solvent amount two fold, elution time 1 h and elution times twice. Under these conditions, the PE content reached 52%, and the enrichment rate was 70%. The PE purity reached 99% after purification by silica column chromatography. The egg yolk phosphatidyl ethanolamine skeleton contained seven kinds of fatty acids, and the content of unsaturated fatty acid was 55.52%, among which arachidonic acid content was up to 16.40%.

Key words: egg yolk powder; phosphatidyl ethanolamine; enrichment; purification; fatty acid composition

收稿日期:2018-03-26;修回日期:2018-04-25

基金项目:广东省药用脂质重点实验室(2016B030302003)

作者简介:唐顺之(1983),男,工程师,主要从事药用油脂原料及辅料的研究开发及产业化工作(E-mail)tangsz@byshf.com。

通信作者:许文东,教授级高级工程师(E-mail)xwd21@163.com。

天然磷脂主要由磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酸(PA)、鞘磷脂(SM)等组成。天然磷脂作为重要的天然表面活性剂,具有乳化、分散、润湿、速溶、脱模等表面活性,可以广泛用于化工、食品、医药等行业^[1-3]。目前,动植物来源的PC以及部分植物

来源的 PE 以其在磷脂中的含量较高而被大量研究、利用,但对于其他含量少的成分如 PI、PS、PA、SM 以及蛋黄来源的 PE 等,因研究较少还不能很好地开发利用。PE 是蛋黄磷脂中含量仅次于 PC 的一类磷脂,与 PC 相比,PE 含有更多的多不饱和脂肪酸,其中 PE 含有的二十碳四烯酸(C20:4)约为 PC 的 5 倍,二十二碳六烯酸(C22:6)约为 PC 的 2.5 倍,PE 的动脉粥样硬化指数(AI)和血检形成指数(TI)低于 PC^[4-5]。目前市面上的磷脂类保健品中,PE/PC 的范围普遍为 20.1%~30%,在这类保健品中脑磷脂具有改善智力、促进大脑发育的功效,提高 PE 的含量保健增效显著^[6-7],从这点出发高蛋黄磷脂酰乙醇胺含量的磷脂(以 PE/PC 计算含量)具有直接开发成营养价值更高的保健系列产品的潜力。乙醇胺具有极性更大的头部结构,能够形成更稳定的疏水或者亲水微囊,可以满足具有特殊载药功能的脂质体、脂微球等的开发需求,因此开发高含量、高纯度的 PE 具有重要意义。

合成 PE 以及大豆来源的 PE 的提取已经有报道,合成 PE 以粉末磷脂或 PC 为原料经脂肪酶 D 水解及酯交换而得到,其脂肪酸组成难以与天然 PE 保持一致,大豆来源的 PE 中油酸、亚油酸等不饱和脂肪酸含量过高(>70%)导致稳定性不如动物来源的 PE^[8-9];蛋黄来源的磷脂 PE 含量 15% 左右,70% 为 PC,商业上使用的蛋黄磷脂产品多为以 PC 为主要成分的卵磷脂或者高纯磷脂酰胆碱,PE 往往在 PC 生产的过程中作为杂质进行控制^[10]。本文以各种磷脂在不同溶剂中溶解度的差异^[11]及代玲莉等^[12]发现的混合溶剂提取实验作为理论依据,利用丙酮-无水乙醇复合溶剂洗脱的方法对蛋黄粉中的 PE 进行富集,并参照磷脂的硅胶柱层析分离纯化方法^[11],对富集后的 PE 进行纯化以及脂肪酸组成分析,为蛋黄来源高含量 PE 的开发利用提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

蛋黄粉(珠海物美科技有限公司);蛋黄磷脂酰乙醇胺标准品(25 mg,98%);无水乙醇、丙酮、三氯甲烷;色谱纯甲醇和乙腈(Sigma 公司);氧化铝;工业硅胶。

IKA-HB10 旋转蒸发仪;Waters 2535 高效液相色谱仪(美国沃特斯公司);AvanceII 400 MHz 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司);IRPrestige-21 傅里叶红外分光光度计;DF-101s 集热式恒温加热磁力搅拌器;GC7890N 气相色谱仪(美国安捷

伦公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋黄粉前处理

蛋黄粉经 3~5 倍量醇提,收集滤液;加入 2 倍量中性氧化铝,在 20~30℃ 下搅拌吸附 2 h,过滤,固体经丙酮脱油后得到吸附 PE 的氧化铝。

1.2.2 洗脱富集

取上述氧化铝吸附物 100 g,加入一定倍量丙酮-无水乙醇搅拌洗脱后,过滤,重复几次洗脱操作,过滤,加入无水乙醇搅拌解吸附 PE,滤液浓缩得到富含 PE 的提取物。富集率=(富集后醇提物含固量×PE 含量)/(富集前醇提物含固量×PE 含量)×100%。

1.2.3 分离纯化

取上述 PE 提取物 2 g,经少量三氯甲烷溶解后进行硅胶柱分离,湿法上样并以三氯甲烷-甲醇(3:1)洗脱,以市售 PE 为对照品薄层色谱监控洗脱情况,收集目标组分,浓缩得到 PE 样品。

1.2.4 PE 含量分析

采用液相色谱分析 PE 含量。LiChrosphere 100 DIOL 色谱柱(250 mm×4 mm,5μm);流动相 A 为正庚烷-异丙醇(65:114),流动相 B 为正庚烷-异丙醇-水(31:62:12),等度洗脱,流速 1.0 mL/min。柱温 40℃,进样量 10 μL(2 mg/mL),蒸发光散射检测器,蒸发管温度 55℃,氮气流量 2.0 L/min。

1.2.5 脂肪酸组成分析

取上述纯化 PE 样品 0.1 g,置 50 mL 锥形瓶中,加 0.5 mol/L 氢氧化钠甲醇溶液 2 mL,在 65℃ 水浴中加热回流 30 min,放冷,加 15% 三氟化硼甲醇溶液 2 mL,在 65℃ 水浴中加热回流 30 min,放冷,加庚烷 4 mL,继续在 65℃ 水浴中加热回流 5 min 后,放冷,加饱和氯化钠溶液 10 mL,摇匀,静置分层,取上层液,用水洗涤 3 次,每次 2 mL,上层液经无水硫酸钠干燥后,用微孔滤膜过滤,备用。

采用气相色谱分析脂肪酸组成。色谱条件:BPX-70 毛细管脂肪酸分析柱(30.0 m×250 μm,0.25 μm);柱温 190℃;进样口温度 210℃;氢火焰离子化检测器温度 300℃;氮气流速 1.2 mL/min;氢气流速 30 mL/min;空气流速 400 mL/min。

2 结果与分析

2.1 洗脱富集单因素实验

2.1.1 丙酮-无水乙醇配比对富集后 PE 含量影响

在丙酮-无水乙醇加入量 2 倍、洗脱时间 1 h、洗脱 2 次的条件下,考察丙酮-无水乙醇配比对富

集后 PE 含量的影响,结果见图 1。

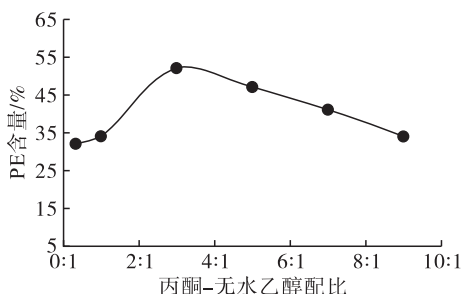


图 1 丙酮 - 无水乙醇对比对富集后 PE 含量影响

由图 1 可看出,随着丙酮 - 无水乙醇配比的增加,富集后 PE 含量呈现出先增加后减少的趋势,丙酮 - 无水乙醇配比为 3:1 时,PE 含量达到最大。因此,丙酮 - 无水乙醇配比选择 3:1。

2.1.2 溶剂倍量对富集后 PE 含量影响

在丙酮 - 无水乙醇配比 3:1、洗脱时间 1 h、洗脱 2 次的条件下,考察溶剂倍量对富集后 PE 含量的影响,结果见图 2。

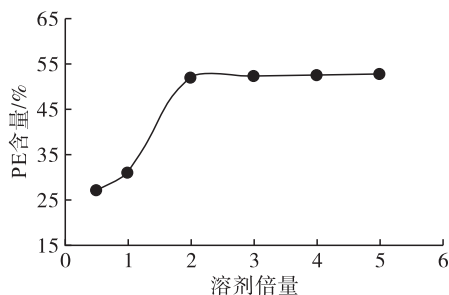


图 2 溶剂倍量对富集后 PE 含量影响

由图 2 可看出,随着溶剂倍量的增加,富集后 PE 含量呈现显著增加趋势,到了 2 倍量后趋于平缓。从效益考虑,溶剂倍量选择 2 倍。

2.1.3 洗脱时间对富集后 PE 含量影响

在丙酮 - 无水乙醇配比 3:1、溶剂倍量 2 倍、洗脱 2 次的条件下,考察洗脱时间对富集后 PE 含量的影响,结果见图 3。

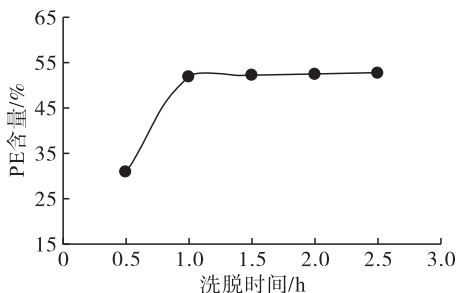


图 3 洗脱时间对富集后 PE 含量影响

由图 3 可看出,随洗脱时间的延长,富集后 PE 含量呈现显著增加趋势,洗脱时间 1 h 后 PE 含量趋于平缓。从效率出发,洗脱时间选择 1 h。

2.1.4 洗脱次数对富集后 PE 含量影响

在丙酮 - 无水乙醇配比 3:1、溶剂倍量 2 倍、洗脱时间 1 h 的条件下,考察洗脱次数对富集后 PE 含量的影响,结果见图 4。

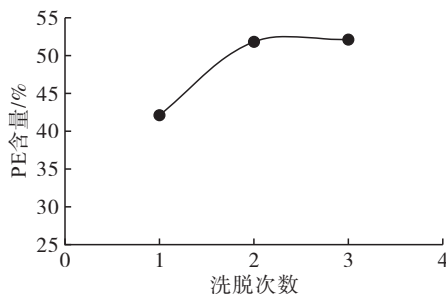


图 4 洗脱次数对富集后 PE 含量影响

由图 4 可看出,随着洗脱次数的增加,富集后 PE 含量增加,在洗脱次数 2 次时 PE 含量显著增加,之后 PE 含量基本没有变化。故选择洗脱次数 2 次。

2.2 正交实验

为考察多因素综合效应,以丙酮 - 无水乙醇配比 (A)、溶剂倍量 (B)、洗脱时间 (C)、洗脱次数 (D) 为因素,以富集后 PE 含量为指标,进行正交实验。正交实验因素与水平见表 1,正交实验设计与结果见表 2。

表 1 正交实验因素与水平

水平	A	B	C/h	D
1	3:1	1	1	1
2	5:1	2	2	2
3	7:1	3	3	3

表 2 正交实验设计与结果

实验号	A	B	C	D	PE 含量/%
1	1	1	1	1	26.90
2	1	2	2	2	52.60
3	1	3	3	3	53.10
4	2	1	2	3	26.40
5	2	2	3	1	45.80
6	2	3	1	2	48.50
7	3	1	3	2	22.80
8	3	2	1	3	41.70
9	3	3	2	1	42.30
k_1	44.20	25.37	39.03	38.33	
k_2	40.23	46.70	40.43	41.30	
k_3	35.60	47.97	40.57	40.40	
R	8.60	22.60	1.54	2.97	

由表 2 可以看出,影响富集后 PE 含量的主次顺序为 $B > A > D > C$,即溶剂倍量 > 丙酮 - 无水乙醇配比 > 洗脱次数 > 洗脱时间,最佳因素水平组合为 $A_1 B_3 C_3 D_2$,即丙酮 - 无水乙醇配比 3:1、溶剂倍量 3 倍、洗脱时间 3 h、洗脱次数 2 次,但是考虑到 2 倍溶剂量与 3 倍溶剂量、洗脱时间 1 h 与 3 h 的极差非常小,与单因素曲线趋势相符,且从效率与经济效益

出发,选取丙酮-无水乙醇配比3:1、溶剂倍量2倍、洗脱时间1 h、洗脱次数2次为最优方案。在该方案下,富集后PE含量达到52% (高于文献[13]报道的45℃下大豆粉末中富集的PE含量48.42%),富集率为70%。

2.3 PE的分离纯化

在最优条件下洗脱富集、收集组分,分离纯化后得到PE纯化样品0.78 g,以1.2.4液相条件进样检测,PE纯度检测结果如图5所示。

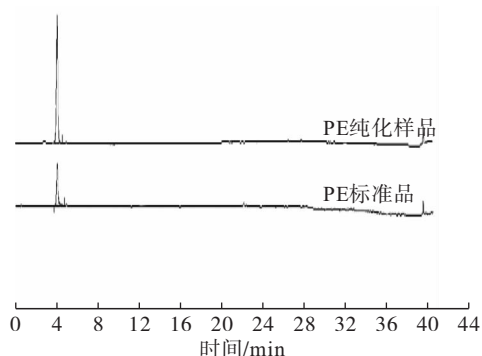


图5 PE纯化样品(12 mg/mL)与标准品(2 mg/mL)液相色谱图

从图5可以看出,PE纯化样品与PE标准品具有一致的保留时间,按照面积归一化法计算纯度达到99%,高于PE标准品(98%)。

2.4 蛋黄磷脂酰乙醇胺脂肪酸组成

蛋黄磷脂酰乙醇胺经甲酯化处理,采用气相色谱对其甘油酯骨架上的脂肪酸组成进行分析,通过标准品对照和数据库检索对其脂肪酸组成进行定性分析,并按照面积归一化法进行定量分析,结果见表3。

表3 蛋黄磷脂酰乙醇胺脂肪酸组成及含量

脂肪酸	含量/%
棕榈酸	14.53
硬脂酸	29.94
油酸	17.03
亚油酸	9.09
花生四烯酸	16.40
二十碳五烯酸	7.56
二十二碳六烯酸	5.44

由表3可知,从蛋黄粉中分离纯化得到的磷脂酰乙醇胺中共分析鉴定出7种脂肪酸,主要包括硬脂酸、油酸、花生四烯酸、棕榈酸、亚油酸等7种组分。不饱和脂肪酸含量为55.52%,其中花生四烯酸含量达到16.40%。与文献[14]报道相比,其具有促进婴幼儿大脑与神经发育功能的花生四烯酸含量高近10%,揭示了PE作为脑磷脂具有神经营养功效的物质基础。

3 结论

蛋黄粉经醇提和氧化铝吸附后,上清液为高含PC醇溶液,可以进一步作为PC的生产原料,开发成市售的卵磷脂80、98等产品,固体部分为吸附PE的氧化铝,经精制富集后可以得到富含PE的样品。本研究通过对富集步骤关键因素的分析,得出最优方案为丙酮-无水乙醇配比3:1、溶剂倍量2倍、洗脱时间1 h、洗脱2次,洗脱后PE含量显著提高到52%,富集率为70%,实现了蛋黄粉中低含量PE的有效富集,对于高含量PE产品的开发具有重要意义。采用硅胶柱层析法对富集的磷脂酰乙醇胺进行分离纯化,获得了高纯度的蛋黄磷脂酰乙醇胺,纯度为99%。蛋黄来源的磷脂酰乙醇胺骨架上主要含有7种脂肪酸,不饱和脂肪酸含量为55.52%,其中花生四烯酸含量达16.40%。

参考文献:

- [1] 凌关庭. 大豆磷脂、蛋黄磷脂及其系列化精制品[J]. 中国食品添加剂, 1999(3):67-77.
- [2] 刘小杰, 袁长贵. 大豆磷脂的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2001(4):15-19.
- [3] 陈闯, 王思玲, 苏德森. 磷脂药物制剂研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(2):98-101.
- [4] 曾诚, 黄伟, 何承辉, 等. 复合磷脂脂质体的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42(1):91-95.
- [5] 丁冬梅, 张振海, 蒋艳荣, 等. 中药磷脂复合物的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(13):2046-2050.
- [6] 杨群志, 何正善. 含大豆脑磷脂饮品: CN1134256A [P]. 1996-10-30.
- [7] 王丹侠, 崔世勇, 王胤, 等. 卵磷脂类保健食品中卵磷脂主要组分的高效液相色谱法测定[J]. 上海预防医学, 2003, 15(9):442-444.
- [8] 陈光友. 磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰甘油的全合成研究[D]. 西安:西北大学, 2006.
- [9] 夏文品. 辣椒素酯和磷脂酰乙醇胺的合成研究[D]. 上海:华东师范大学, 2010.
- [10] 朱玲娇. 禽蛋磷脂组成及其结构特点分析研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2013.
- [11] 蒋德付. 硅胶柱层析分离天然及合成磷脂酰乙醇胺的研究[D]. 西安:西北大学, 2009.
- [12] 代玲莉, 陈福明. 混合溶剂提取法从粉末磷脂中分离磷脂酰胆碱的研究[J]. 中国油脂, 2002, 27(5):74-76.
- [13] 王强, 史苏佳, 韩海霞, 等. 大豆磷脂酰乙醇胺的分离及纯化[J]. 中国油脂, 2014, 39(6):72-77.
- [14] 徐明明, 吕晶, 方欣欣, 等. 蛋黄卵磷脂和蛋黄磷脂酰胆碱的组成与结构分析[J]. 中国药师, 2014, 17(10):1669-1672.