

## 综合利用

## 高纯度磷脂酰肌醇的提取工艺研究

朱美金,曹栋,殷茹

(江南大学食品学院,江苏无锡214122)

**摘要:**以低磷脂酰胆碱(PC)含量大豆粉末磷脂为原料,建立以碱性乙醇为溶剂结合冷冻纯化制备高纯度磷脂酰肌醇(PI)的方法。在单因素实验的基础上利用响应面优化实验确定PI的最佳提取条件为:冷冻时间17 h,冷冻温度 $-20^{\circ}\text{C}$ ,提取温度 $40^{\circ}\text{C}$ ,料液比1:27,98%乙醇与25%氨水体积比100:4,提取时间40 min,提取次数3次。在最佳条件下,产物PI含量为82.62%,得率为14.29%。

**关键词:**大豆粉末磷脂;磷脂酰肌醇;冷冻纯化

中图分类号:TS645.9;TS229 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)02-0129-05

## Extraction of high purity phosphatidylinositol

ZHU Meijin, CAO Dong, YIN Ru

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

**Abstract:** The extraction of high purity phosphatidylinositol (PI) was studied with alkaline ethanol as solvent and freezing purification using soybean phospholipid powder with low content of phosphatidylcholine (PC) as raw material. Based on single factor experiment, the optimal extraction conditions of PI were determined by response surface methodology as follows: freezing time 17 h, freezing temperature  $-20^{\circ}\text{C}$ , extraction temperature  $40^{\circ}\text{C}$ , solid-liquid ratio 1:27, volume ratio of 98% ethanol to 25% ammonia 100:4, extraction time 40 min, extraction times three times. Under the optimal conditions, the content of PI in the product was 82.62%, and the yield was 14.29%.

**Key words:** soybean phospholipid powder; PI; freezing purification

磷脂(PL)是一类脂质,包括磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰肌醇(PI)<sup>[1]</sup>。PI由磷脂酸和肌醇构成磷脂极性基团部分有一个六碳环状肌醇。PI肌醇环上第3、4、5位羟基在相应激酶催化下磷酸化形成多种PI衍生物,这些物质可作为信号前体产生第二信使,PI也可直接参与许多细胞活动<sup>[2]</sup>,例如跨膜转运、离子转运、膜囊泡运输、细胞骨架和细胞凋亡<sup>[3]</sup>。由于PI的特殊生理功能<sup>[2,4-5]</sup>,其有望成为预防、治疗老年痴呆症的有效天然化合物。大豆磷脂含有丰富的PI,是探索PI分离和精制方法的良好材料。

目前,PI的纯化方法有溶剂萃取法<sup>[6-8]</sup>、化学

合成法、膜过滤法、超临界流体萃取法<sup>[9-10]</sup>、离子交换法、柱层析法<sup>[11]</sup>等。由于超临界流体萃取法仪器设备成本高,金属离子沉淀存在重金属离子残留问题,膜分离法导致膜清洗困难等问题,目前PI分离纯化的研究方向主要集中在溶剂萃取和柱层析上。王强<sup>[12]</sup>建立以溶剂为核心的逐级纯化技术,PI含量从37.1%提高到87.12%,但回收率较低且溶剂消耗大。姜波等<sup>[13]</sup>采用硅胶柱层析法,以氯仿-甲醇为流动相进行等度洗脱,最终纯化得到的PI产品纯度可达91.5%,但采用混合溶剂洗脱,溶剂难以回收,且溶剂消耗大。费云芸<sup>[14]</sup>通过碱性乙醇粗提取PI,再通过液-液萃取和金属离子沉淀进一步纯化,最后通过DEAE-纤维素柱层析,最终得到PI含量为96.5%产品,但过程烦琐且得率仅为0.35%。因此,开发低成本、高纯度PI制备方法,具有重要的经济意义和社会价值。

本研究针对制备高纯度PI中存在的成本高、工

收稿日期:2017-07-05;修回日期:2017-07-24

作者简介:朱美金(1991),女,在读硕士,研究方向为大豆磷脂纯化(E-mail)2516001943@qq.com。

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

艺复杂等问题,利用低 PC 含量的大豆粉末磷脂制备 PI,用正己烷-乙醇溶液双溶剂对粉末磷脂中糖类物质进行脱除,用碱性乙醇实现脱糖磷脂中 PE 和 PI 的分离,再结合冷冻分提最终得到高纯度 PI。

## 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(PI 31.29%,PE 24.09%,PA(磷酸)4.84%,PC 4.7%);江苏曼氏生物科技有限公司;PE 标准品(纯度 $\geq 98\%$ )、PI 标准品(纯度 $\geq 98\%$ ),Sigma 公司;无水乙醇、冰醋酸、25%氨水、乙酸铵:分析纯;正己烷、异丙醇:色谱纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

RE-52A 型旋转蒸发器;TG18G 凯特离心机;DF-101S 集热式磁力加热搅拌器;DKZ 系列电热恒温振荡水槽;Waters1525 液相色谱仪(蒸发光散射检测器);美国 Waters 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 PI 的制备

大豆粉末磷脂脱糖方法<sup>[15]</sup>:称取 10.00 g 大豆粉末磷脂溶于 30.0 mL 正己烷,振荡充分溶解,向三角瓶中加入体积分数 55% 乙醇溶液 60 mL,将三角瓶放置在 30℃、转速为 100 r/min 的恒温水浴振荡器中振荡 70 min,静置分液,上层磷脂重复脱糖 2 次,最后将分液得到的上层物质旋蒸即得脱糖磷脂。

PI 的制备:称取 5.00 g 脱糖磷脂于烧瓶中,按一定的料液比加入碱性乙醇溶液,加热搅拌一段时间,离心,取上清液,在一定温度下冷冻一定时间,取出立即离心(4 000 r/min,10 min),收集下层沉淀物用氮气吹干,即为 PI 产品。

#### 1.2.2 HPLC 测定磷脂组分及含量

样品溶液配制:精确称取样品 10.00 mg,溶于流动相,定容至 5.00 mL,充分摇匀后经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤至样品瓶,进行 HPLC 分析。

HPLC 条件:Si-60 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ );流速 1.00 mL/min;柱温 30℃;蒸发光散射检测器,载气流速 2 mL/min,温度 65℃;进样量 10  $\mu\text{L}$ ;流动相 A 为正己烷-异丙醇-1%乙酸(体积比 8:8:1),流动相 B 为异丙醇-正己烷-乙酸铵(0.5 mg/mL)(体积比 400:600:12),梯度洗脱程序见表 1。将 PE、PI 标准品分别单独进样,记录出峰时间,根据磷脂标准品保留时间对样品磷脂进行定性,采用外标法定量。

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	100	0	1
7	100	0	1
7.1	15	85	1
15	15	85	1
20	100	0	1
50	100	0	1

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验

#### 2.2.1 冷冻时间对 PI 含量的影响

设定冷冻温度 -15℃、料液比 1:20、无水乙醇与 25%氨水体积比 100:2、提取时间 40 min、提取温度 40℃、提取次数 3 次,考察冷冻时间对 PI 含量的影响,结果如图 1 所示。

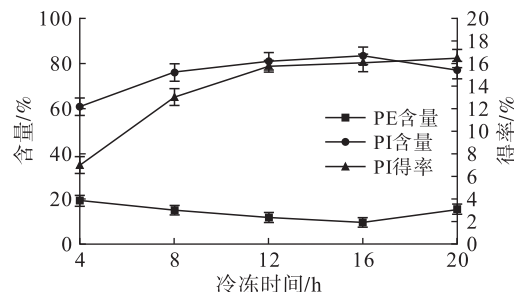


图 1 冷冻时间对 PI 含量的影响

由图 1 可见,随着冷冻时间的延长 PI 含量先上升后下降,PI 得率不断增加而 PE 含量先下降后上升。由于碱性醇溶液中 PI 先结晶析出,且结晶析出速度大于 PE,在 16 h 内达到最大值,随着冷冻时间继续延长 PE 沉淀开始增多,PI 含量随之减少。因此,选择最佳冷冻时间为 16 h。

#### 2.2.2 冷冻温度对 PI 含量的影响

设定冷冻时间 16 h、料液比 1:20、无水乙醇与 25%氨水体积比 100:2、提取时间 40 min、提取温度 40℃、提取次数 3 次,考察冷冻温度对 PI 含量的影响,结果如图 2 所示。

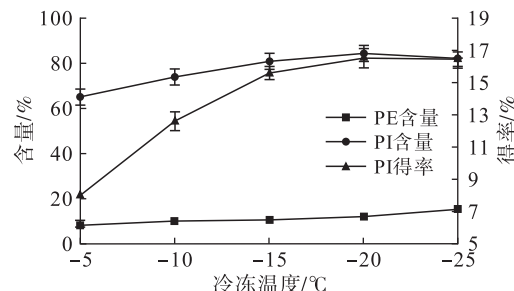


图 2 冷冻温度对 PI 含量的影响

由图 2 可见,PI 含量随冷冻温度下降呈先上升

后略下降的趋势,但升高趋势缓慢,而 PE 含量及 PI 得率随冷冻温度下降而增加,温度突然降低样品中 PI 易结晶析出,且温度越低析出量越大,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  时 PI 析出量最大,而后 PE 随着冷冻温度继续降低析出速度大于 PI,使得 PI 含量降低。综合考虑,选择最佳冷冻温度为  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.2.3 料液比对 PI 含量的影响

设定冷冻时间 16 h、冷冻温度  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:2、提取时间 40 min、提取温度  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、提取次数 3 次,考察料液比对 PI 含量的影响,结果如图 3 所示。

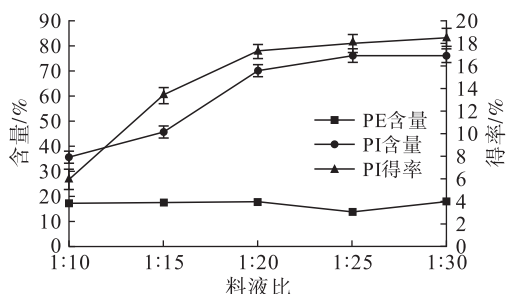


图 3 料液比对 PI 含量的影响

由图 3 可见,随着料液比的增加,PI 含量先增加后略下降,PI 得率不断增加而 PE 含量先减少后增加。随着料液比的增大,物料均匀地分散在碱性乙醇体系,PE、PI 溶解量增大,料液比在 1:25 ~ 1:30 时,PE 溶解量大于 PI,PI 含量开始降低。因此,选择最佳料液比为 1:25。

### 2.2.4 无水乙醇与 25% 氨水体积比对 PI 含量的影响

设定冷冻时间 16 h、冷冻温度  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、料液比 1:25、提取时间 40 min、提取温度  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、提取次数 3 次,考察无水乙醇与 25% 氨水体积比对 PI 含量的影响,结果如图 4 所示。

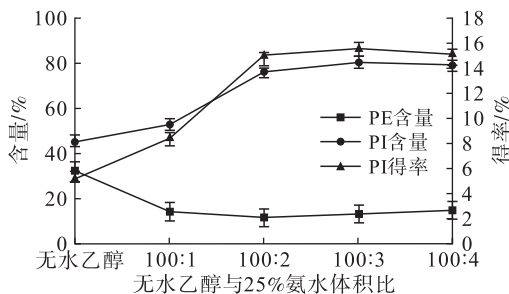


图 4 无水乙醇与 25% 氨水体积比对 PI 含量的影响

由图 4 可见,PI 含量随无水乙醇与 25% 氨水体积比的增加而增加后趋于平稳,PE 含量先减小后上升,而 PI 得率先增加后减小。与无水乙醇相比,含氨乙醇可以明显增加 PE、PI 溶解度,无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:3 时,PI 含量最大。因此,最佳

无水乙醇与 25% 氨水体积比为 100:3。

### 2.2.5 提取温度对 PI 含量的影响

设定冷冻时间 16 h、冷冻温度  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、料液比 1:25、无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:3、提取时间 40 min、提取次数 3 次,考察提取温度对 PI 含量的影响,结果如图 5 所示。

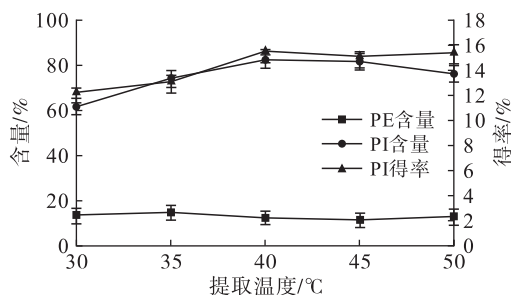


图 5 提取温度对 PI 含量的影响

由图 5 可见,随着提取温度的升高,PI 含量呈先增大后减小的趋势,在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,PI 含量及得率达到最大值,同时 PE 含量随提取温度升高变化不大,说明提取温度对 PE 的选择影响不大。因此,选择最佳提取温度为  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.2.6 提取时间对 PI 含量的影响

设定冷冻时间 16 h、冷冻温度  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、料液比 1:25、无水乙醇与 25% 氨水体积比 100:3、提取温度  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、提取次数 3 次,考察提取时间对 PI 含量的影响,结果如图 6 所示。

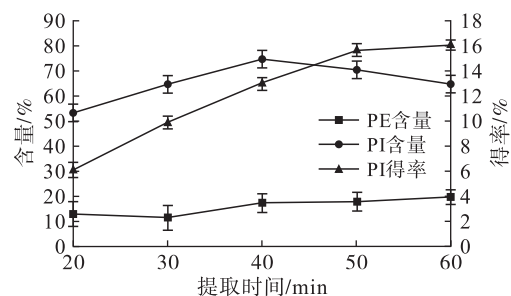


图 6 提取时间对 PI 含量的影响

由图 6 可见,PI 含量随提取时间延长呈先上升后下降趋势,PI 得率及 PE 含量总体呈上升趋势。提取时间为 40 min 时,PI 在碱性乙醇相中溶解速率达到最大值,且溶解速率大于 PE。随提取时间延长,PE 溶解率增加而 PI 含量减少。综合考虑,选择最佳提取时间为 40 min。

### 2.2.7 乙醇体积分数对 PI 含量的影响

设定冷冻时间 16 h、冷冻温度  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、料液比 1:25、乙醇与 25% 氨水体积比 100:3、提取温度  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 40 min、提取次数 3 次,考察乙醇体积分数对 PI 含量的影响,结果如图 7 所示。

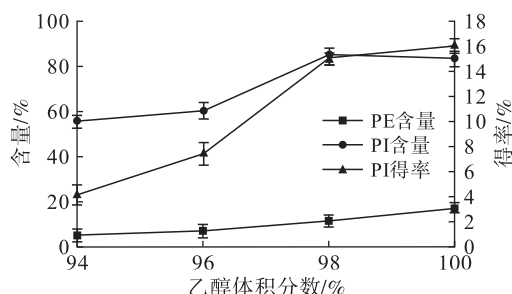


图7 乙醇体积分数对PI含量的影响

由图7可见,随着乙醇体积分数增加,PI含量呈现先上升后下降的趋势,PI得率及PE含量随着乙醇体积分数的增加而增加。由于磷脂具有一定的亲水性,体系中水对PE、PI含量及得率的影响,一方面水与磷脂形成胶体析出;一方面水的存在可提高乙醇相的极性,有利于PI等极性物质的溶解。而PE的极性小于PI,与无水乙醇相比,含水乙醇对PI的选择性大。乙醇体积分数低于94%时,磷脂与水凝结成块析出,不利于搅拌提取。综合考虑,选择最佳乙醇体积分数为98%。

### 2.2.8 提取次数对PI含量的影响

设定冷冻时间16 h、冷冻温度 $-20^{\circ}\text{C}$ 、料液比1:25、98%乙醇与25%氨水体积比100:3、提取温度 $40^{\circ}\text{C}$ 、提取时间40 min,考察提取次数对PI含量的影响,结果如图8所示。

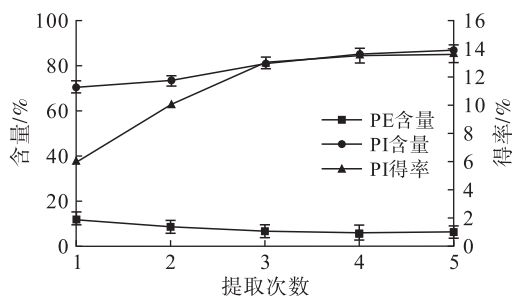


图8 提取次数对PI含量的影响

由图8可见,随着提取次数增加,PI得率和PI含量逐渐增加,而PE含量不断下降。因为提取次数的增加使得体系中PE溶解度达到极限,溶解到碱性乙醇中PE含量不断减小,PI含量增加,PI得率上升。从生产周期考虑,选择最佳提取次数为3次。

## 2.2 响应面优化实验

### 2.2.1 响应面实验结果与分析

根据Box-Behnken中心组合实验设计原理,综合单因素实验结果,在冷冻温度 $-20^{\circ}\text{C}$ 、提取温度 $40^{\circ}\text{C}$ 、提取时间40 min、提取次数3次的基础上,选取料液比(A)、冷冻时间(B)、98%乙醇与25%氨水体积比(C)对提取效果影响显著的3个因素,进行

三因素三水平的响应面分析实验。因素水平见表2,响应面实验设计及结果见表3。

表2 因素水平

水平	A	B/h	C
1	1:20	12	100:3
2	1:25	16	100:4
3	1:30	20	100:5

表3 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	PI含量/%
1	-1	-1	0	69.57
2	1	-1	0	78.68
3	-1	1	0	75.05
4	1	1	0	81.21
5	-1	0	-1	72.80
6	1	0	-1	81.11
7	-1	0	1	75.74
8	1	0	1	80.27
9	0	-1	-1	80.61
10	0	1	-1	79.89
11	0	-1	1	81.30
12	0	1	1	82.24
13	0	0	0	81.07
14	0	0	0	83.20
15	0	0	0	83.12
16	0	0	0	82.13
17	0	0	0	83.51

由表3得到二次多项回归方程:PI含量 =  $82.61 + 3.51A + 1.03B + 0.64C - 0.74AB - 0.95AC + 0.41BC - 5.00A^2 - 1.47B^2 - 0.12C^2$ 。对二次多项回归方程进行方差分析和显著性检验,结果见表4。

表4 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	236.15	9	26.24	14.75	0.0009	极显著
A	98.77	1	98.77	55.52	0.0001	极显著
B	8.47	1	8.47	4.76	0.0655	
C	3.30	1	3.30	1.86	0.2153	
AB	2.18	1	2.18	1.22	0.3054	
AC	3.57	1	3.57	2.01	0.1994	
BC	0.69	1	0.69	0.39	0.5535	
A <sup>2</sup>	105.44	1	105.44	59.26	0.0001	极显著
B <sup>2</sup>	9.15	1	9.15	5.14	0.0577	
C <sup>2</sup>	0.06	1	0.06	0.04	0.8567	
残差	12.45	7	1.78			
失拟项	8.43	3	2.81	2.80	0.1729	
纯误差	4.02	4	1.01			
总离差	248.60	16				

注: $P < 0.01$ 表示极显著; $P < 0.05$ 表示显著。

由表3可知,失拟项 $P=0.1729>0.05$ ,失拟项不显著,说明建模成功。各因素中一次项 $A$ 、二次项 $A^2$ 是极显著的。相关系数 $R^2=94.99\%$ ,校正决定系数 $R^2_{Adj}=88.55\%$ ,说明响应值的变化有94.99%源自于所选变量,即该模型与实际实验拟合良好,实验误差小,并且回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系。由 $F$ 可得各因素影响度为 $A>B>C$ ,即料液比>冷冻时间>98%乙醇与25%氨水体积比。

### 2.2.2 验证实验

按照优化后的条件,结合实际情况,得到PI最佳提取条件为冷冻时间17h、冷冻温度 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 、提取温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、料液比1:27、98%乙醇与25%氨水体积比100:4、提取时间40min、提取次数3次。在最佳条件下平行做3次验证实验,所得到碱性醇沉物中PI平均含量为82.62%,平均得率为14.29%,其中PI含量与预测值(83.70%)相差1.08个百分点。

### 2.3 产品HPLC图谱

冷冻醇沉物HPLC图谱如图9所示。

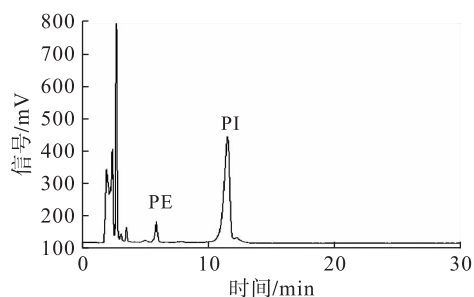


图9 冷冻醇沉物的HPLC图谱

经过冷冻处理后,PI含量由大豆粉末磷脂中的31.29%提高到82.62%,说明溶剂萃取结合冷冻纯化效果明显。

### 3 结论

由单因素实验和响应面实验结果可知,以碱性乙醇为溶剂结合冷冻法提取PI的最佳工艺条件为:冷冻时间17h,冷冻温度 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ,提取温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ ,料液比1:27,98%乙醇与25%氨水体积比100:4,提取时间40min,提取次数3次。在最佳条件下,产品PI含量由原料的31.29%提高到82.62%,得率为

14.29%。这为工业化生产高纯度PI与较高含量PI提供了两种新的方法。

### 参考文献:

- [1] WANG R, ZHANG Z S, LU Y L. Fraction and purification of phosphatidylinositol from soybean phospholipid[J]. Adv J Food Sci Technol, 2015,8(12): 919-924.
- [2] DI PAOLO G, DE CAMILLI P. Phosphoinositides in cell-regulation and membrane dynamics[J]. Nature,2006,443: 651-657.
- [3] ROBERT H M. Inositol phospholipid and cell surface receptor function [J]. Biochem Biophys Acta,1975,415: 140-147.
- [4] HAMMOND G, SCHIAVO G, IRVINE R. Immunocytochemical techniques reveal multiple, distinct cellular pools of Ptd Ins4P and Ptd Ins (4,5) P2[J]. Biochem J,2009 (422): 23-35.
- [5] BOSS W F. Phosphoinositide signaling [J]. Annu Rev Plant Biol,2012,63(6): 409-429.
- [6] 卢行芳,卢荣.天然磷脂产品的加工及应用[M].北京:化学工业出版社,2004.
- [7] 安红,宋伟明.磷脂化学及应用技术[M].北京:中国计量出版社,2006.
- [8] 田玉刚,谷克仁.大豆磷脂酰肌醇分离方法综述[J].粮食与油脂,2008(5):1-3.
- [9] SHIU-HANG H Y, MEHDI A K. Analytical scale supercritical fluid fractionation and identification of single polar lipids from deoiled soybean lecithin[J]. J Sep Sci,2008,31(8):1290-1298.
- [10] TEBERIKLERA L, KOSEOGLUB S, AKGERMANA A. Selective extraction of phosphatidylcholine from lecithin by supercritical carbon dioxide/ethanol mixture [J]. J Am Oil Chem Soc, 2001,78(2):115-119.
- [11] 柳叶.氧化铝柱层析分离纯化磷脂的工艺优化[D].杭州:浙江大学,2006.
- [12] 王强.大豆肌醇磷脂的分离及纯化[D].江苏无锡:江南大学,2014.
- [13] 姜波,胡志雄,张维农,等.柱色谱法制备高纯大豆肌醇磷脂研究[J].粮油加工,2009(7):77-80.
- [14] 费云芸.大豆磷脂中磷脂酰肌醇的纯化及其抗小鼠脂肪肝实验研究[D].济南:山东师范大学,2004.
- [15] 史苏佳,曹栋.低PC含量大豆粉末磷脂脱糖工艺研究[J].粮油食品科技,2016(2):35-38.