

# 冷冻结晶法纯化制备高纯度磷脂酰乙醇胺

沈晓华, 曹 栋

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**为解决工厂低磷脂酰胆碱(PC)含量大豆粉末磷脂的积压问题,以及获得高纯度的磷脂酰乙醇胺(PE),以用碱性乙醇从低PC含量大豆粉末磷脂中提取的粗PE产品为原料,通过冷冻结晶法纯化制备高纯度PE。在单因素实验的基础上,以PE含量为指标,通过响应面实验对冷冻结晶纯化条件进行了优化。结果表明,PE的最佳冷冻结晶纯化条件为:料液比1:40,冷冻时间21.5 h,冷冻温度 $-25^{\circ}\text{C}$ ,乙醇体积分数94%,乙醇碱浓度为94%乙醇与25%氨水体积比100:8。在最佳条件下,产品PE含量为76.56%,PE回收率为81.25%。因此,冷冻结晶法纯化工艺可用于制备高纯度PE。

**关键词:**大豆磷脂;磷脂酰乙醇胺;冷冻结晶法

中图分类号:TS229;O62

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)12-0141-05

## Preparation of high-purity phosphatidylethanolamine by freezing crystallization

SHEN Xiaohua, CAO Dong

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** To solve the backlog problem of soybean phospholipids with low phosphatidylcholine(PC) content in factories and to obtain high-purity phosphatidylethanolamine (PE), the crude PE product extracted from soybean phospholipids with low PC content by alkaline ethanol was used as the raw material to prepare high-purity PE by freezing crystallization. Based on the single factor experiment, with PE content as the indicator, the optimal freezing crystallization conditions of PE were determined by response surface methodology as follows: solid liquid ratio 1:40, freezing time 21.5 h, freezing temperature  $-25^{\circ}\text{C}$ , volume fraction of ethanol 94%, ethanol alkali concentration (volume ratio of 94% ethanol to 25% ammonia water) 100:8. Under these conditions, the content and recovery rate of PE were 76.56% and 81.25%, respectively. Therefore, the freezing crystallization process can be used to prepare high-purity PE.

**Key words:** soybean phospholipids; phosphatidylethanolamine; freezing crystallization

磷脂酰乙醇胺(PE)又称脑磷脂,主要由大豆粉末磷脂分离得到,具有非常重要的生理功能。例如:PE与EPA、DHA结合后,具有抗氧化功能<sup>[1-2]</sup>,可提高EPA和DHA的氧化稳定性;PE与蛋白质组成凝血激酶,存在于血小板内,能促使血液凝固<sup>[3]</sup>;PE还能维持线粒体的形态<sup>[4]</sup>,调控胰岛素的信号传导<sup>[5]</sup>。另外,PE具有改善智力、促进大脑发育、改善神经运动障碍综合征的功能<sup>[6]</sup>。PE在医药领域应用越来越广,高纯度PE可用于制备pH敏感脂质体<sup>[7]</sup>,也可作为仿生涂层,包覆于生物医用材料植

人物表面<sup>[8]</sup>。近年来,对PE特别是高纯度PE的市场需求急剧扩大,工厂提取磷脂酰胆碱(PC)后的副产物中仍含有较高含量PE。因此,以低PC含量大豆粉末磷脂为原料,研究一种适合工业化生产高纯度PE的方法,既能解决工厂中低PC含量大豆粉末磷脂的积压问题,又具有很好的应用价值。

目前,常用的精制PE的方法有柱层析法<sup>[9-10]</sup>、超临界流体萃取法<sup>[11]</sup>、金属离子沉淀法<sup>[12]</sup>和化学合成法<sup>[13]</sup>等,但均存在生产成本低、操作复杂的问题。而PE通过乙醇提取后再经冷冻结晶法纯化,可除去游离糖及脂糖等糖类物质,以及三酰基甘油等非极性脂质和极性较小的磷脂酰肌醇(PI)<sup>[14]</sup>,达到分离纯化的目的,产品中PE含量可以达到70%左右<sup>[15]</sup>。本研究以低PC含量大豆粉末磷脂提取的粗PE产品为原料,在前期研究的基础上<sup>[15]</sup>,进一步拓宽因素水平范围,在

收稿日期:2021-09-07;修回日期:2022-07-19

作者简介:沈晓华(1997),女,硕士研究生,研究方向为大豆磷脂纯化(E-mail)1970165810@qq.com。

通信作者:曹 栋,教授(E-mail)caodong@jiangnan.edu.cn。

较高碱浓度的乙醇介质中进行冷冻结晶纯化,通过单因素实验和响应面优化实验确定最佳冷冻结晶纯化条件,以提高 PE 含量和 PE 回收率,为工业化生产高纯度 PE 提供参考。

## 1 材料与方

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

大豆粉末磷脂(PE 22.57%, PC 4.03%)、PE 标准品(纯度 87%),江苏曼氏生物科技股份有限公司;无水乙醇、25%氨水、冰醋酸均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;甲醇、正己烷、异丙醇为色谱纯, Thermo Fisher 公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

AB104-N 型电子天平,梅特勒-托利多公司; OES-60M 型电动搅拌器,常州崢嵘仪器有限公司; RE-52AA 型旋转蒸发器,上海亚荣仪器有限公司; DZF-6050 型真空干燥箱,无锡久平仪器有限公司; BCD-226SK 型冰箱,青岛海尔股份有限公司; Agilent 1100 高效液相色谱(HPLC),美国安捷伦公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 粗 PE 制备

准确称取一定量大豆粉末磷脂于烧杯中,按料液比 1:20 加入碱性乙醇(无水乙醇与 25%氨水体积比 100:5),在 40℃下搅拌提取 50 min,提取 2 次。提取后过滤,滤液旋蒸浓缩,然后在 50℃下真空干燥,即得粗 PE 产品(PE 纯度 55.59%)。

#### 1.2.2 PE 的冷冻结晶纯化

将粗 PE 产品以一定的料液比溶解于一定碱浓度以及一定体积分数的乙醇溶液中,然后放置在一定温度的冰箱中冷冻一定时间。取出后立刻抽滤,滤液旋蒸浓缩后真空干燥,即得到 PE 产品。

#### 1.2.3 HPLC 测定磷脂组分及含量

##### (1) HPLC 条件

Si-60 色谱柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm),柱温 40℃;载气流速 2 L/min;蒸发光检测器;漂移管温度 72℃;进样量 10 μL;流动相 A 为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(体积比 85:15:0.45:0.05),流动相 B 为正己烷-异丙醇-流动相 A(体积比 20:48:32),梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相体积分数/%		流速/(mL/min)
	A	B	
0	5	95	1
10	5	95	1
20	30	70	1
35	95	5	1
36	10	90	1
40	10	90	1

(2) 标准溶液的配制及标准曲线回归方程的建立

将 PE 标准品用氯仿-甲醇(体积比 2:1)溶解、稀释和定容至质量浓度为 20 mg/mL 的 PE 标准母液。分别吸取 0.2、0.5、0.8、1.2、1.5、2.0 mL PE 标准母液于 10 mL 容量瓶中,用氯仿-甲醇(体积比 2:1)定容,配成质量浓度分别为 0.4、1.0、1.6、2.4、3.0、4.0 mg/mL 的 PE 标准溶液。将不同质量浓度的 PE 标准溶液进行 HPLC 检测,以 PE 峰面积的对数  $\log(S)(y)$  为纵坐标和 PE 标准溶液质量浓度的对数  $\log(c)(x)$  为横坐标进行线性拟合,得到 PE 的标准曲线回归方程: $y=0.5914x+2.2019, R^2=0.9968$ 。

#### (3) 样品中 PE 含量的测定

准确称取样品 20.0 mg,用氯仿-甲醇(体积比 2:1)溶解、定容至 10 mL,样品液摇匀后用 0.45 μm 滤膜过滤至进样瓶,然后进行 HPLC 检测。根据标准品的保留时间对样品中 PE 组分定性。根据标准曲线回归方程计算样品中 PE 含量,并计算 PE 回收率。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

#### 2.1.1 料液比对 PE 含量及回收率的影响

在冷冻温度 -20℃、冷冻时间 16 h、乙醇碱浓度为无水乙醇与 25%氨水体积比 100:5 的条件下,考察料液比对 PE 含量及回收率的影响,结果如图 1 所示。

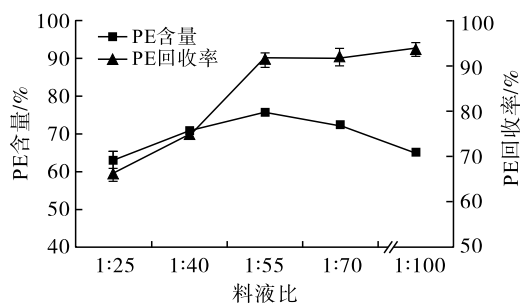


图 1 料液比对 PE 含量及回收率的影响

由图 1 可见,随着料液比的增加,PE 含量先上升后下降,PE 回收率不断上升。这可能是因为,在一定温度下,PE、磷脂酰肌醇(PI)等组分在溶剂中的饱和浓度是固定的,在实验所用料液比范围内,PI 等其他组分的浓度差(初始浓度-低温下饱和浓度)比 PE 的浓度差大,因此析出的 PI 等杂质组分比 PE 多,PE 含量提高。在料液比为 1:55 时,析出的 PI 与析出的 PE 之间差值达到最大,所以此时 PE 含量最高。

在一定温度下,PE 在溶剂中的饱和浓度是固定的,料液比越大,溶剂量越大,冷冻时溶解的 PE 越

多,相应析出的 PE 越少,因此 PE 回收率随着料液比的增加而增加。综合考虑 PE 含量和回收率,最适料液比为 1:55。

### 2.1.2 冷冻时间对 PE 含量及回收率的影响

在料液比 1:40、冷冻温度  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、乙醇碱浓度为无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:5 条件下,考察冷冻时间对 PE 含量及回收率的影响,结果如图 2 所示。

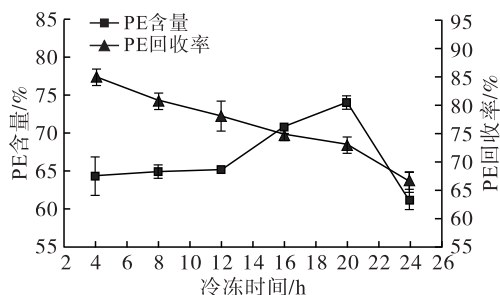


图2 冷冻时间对 PE 含量及回收率的影响

由图 2 可见,随着冷冻时间的延长,PE 含量先增加后下降,PE 回收率不断下降。这可能是因为粗 PE 产品中含有较多 PI 杂质,冷冻时 PI 的结晶沉淀速度大于 PE,因此 PE 含量不断增加;20 h 后 PI 达到沉淀平衡,而 PE 继续沉淀析出,因此 PE 含量又下降。随着冷冻时间延长,PE 呈不断结晶析出的趋势,因此 PE 回收率不断下降。综合考虑 PE 含量和回收率,最适冷冻时间为 20 h。

### 2.1.3 冷冻温度对 PE 含量及回收率的影响

在料液比 1:40、冷冻时间 16 h、乙醇碱浓度为无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:5 条件下,考察冷冻温度对 PE 含量及回收率的影响,结果如图 3 所示。

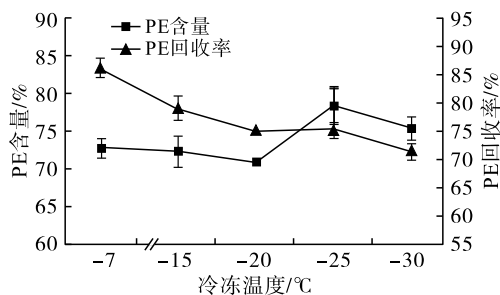


图3 冷冻温度对 PE 含量及回收率的影响

由图 3 可见,在冷冻温度  $-7\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  范围内,PE 含量变化不大,这可能是因为在此温度范围内,PE 结晶沉淀的速度与 PI 等杂质组分结晶沉淀的速度相当。当冷冻温度为  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,PI 等杂质结晶沉淀速度大于 PE 的且 PI 结晶沉淀量达到最大,故此温度下 PE 含量最高。继续降低冷冻温度,PE 结晶析出量增大,因此 PE 含量又下降。冷冻温度降低,PE 在碱性乙醇溶液中溶解度不断降低,因此回收率

不断下降。综合考虑 PE 含量和回收率,最适冷冻温度为  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.1.4 乙醇体积分数对 PE 含量及回收率的影响

在料液比 1:40、冷冻温度  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、冷冻时间 16 h、乙醇碱浓度为不同体积分数乙醇与 25% 氨水体积比 100:5 的条件下,考察乙醇体积分数对 PE 含量及回收率的影响,结果如图 4 所示。

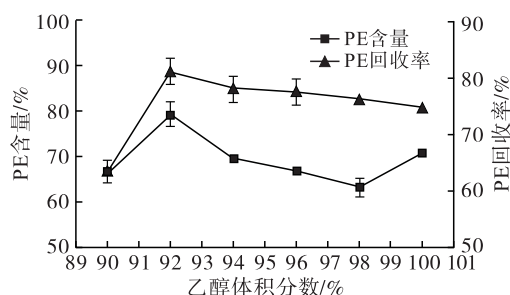


图4 乙醇体积分数对 PE 含量及回收率的影响

由图 4 可见,随着乙醇体积分数的增加,PE 含量先上升后下降再上升,PE 回收率则先上升后下降。研究表明,一方面水会与磷脂形成胶体结晶析出,另一方面水可以提高乙醇溶液对 PE 的选择性,这两种作用同时存在<sup>[16]</sup>。因此,随着含水量的减少,这两种作用同时降低,在不同阶段降低的幅度不同。当乙醇体积分数低于 92% 时,前一种起主要作用,因此含水量减少会导致磷脂结晶析出减少,PE 含量和回收率都上升;当乙醇体积分数在 92% ~ 98% 时,后一种起主要作用,因此含水量减少会导致 PE 在醇溶液中溶解度降低,PE 含量与回收率下降。无水乙醇体系中,磷脂不会与水形成胶体,因此 PE 含量上升。综合考虑 PE 含量和回收率,最适乙醇体积分数为 92%。

### 2.1.5 乙醇碱浓度对 PE 含量及回收率的影响

在料液比 1:40、冷冻温度  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、冷冻时间 16 h、乙醇体积分数 100% 的条件下,考察乙醇碱浓度对 PE 含量及回收率的影响,结果如图 5 所示。

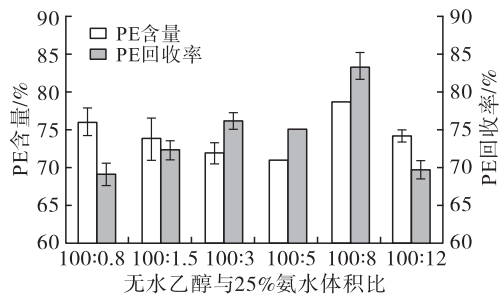


图5 乙醇碱浓度对 PE 含量及回收率的影响

由图 5 可见:当乙醇碱浓度为无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:0.8 ~ 100:5 时,溶液 pH 增加,PE 和 PI 在乙醇相中的溶解度均增大,导致 PE 产品中杂

质含量增多,因此 PE 含量略有下降;PE 回收率在乙醇碱浓度为无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:0.8 ~ 100:3 时不断增加,在乙醇碱浓度为无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:3 ~ 100:5 时略有下降。当乙醇碱浓度为无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:8 时,PI 已达到溶解平衡,而 PE 溶解度继续增加,因此 PE 含量和回收率都快速上升;在乙醇碱浓度为无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:12 时,由于加入氨水过多,导致体系含水量过多,从而导致 PE、PI 等磷脂与水形成胶体析出,因此 PE 含量和回收率又下降。综合考虑 PE 含量和回收率,最适乙醇碱浓度为无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:8。

## 2.2 响应面优化实验

根据单因素实验的结果,固定冷冻温度为  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,以 PE 含量( $Y$ )为指标,选择料液比( $A$ )、冷冻时间( $B$ )、乙醇体积分数( $C$ )和乙醇碱浓度(不同体积分数乙醇与 25% 氨水体积比)( $D$ )为考察因素,进行响应面实验。响应面实验因素水平如表 2 所示,响应面实验设计及结果如表 3 所示。

表 2 响应面实验因素水平

水平	料液比	冷冻时间/h	乙醇体积分数/%	乙醇碱浓度
-1	1:40	16	90	100:5
0	1:55	20	92	100:8
1	1:70	24	94	100:11

表 3 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	D	Y/%
1	-1	-1	0	0	65.46
2	1	-1	0	0	65.05
3	-1	1	0	0	69.10
4	1	1	0	0	66.59
5	0	0	-1	-1	71.72
6	0	0	1	-1	74.72
7	0	0	-1	1	70.59
8	0	0	1	1	71.47
9	-1	0	0	-1	71.16
10	1	0	0	-1	74.33
11	-1	0	0	1	74.66
12	1	0	0	1	69.08
13	0	-1	-1	0	69.69
14	0	1	-1	0	60.00
15	0	-1	1	0	60.80
16	0	1	1	0	72.33
17	-1	0	-1	0	73.47
18	1	0	-1	0	72.78
19	-1	0	1	0	76.64
20	1	0	1	0	75.10
21	0	-1	0	-1	66.80

续表 3

实验号	A	B	C	D	Y/%
22	0	1	0	-1	67.61
23	0	-1	0	1	65.06
24	0	1	0	1	64.32
25	0	0	0	0	77.33
26	0	0	0	0	75.73
27	0	0	0	0	74.52
28	0	0	0	0	75.04
29	0	0	0	0	73.39

以 PE 含量( $Y$ )为响应值,对表 3 实验数据进行回归拟合,得到回归方程: $Y = 75.20 - 0.63A + 0.59B + 1.07C - 0.93D - 0.53AB - 0.21AC - 2.19AD + 5.30BC - 0.39BD - 0.53CD - 0.45A^2 - 8.02B^2 - 0.96C^2 - 1.93D^2$ 。

对回归模型进行方差分析,结果如表 4 所示。

表 4 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	596.78	14	42.63	29.21	<0.000 1**
A	4.76	1	4.76	3.26	0.092 3
B	4.19	1	4.19	2.87	0.112 3
C	13.68	1	13.68	9.37	0.008 5**
D	10.38	1	10.38	7.11	0.018 4*
AB	1.10	1	1.10	0.76	0.399 4
AC	0.18	1	0.18	0.12	0.730 2
AD	19.14	1	19.14	13.12	0.002 8**
BC	112.57	1	112.57	77.15	<0.000 1**
BD	0.60	1	0.60	0.41	0.531 5
CD	1.12	1	1.12	0.77	0.395 2
A <sup>2</sup>	1.29	1	1.29	0.88	0.363 4
B <sup>2</sup>	417.41	1	417.41	286.06	<0.000 1**
C <sup>2</sup>	5.97	1	5.97	4.09	0.062 7
D <sup>2</sup>	24.24	1	24.24	16.61	0.001 1**
残差	20.43	14	1.46		
失拟项	11.85	10	1.18	0.55	0.796 7
纯误差	8.58	4	2.15		
总离差	617.20	28			

注:\*\*表示极显著( $p < 0.01$ );\*表示显著( $p < 0.05$ )

由表 4 可见,模型极显著( $p < 0.000 1$ ),失拟项不显著( $p > 0.05$ )。该回归模型的总决定系数( $R^2$ )为 0.966 9,修正决定系数( $R^2_{\text{Adj}}$ )为 0.933 8,说明该回归模型与实验数据的误差较小,拟合程度比较高,可信度高。各因素对 PE 含量的影响大小次序为  $C > D > A > B$ ,即乙醇体积分数 > 乙醇碱浓度 > 料液比 > 冷冻时间。另外, $C$ 、 $AD$ 、 $BC$ 、 $B^2$ 、 $D^2$ 的影响达到极显著水平, $D$ 的影响达到显著水平。

经 Design - Expert 软件模拟分析,得到乙醇冷冻结晶纯化 PE 工艺的最佳条件,即料液比 1:40,冷冻时间 21.59 h,乙醇体积分数 94%,乙醇碱浓度为 94% 乙醇与 25% 氨水体积比 100:8.44。最佳条件下 PE 含量的预测值为 77.04%。在实验过程中为了方便与可控,将最佳条件修正为料液比 1:40、冷冻时间 21.5 h、乙醇体积分数 94%、乙醇碱浓度为 94% 乙醇与 25% 氨水体积比 100:8,在此条件下重复 3 次实验,PE 含量的平均值为 76.56%,与预测值只差 0.48 百分点,说明用响应面模型得到的预测值与实际值吻合度高,用此模型对冷冻结晶纯化条件进行优化是合理可行的,结果是可靠的。经计算,最佳条件下 PE 回收率为 81.25%。

### 3 结论

通过单因素实验和响应面优化实验,确定了料液比、冷冻时间、冷冻温度、乙醇体积分数和乙醇碱浓度对 PE 含量及回收率均有较大影响,其中乙醇体积分数和乙醇碱浓度对 PE 含量有极显著和显著影响。PE 的最佳冷冻结晶纯化工艺条件为料液比 1:40、冷冻时间 21.5 h、冷冻温度 -25℃、乙醇体积分数 94%、乙醇碱浓度为 94% 乙醇与 25% 氨水体积比 100:8,在此条件下 PE 含量可达 76.56%,PE 回收率为 81.25%。本实验在提高 PE 含量的基础上,可明显提高 PE 的回收率,因此对工业生产具有较大意义。

### 参考文献:

[1] MURANO Y F T, TAKEUCHI H. Improvement in storage stability of fish fillets using dietary soybean phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine [J]. Food Sci Technol Int, 2009, 15(2):163-170.

[2] DOERT M, KRUGER S, MORLOCK G E, et al. Synergistic effect of lecithins for tocopherols: formation and antioxidant effect of the phosphatidylethanolamine - L - ascorbic acid condensate [J]. Eur Food Res Technol, 2017, 243(4):583-596.

[3] SMEETS E F, COMFURIUS P, BEVERS E M, et al. Contribution of different phospholipid classes to the prothrombin converting capacity of sonicated lipid vesicles [J]. Thromb Res, 1996, 81(4):419-426.

[4] JOSHI A S, THOMPSON M N, FEI N, et al. Cardiolipin and mitochondrial phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in

*Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biol Chem, 2012, 287(21):17589-17597.

[5] VAN DER VEEN J N, LINGERELL S, MCCLOSKEY N, et al. A role for phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in hepatic insulin signaling [J]. FASEB J, 2019, 33(4):5045-5057.

[6] SUPALE S, LI N, BRUN T, et al. Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta cells [J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 23(9):477-487.

[7] AKIZUKI H, KANEKO T. Characteristics of liposomes made by phosphatidylethanolamine [J/OL]. Biophys J, 2016, 110(3):71A[2021-09-07]. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.450>.

[8] LUTHRINGER B J C, KATHA U, WILLUMET R. Phosphatidylethanolamine biomimetic coating increases mesenchymal stem cell osteoblastogenesis [J]. J Mater Sci - Mater Med, 2014, 25(11):2561-2571.

[9] ZHANG W N, HE H B, FENG Y Q, et al. Separation and purification of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from soybean degummed oil residues by using solvent extraction and column chromatography [J]. J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci, 2003, 798(2):323-331.

[10] ZHANG W N, HE H B, FENG Y Q, et al. Separation of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine by using high-performance displacement chromatography [J]. J Chromatogr A, 2004, 1036(2):145-154.

[11] MONTANARI L, KING J W, LIST G R, et al. Selective extraction of phospholipid mixtures by supercritical carbon dioxide and cosolvents [J]. J Food Sci, 1996, 61(6):1230-1253.

[12] 杜阳吉,梁丽敏,刘春风,等.一种磷脂酰乙醇胺的制备方法:CN109438508A[P].2019-03-08.

[13] 曹亮.一种磷脂酰乙醇胺的制备:CN102964378A[P].2013-03-13.

[14] NIELSEN H, SHUKLA V. In situ solid phase extraction of lipids from spray-dried egg yolk by ethanol with subsequent removal of triacylglycerols by cold temperature crystallization [J]. LWT - Food Sci Technol, 2004, 37(6):613-618.

[15] 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.

[16] 李桂华,王成涛,方芳.乙醇冷冻法纯化分离大豆磷脂酰胆碱研究[J].粮食与油脂,2010(5):17-19.