

从蛋黄中提取及纯化卵磷脂

许晓慧¹, 赵彬侠², 赵立新¹

(1. 山东淄博矿业集团技术中心, 山东 淄博 255120; 2. 西北大学化工系, 陕西 西安 710069)

摘 要: 本文以鸡蛋的卵黄为原料, 采用含水乙醇与乙醚提取, 通过丙酮脱水去油, 得到粗品卵磷脂; 进一步以氯仿/甲醇为洗脱液, 硅胶柱层析法分离纯化自制的粗品卵磷脂, 得到高纯度的纯白色固体卵磷脂, 由薄层色谱定性检测, 仅含一个斑点; 用薄层扫描仪定量检测纯度大于97.4%。

关键词: 蛋黄; 卵磷脂; 提取; 纯化; 层析法

Extraction and Purification of Phosphatidylcholine from Egg Yolk

XU Xiao-hui¹, ZHAO Bin-xia², ZHAO Li-xin¹

(1. The Technology Center of Zibo Mining Group Ltd., Zibo 255120, China;

2. Department of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: With egg yolk as raw material, extracted with aqueous ethanol and ether, and removing water and oil with acetone, a crude phospholipids mixture was obtained. Then the thin-layer chromatography was used with column on silicic acid to purify the phospholipids mixture. Eluted with the solvent mixture (chloroform/methanol), ultimately a highly pure white lecithin was obtained. Analyzed by thin layer chromatography, there is only one spot. With thin-layer chromatography-scanning method to assay the purity it is higher than 97.4%.

Key words: yolk; phosphatidylcholine; extraction; purification; chromatography on silicic acid

中图分类号: O545.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)08-0129-04

收稿日期: 2005-03-31

作者简介: 许晓慧(1973-), 女, 硕士, 主要从事精细化工及分离提取的研究和开发工作。

- Hypothesis Phytopathology, 1969, 59(2): 223-227.
- [4] S K Gayed, N Rosa. Levels of chlorogenic acid in tobacco cultivars, healthy and infected with thielaviopsis basicola[J]. Phytopathology, 1975, 65(10): 1049-1053.
- [5] V J Higgins, D G Smith. Separation and identification of two pterocarpanoid phytoalexins produced by red clover leaves[J]. Phytopathology, 1972, 62(2): 235-238.
- [6] Toru Shimomura, Tokuzo Hirai. The effect of Pyrimidines and 5-phenylazopyrimidines on the multiplication of tobacco mosaic virus[J]. Phytopathology, 1960, 50(5): 344-345.
- [7] C H Ruki, P Shukla. Mycoplasma like bodies associated with witches-broom of bleeding heart[J]. Phytopathology, 1973, 63(1): 88-92.
- [8] E Chaluzi, M A Stahmann. Induction of pisatin by ethylene[J]. Phytopathology, 1969, 59(12): 1972-1973.
- [9] 张桂芝, 杨世忠, 张唯一. 酚类物质及其化学修饰物抗真菌的构效关系研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 68-71.
- [10] 方中达. 植物研究方法[M]. 农业出版社, 1977.
- [11] 陈捷. 酚类物质和代谢对瓜果腐霉菌产生的细胞壁降解酶活性影响[J]. 植物病理学报, 1996, 26(2): 171-176.
- [12] B K Hwang, W D I benthal, R Hei tefuss. Age, rate of growth, carbohydrate and amino acid contents of spring barley plants in relation to their resistance to powdery mildew[J]. Physiological Plant Pathology, 1983, 22: 1-14.
- [13] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京大学出版社, 238-239.
- [14] 蒋传葵, 金承德, 吴仁龙, 等. 工具酶的活力测定[M]. 上海科学技术出版社, 1982.
- [15] Mehta A, et al. 5th international congress of plant pathology, In: Abstracts of Papers, 1988, 55: 11-116.
- [16] D F Bateman, S V Beer. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by sclerotium rolfsii[J]. Phytopathology, 1965, 55(2): 204-211.
- [17] 李大春. 水稻细菌性条斑病毒毒力差异及胞外酶活性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 1991. 19-21.
- [18] Bateman D F. Biochemical aspects of plant-parasite relationships[M]. J Friend D R Threlfall eds. Academic press, New York, 1967. 80-103.
- [19] 陈尚武. 哈密瓜采后病害生理的研究[J]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 1994.

卵磷脂是磷脂类中的一种,是天然的乳化剂和营养补品^[1]。它在动物的脑、心、骨髓以及酵母和禽蛋的卵黄中含量最为丰富。天然高纯度精制卵磷脂在食品、医药等行业应用更广泛。目前国内所用高纯度卵磷脂多从国外进口,年需求量达数吨以上,所以提取出高纯度的卵磷脂是本文的主要目的。

以鸡蛋的卵黄为原料,采用含水乙醇与乙醚提取,通过丙酮脱水去油,得到粗品卵磷脂,并对提取条件进行了优化研究,结果表明:提取时间60min,用92%乙醇,加入含水乙醇是蛋黄重的12倍,在20℃时,卵磷脂产率最高(大于10.3%),采用薄层扫描法定量检测,所得粗品卵磷脂的纯度高达68.2%。进一步以氯仿/甲醇为洗脱液,硅胶柱层析法分离纯化自制的粗品卵磷脂,最终产品在冻干机上干燥后,得到高纯度的纯白色卵磷脂的固体,收率达89.47%。由薄层色谱定性检测,仅含一个斑点;定量检测纯度大于97.4%。本文的前期提取工艺方法合理,成本较低,且制得的粗品卵磷脂纯度达到60%以上;在实验室范围内,用硅胶柱进行分离纯化,纯度和最终收率较高,操作简单,原料易得,为日后的工业化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与原料

电热恒温水浴 DZKW-4 型;强力电动搅拌器 JB90-D 型;旋转蒸发器 RE-52AA 型;真空干燥箱 DZF-6020 型;薄层色谱扫描仪 双波长日本岛津 CS-930 型;冻干机 CATALOG NO: 77530-11;无水乙醇、95%乙醇、乙醚、丙酮、氯仿、甲醇、钼酸铵、硅胶 G、羧甲基纤维素Na 以上试剂均为分析纯;卵磷标准品 美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 蛋黄卵磷脂的粗提

首先将蛋黄均质放入带塞瓶中备用,称取一定量的均质蛋黄放入洁净的带塞三角瓶中,加入一定量的乙醇,搅拌30min后,静置一定时间;然后加入1/3乙醇用量的乙醚^[2],搅拌15min后,静置相同的时间;接着过滤;滤渣进行二次提取,加入乙醇与乙醚的混合液(体积比为3:1),无需搅拌静置浸渍相同时间;第二次过滤,合并二次滤液,低温减压旋转蒸发浓缩至少量,加入一定量丙酮除杂,卵磷脂即沉淀出来,过滤,滤饼用丙酮冲洗几次,至到冲洗液无色,即得到卵磷脂粗品,在真空干燥箱中干燥后,充入氮气低温保存。

1.2.2 柱层析分离纯化卵磷脂^[3,4]

将适量的柱硅胶(60~100目)用氯仿打成浆状,湿法装柱,准确称量卵磷脂粗品(EPC)2.63g用尽可能少的氯

仿溶解后,倒入柱子内。用不同浓度梯度的氯仿/甲醇混合液连续冲洗(氯仿:甲醇分别用40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、2:3、1:2、1:3),每个浓度以100ml总量分批加入,当加入氯仿/甲醇浓度为1:1时,以后的溶液加入量根据需要变大,即洗脱液梯度变化要慢些。根据柱中色带及薄层层析不停的检测收集液的结果,分开收集各种不同成份的洗脱液,把出现单一斑点,且在同一块薄层板上与标品卵磷脂有同一 R_f 值的洗脱液收集在一起,然后旋转蒸发浓缩成膏状,再在冻干机上干燥,即得我们所期望的纯白色的卵磷脂精品,充入氮气低温保存。

1.2.3 卵磷脂的检测

利用薄层色谱为主要的定性检测手段,再利用薄层扫描仪,对所制得的卵磷脂样品进行定性和定量检测。将一定量的硅胶G与一定量的浓度为0.4%~0.5%的CMC-Na溶液调匀制薄层板,根据不同的要求在活化好的板上点样。展开溶剂为氯仿:甲醇:水(65:25:4, V/V)^[5]。采用钼酸铵为显色剂,在130℃左右烘干显色。对卵磷脂标准品和样品的对应薄层斑点作光谱扫描图,确定以450nm为测定波长,灵敏度 $\lambda=1$,狭缝宽 1.2×1.2 ,线性化 $Sx=3$,作反射法锯齿扫描。

2 结果与分析

2.1 卵磷脂的粗提

研究了提取时间、提取温度、料液比及乙醇浓度这四个影响因素对卵磷脂产率的影响。为确定各因素合理的选取水平,做三水平四因素 $L_9(3^4)$ 正交试验,表头设计的试验方案如表1,以卵磷脂的产率作为技术控制指标的正交试验结果及分析见表2。从表2中可以看出:对卵磷脂产率影响的主次应是浸取时间最大,温度次之,乙醇浓度与加入量影响相对较小。从表中直观看出 $A_1B_3C_3D_3$ 与 $A_3B_3C_2D_1$ 的搭配组合的卵磷脂产率最大。最适宜提取条件为浸取时间取 A_3 (60min),浸取温度取 B_3 (20℃),乙醇浓度取 C_3 (92%),乙醇用量取 D_3 (12ml/g)。综合起来 $A_3B_3C_3D_3$ 是可能的最好搭配组合。

为了验证结果,以 $A_3B_3C_3D_3$ 搭配组合条件下,做三组平行实验,结果见表3。从表3中可看出在此条件下,卵磷脂产率比九次试验中最好搭配 $A_3B_3C_2D_1$ 与

表1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment test

| 水平 | 因素 | | | |
|----|----------------|--------------|--------------|-----------------|
| | A(min) 浸取时间 | B(℃) 浸取温度 | C(%) 乙醇浓度 | D(ml/g) 乙醇用量 |
| 1 | A_1 20 | B_1 10 | C_1 98 | D_1 8 |
| 2 | A_2 40 | B_2 15 | C_2 95 | D_2 10 |
| 3 | A_3 60 | B_3 20 | C_3 92 | D_3 12 |

表2 正交试验及分析结果

Table 2 Scheme and result of the orthogonal experiment

| 试验号 | 因素 | | | | 卵磷脂的 产率 (%) |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | A(min) 浸取时间 | B() 浸取温度 | C(%) 乙醇浓度 | D(ml/g) 乙醇用量 | |
| 1 | A ₁ 20 | B ₁ 10 | C ₁ 98 | D ₁ 8 | 7.14 |
| 2 | A ₁ 20 | B ₂ 15 | C ₂ 95 | D ₂ 10 | 9.15 |
| 3 | A ₁ 20 | B ₃ 20 | C ₃ 92 | D ₃ 12 | 10.27 |
| 4 | A ₂ 40 | B ₁ 10 | C ₂ 95 | D ₃ 12 | 9.96 |
| 5 | A ₂ 40 | B ₂ 15 | C ₃ 92 | D ₁ 8 | 10.14 |
| 6 | A ₂ 40 | B ₃ 20 | C ₁ 98 | D ₂ 10 | 10.11 |
| 7 | A ₃ 60 | B ₁ 10 | C ₃ 92 | D ₂ 10 | 10.22 |
| 8 | A ₃ 60 | B ₂ 15 | C ₁ 98 | D ₃ 12 | 10.21 |
| 9 | A ₃ 60 | B ₃ 20 | C ₂ 95 | D ₁ 8 | 10.27 |
| 1 | 26.56 | 27.32 | 27.46 | 27.55 | |
| 1 | 30.21 | 29.5 | 29.38 | 29.48 | |
| 1 | 30.7 | 30.65 | 30.63 | 30.44 | |
| 极差 R | 4.14 | 3.33 | 3.17 | 2.89 | |
| 最好水平 | A ₃ | B ₃ | C ₃ | D ₃ | |
| 因素主次 | | A | B | C | D |

表3 验证实验

Table 3 The verification of the optimum conditions experiment

| 实验号 | 鲜蛋黄重(g) | 粗品EPC重(g) | 产率(%) |
|-----|---------|-----------|-------|
| 1 | 26.45 | 2.7482 | 10.39 |
| 2 | 26.70 | 2.7795 | 10.41 |
| 3 | 25.90 | 2.6808 | 10.35 |

A₁B₃C₃D₃的产率还要高,故可确定A₃B₃C₃D₃为最优卵磷脂提取搭配。

2.2 卵磷脂的纯化

柱层析法纯化卵磷脂的收率计算公式:

$$\text{卵磷脂的收率} = \frac{\text{实际所得卵磷脂的重量}}{68.2\% \times \text{加入的卵磷脂的总量}} \times 100\% \quad (1)$$

采用氯仿/甲醇梯度洗脱收集到仅含单一斑点的卵磷脂溶液660ml,将收集液经旋转蒸发,且冷冻干燥,得高纯度卵磷脂1.6047g,由公式(1)计算得收率为89.47%。用薄层层析(TLC)定性鉴定,结果见表4。由TLC定性分析发现,随着洗脱液极性增大,杂质斑点由溶剂前沿逐渐下移,直至出现单个卵磷脂斑点,且当洗脱液极性很大(1:2)时,卵磷脂才被带出。由该表还可看出,随着洗脱液极性逐渐增大,某些杂质也可逐个分离出来。

2.3 卵磷脂的检测

对提取的EPC粗品和以此为原料经柱纯化后的EPC精品给以定性测定,结果如图1。从图1可见,粗提EPC纯度接近75%的卵磷脂,经柱纯化的卵磷脂精品与标品几乎纯度一样。

我们采用薄层色谱扫描法定量分析它们的纯度。

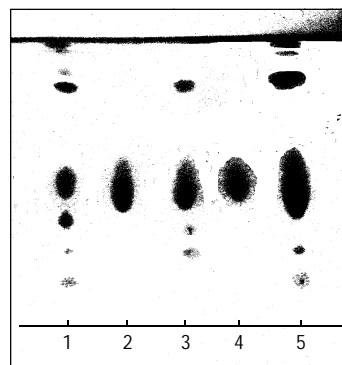
2.3.1 纯度测定原理及公式

由测定可知:点样量大约在1.7~8.5μg/点的范围

表4 卵磷脂的洗脱情况

Table 4 The results of various elution used to purify phosphatidylcholine

| 编号 | 洗脱液 (氯仿/甲醇) | 收集液体积 (ml) | 薄层层析现象 | R _f 值 |
|----|----------------|---------------|---------|--|
| | 40:1 | 50 | 二个杂质斑点 | R _{f1} =0.44, R _{f2} =0.73 |
| | 40:1,35:1 | 150 | 无斑点 | - |
| | 30:1,25:1 | 240 | 单一杂质斑点 | R _f =0.93 |
| | 20:1,15:1 | 200 | 无斑点 | - |
| | 10:1,5:1,1:1 | 240 | 四杂质斑点 | - |
| | 1:1 | 160 | 单一杂质斑点 | R _f =0.76 |
| | 2:3 | 220 | 无斑点 | - |
| | 1:2 | 660 | 单一卵磷脂斑点 | R _f =0.61 |
| | 1:2 | 100 | 无斑点 | - |
| | 1:3 | 230 | 单一杂质斑点 | R _f =0.19 |



卵磷脂的 R_f :

$$R_f = \frac{7.35}{12.05} = 0.61$$

1. 25% EPC; 2. 标准品EPC; 3. 自制EPC粗品; 4. 经柱纯化的EPC精品; 5. 75% EPC。

图1 薄层展开图谱

Fig.1 The thin-layer chromatography diagram of phosphatidylcholine

内,斑点扫描峰面积值与卵磷脂的含量呈线性关系。故在测定时可取已知浓度的样品EPC溶液与已知浓度的标准EPC溶液相等体积,分别点于同一薄板上,进行层析和扫描。由卵磷脂含量与扫描峰面积值间存在的线性对应关系,根据扫描峰面积值大小的对比,通过已知的标准品的浓度与纯度,换算出已知浓度的样品中卵磷脂的纯度。

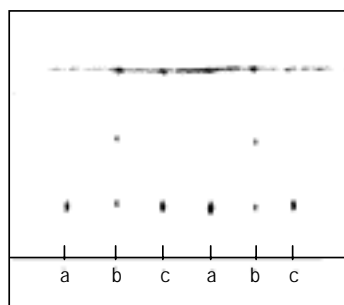
$$\text{样品纯度} = \frac{\overline{S}_{\text{样}} \times \text{标准品纯度值} \times \text{标准品浓度}}{\overline{S}_{\text{标}} \times \text{样品浓度}} \quad (2)$$

上式中: $\overline{S}_{\text{样}}$ —代表样品点的平均峰面积值;
 $\overline{S}_{\text{标}}$ —代表标准品点的平均峰面积值;
 标准品纯度值 99%。

2.3.2 粗品EPC与精品EPC的纯度测定

配制一定浓度的点样液,标品浓度为1.7mg/ml、粗品EPC浓度为1.17mg/ml,精制EPC浓度为1.10mg/ml并在活化好的同一块板上点标品EPC,自制EPC,柱纯化

EPC 三个样六个点, 点样体积都为 $2\mu\text{l}$, 点样点次序见展开、显色后的结果如图 2。



a 是标品 EPC; b 是自制的 EPC 粗品; c 是以粗品 EPC 为原料经柱纯化后的 EPC 精品。

注: 为了扫描底板色泽干净, 整块板子显色较淡, 故一些杂质点不清晰。

图 2 标品、粗品和纯化的 EPC 薄层展开图

Fig. 2 The chromatography diagram of standard sample, crude and pure product

然后以薄层色谱扫描条件, 做原点扫描, 扫描结果见附图 1。由扫描图可得标准品平均峰面积值, 粗品平均峰面积值和精品平均峰面积值, 又已知它们的浓度分别为 1.7、1.17 和 1.10mg/ml。由纯度计算公式求得, 粗提 EPC 的纯度大于 68.2%, 经柱纯化后的精品 EPC 的纯度大于 97.4%, 计算过程见表 5。

表 5 粗品与精品 EPC 的纯度计算过程
Table 5 The calculating process of EPC purity

| 点样点 | 类型 | | | | 纯度(%) |
|--------|----------|------------------|--------------|------|-------|
| | 峰面积值S | 平均峰面积值 \bar{S} | 已知浓度值(mg/ml) | | |
| 粗品 EPC | 50632.11 | 52533.04 | 51582.575 | 1.17 | 68.2 |
| 精品 EPC | 68972.5 | 69668.3 | 69320.4 | 1.10 | 97.4 |
| 标品 EPC | 110444.3 | 107264.4 | 108854.35 | 1.7 | 99.0 |

3 结 论

本课题基于工业化角度, 先采用溶剂提取法, 制

得纯度较高的卵磷脂粗品, 后采用柱层析获得高纯度单组分卵磷脂精品。通过对乙醇提取过程中的工艺条件研究, 发现当乙醇体积是蛋黄重的 12ml/g 时、在 20℃ 时、用 92% 的乙醇、提取 60min 时卵磷脂产率最高; 对柱层析纯化卵磷脂的研究结果表明: 采用 60~100 目数的硅胶, 利用甲醇—氯仿梯度洗脱, 洗脱液用量相对较少, 并可得到理想的高纯度产品。

3.1 提取工艺研究方面

提出了以蛋黄为原料, 乙醇与乙醚为混合溶剂提取, 后用丙酮除杂精制的工艺路线, 在此工艺条件下制得的产品纯度相对较高, 整个过程操作简单, 成本低廉。

3.2 在分析方法方面

国外一般采高效液相色谱法和核磁共振法分析卵磷脂产品, 但这两种方法所用仪器昂贵, 操作费时^[6]。在这种情况下基于薄层色谱法的特点以及卵磷脂产品的特性, 尝试用薄层色谱为主要的定性检测卵磷脂的方法, 并配合采用薄层扫描仪定量检测, 结果较满意, 为卵磷脂的定性, 定量检测找到了一个简单、方便、可行的分析方法。

3.3 在柱层析纯化方面

以氯仿/甲醇梯度洗脱, 采用 60~100 目数的柱硅胶, 分离出单一斑点的卵磷脂产品。整个过程洗脱溶剂相对用量不大, 且产品纯度高。该工艺方法是实验室获得高纯度单组分样品的简单有效方法, 并且成本相对较低。

参考文献:

- [1] 方嘉坚, 陈龙. 大豆卵磷脂的提纯[J]. 食品科学, 2000, 21(3): 25-27.
- [2] 汪秋安, 叶方圆. 卵磷脂的开发与应用[J]. 广西轻工业, 1991, (1): 9-12.
- [3] 林卓振. 色谱法[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [4] 裴瑾, 陈星海, 杨翰仪, 等. 硅胶G层析法提取心磷脂及其鉴定[J]. 白求恩医科大学学报, 1997, 23(6): 110-112.
- [5] M I Gurr, A T James. Lipid Biochemistry, 3rd ed[M]. London: Chapman and Hall Ltd, 1980. 152.
- [6] 李卫, 黄光斗, 邵友元, 等. 应用TLC法鉴定卵磷脂纯度[J]. 湖北工学院学报, 2000, 15(1): 41-43.

中国科学引文数据库核心库收录期刊