

鸡蛋黄中磷脂的提取及分析

张佑红¹, 陈燕¹, 朱雄伟¹, 秦琴¹, 吴元欣¹, 杜进², 谈雅静³, 候畅³, 赵亮¹, 吕中¹

(1. 武汉工程大学 湖北省新型反应器与绿色化学工艺重点实验室, 湖北 武汉 430073

2. 北京大学医学部, 北京 100083 3. 武汉化工学院, 湖北 武汉 430023)

摘要: 本研究利用磷脂在丙酮中的相对不溶性, 将磷脂从蛋黄中提取出来, 用分光光度法在 630nm 下测量蛋黄中磷脂的含量。然后以纸层析为主要的定性检测手段来检测磷脂 X 基团, 用薄层色谱法对磷脂混合物的各个成分进行定性分析。

关键词: 蛋黄磷脂; 提取; 纸层析; 薄层层析

Extraction and Analysis of Phospholipids in Egg Yolk

ZHANG You-hong¹, CHEN Yan¹, ZHU Xiong-wei¹, QIN Qin¹, WU Yuan-xin¹, DU Jin²,

TAN Ya-jing³, HOU Chang³, ZHAO Liang¹, LÜ Zhong¹

(1. Hubei Key Laboratory of Novel Chemical Reactor and Green Chemical Technology, Wuhan Institute of Technology,

Wuhan 430073, China 2. Medicine School, Beijing University, Beijing 100083, China

3. Wuhan Institute of Technology, wuhan 430023, China)

Abstract: Based on relative indissolubility of phospholipid in acetone, phospholipids in egg yolk were extracted in this research. The content of phosphorus was determined with spectrophotometry at 630nm. Group X in phospholipid was detected by paper chromatography. At least four fractions of the phospholipids were separated by thin layer chromatography and the phenomena was explained.

Key words lecithin; extract; paper chromatography; thin layer-chromatography

中图分类号: TS253.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0373-04

磷脂是生物膜的基本成分, 具有很重要的生理功能。磷脂是含磷酸的脂类的总称, 根据分子结构中是否含有甘油骨架分为甘油磷脂(glycerophosphatide)和非甘油磷脂两大类。甘油磷脂的结构见图 1, 由于取代基 X 不同, 甘油磷脂进一步可分为卵磷脂(phosphatidylcholine, PC)、脑磷脂(phosphatidylethanolamine, PE)、丝氨酸磷脂(phosphatidylserine, PS)和肌醇磷脂(phosphatidylinositol, PI)等, 非甘油磷脂主要为分子结构中含有神经醇骨架的神经鞘磷脂(sphingomyelin, SP)^[1], 结构见图 1^[2]。

蛋黄是富含磷脂的材料^[2], 目前, 对蛋黄磷脂的开发利用主要集中在食品、化妆品和医药品等与日常生活密切相关的领域。随着相关技术的发展, 蛋黄磷脂在其它方面的应用也越来越受到重视。Claus 等报道, 将蛋黄磷脂乳液代替商业的脂类复合物加入无血清或低血清培养基中, 昆虫细胞仍能保持较高的生长速率^[3], 从而为蛋黄磷脂开辟了一条新的应用途径。最近报道在培养基中胎牛血清的含量从 10% 降低到 1%, 甚至是无血

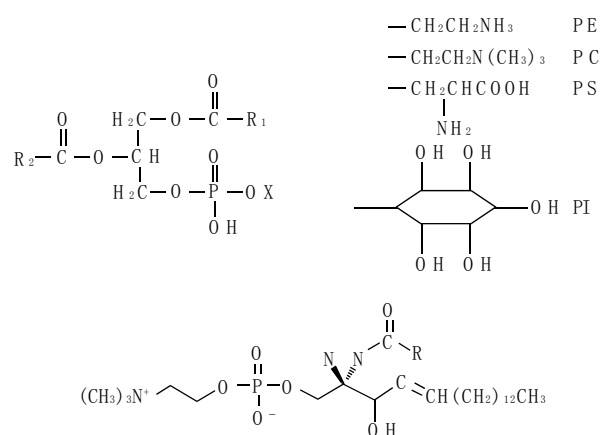


图 1 甘油磷脂和神经鞘磷脂结构式图

Fig.1 Structures of glycerophospholipid and sphingomyelin

清的情况下适量加入脂类物质, 昆虫细胞能保持良好的生长^[4-5]。为了研究各类磷脂及它们的含量对昆虫细胞培养的影响, 对蛋黄磷脂中的各类磷脂组分的含量进行准确

收稿日期: 2006-08-24

基金项目: 湖北省重点实验室开放基金项目(RCT2004004); 武汉市科技攻关项目(20052002044)

作者简介: 张佑红(1964-), 男, 博士, 主要从事生物技术开发方面研究。

地分析与测定是十分必要的。目前,分析磷脂的方法主要是采用各种色谱法和分光光度法等^[6]。本研究采用分光光度法测量蛋黄中磷的含量,以纸层析为主要的定性检测手段来检测磷脂X基团,再用薄层色谱法对磷脂混合物的各个成分进行定性分析。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸡蛋 市售。

氯仿、甲醇、丙酮、氯化钠、无水硫酸钠、抗氧化剂对苯二酚、石油醚、磷酸二氢钾、浓硫酸、四水合钼酸铵、1-氨基-2-萘酚-4-磺酸、偏亚硫酸钠、胆碱、丝氨酸、乙醇胺、肌醇、硫酸铵固体,以上均为分析纯。

722S 可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; Whatman No. 1 滤纸 Whatman 国际有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司; 硅胶G板 上海信谊仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 蛋黄磷脂的提取

将一个鸡蛋的蛋黄与蛋清完全分离,然后将90ml氯仿-甲醇混合溶液(2:1,体积比)加入到蛋黄中,搅拌10min后用Whatman No.1滤纸常压过滤。滤液用50ml 1% NaCl水溶液洗涤后静置分层1h左右,下层(氯仿层)用无水Na₂SO₄干燥后过滤,滤液中加入少许抗氧化剂对苯二酚,并于旋转蒸发器上将氯仿蒸出,残留物中加入30ml丙酮后于冰浴中冷却结晶15min,过滤以得到磷脂提取物。

1.2.2 蛋黄磷脂中磷含量的测定

蛋黄中的磷脂主要是卵磷脂和脑磷脂,磷脂的含量主要通过蛋黄中磷的含量来测定^[7]。以三次提取的磷脂为样品,分别进行测定。每次各称取40mg磷脂提取物并向其中加入1ml浓硫酸于200℃下消化^[8]。将消化好的磷脂溶液定容至100ml,然后在标号1、2、3和4号试管中加入10μg P/ml的标准磷溶液1、2、3和4ml,在标号5、6和7号试管中加入磷脂水解产物1、2和3ml。将所有的试管用蒸馏水定容到4ml,并在每个试管中加入0.5ml的5mol/L H₂SO₄、0.2ml 5%的(NH₄)₂MoO₄溶液和0.3ml还原剂(由偏亚硫酸氢钠、无水亚硫酸钠及1-氨基-2-萘酚-4-磺酸配制而成)。最后所有试管定容至50ml测其吸光度。

2 结果与分析

2.1 磷含量标准曲线的确定

测出在630nm下标准磷溶液的吸光度,并对磷含量(μg/ml)作图,如图2所示。

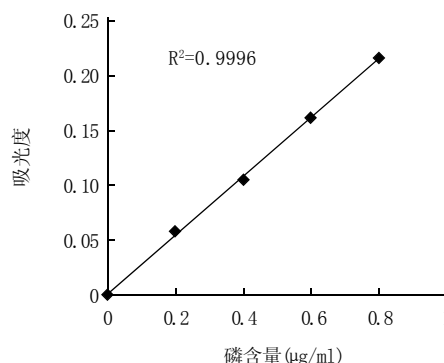


图2 标准磷在630nm的吸光度

Fig.2 Calibration curve

由图2可知,吸光度与磷含量呈 $y=kx$ 的线性关系,其 k 值等于3.8。即可得到方程式:

$$y=3.8x \quad (1)$$

式中, y 为磷含量(μg/ml); x 为吸光度。

2.2 蛋黄中磷含量的测定

根据分光光度计测得的吸光度,代入方程式(1)即可得出待测样品中磷浓度,结果如表1所示,由此表可算出磷脂中磷含量为6.8%。

表1 磷含量测定结果
Table 1 Results of phosphorus content

待测样品(ml)	吸光度	磷含量(μg/ml)	平均值(μg/ml)
一号样品	1 0.149	0.5662	0.5529
	2 0.285	1.0830	
	3 0.439	1.6682	
二号样品	1 0.146	0.5548	0.5605
	2 0.281	1.0678	
	3 0.458	1.7404	
三号样品	1 0.141	0.5358	0.5219
	2 0.281	1.0678	
	3 0.402	1.5276	

2.3 纸层析分析

磷脂中的X基团,可以通过酸水解将其从磷脂中释放出来。然后将酸蒸发出来,最后过滤得到的溶液便是含有几种基团的水解液。

2.3.1 磷脂样品水解物制备

取200mg鸡蛋磷脂样品加入10ml 6mol/L盐酸溶液在120℃回流2h,自然冷却后过滤到烧杯中,100℃下水浴蒸发水解物。蒸干后,烧瓶中的残留物用1ml蒸馏水洗涤,过滤后得到水解物。

2.3.2 纸层析

磷脂水解液和胆碱、丝氨酸、乙醇胺、肌醇标准

液分别点在四张纸滤纸上放入丁醇:醋酸:水(4:1:5,V/V)^[9]的展开剂中层析。

2.3.3 显色

纸层析显色后的结果如图3所示。

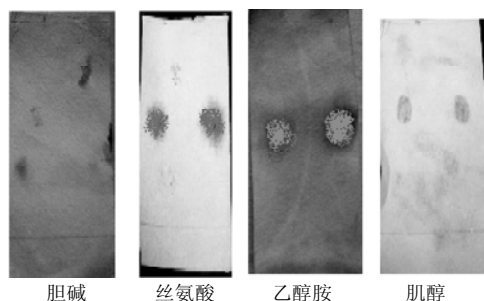


图3 纸层析结果示意图

Fig.3 Results of paper chromatography

左边斑为样品显色的,右边斑为标准液显色的。用标准液与样品同时进行层析,显色之后样品与标准品有同样色斑且在同一水平线上的即为与标准品同一成分。胆碱经显色之后呈现蓝色斑点,丝氨酸和乙醇胺经显色之后呈现紫色斑点,肌醇经显色之后呈现黑色斑点。从实验结果可以看出,磷脂样品水解后,含有胆碱、丝氨酸、乙醇胺、肌醇这四种X基团。

胆碱显色时杂色斑点较少,而丝氨酸、乙醇胺和肌醇显色时,杂色斑点较多,很不容易看清待测斑点。故在显色后做了一定处理,用化学试剂将杂色斑点除去。丝氨酸和乙醇胺与茚三酮发生了显色反应,然后用0.1mol/L的盐酸溶液洗去磷脂。肌醇在显色之后,纸上留下棕色背景,黑色斑点在其中很难辨认,可以用10%的硫代亚硫酸钠溶液除去。

2.4 薄层层析

磷脂样品是由多种磷脂的混合物组成,用薄层层析分开后也需要用显色剂显色,然后测量各个组分,并与文献[8]对照,从而可以确定各组分物质。

2.4.1 薄层层析

取磷脂样品50mg,加入2~3滴石油醚使之溶解,点样到硅胶板上,在氯仿:甲醇:乙酸:水(85:15:10:3,V/V)^[8]展开剂中平行进行三次层析,结果如表2所示。

2.4.2 显色

向干燥的薄板喷洒20%硫酸铵(加入4ml浓硫酸),直到薄板变得透明,在220℃下烘烤20min。

2.4.3 测算 R_f 值

溶质在纸上的移动速度率可用迁移率 R_f 值表示, R_f 值主要决定于被分离物质在两相间的分配系数。在同一条件下, R_f 值是个常数,不同物质的 R_f 值不同,这一性质可作为混合物分离鉴定的依据。

薄板显色成功后,对不同斑点进行 R_f 值测算。

2.4.4 层析结果

薄层层析实验结果如图4所示。



图4 薄层层析结果示意图

Fig.4 Results of thin layer chromatography

显色之后每块板上出现了四个点,其 R_f 值与文献值相比较^[8],便可知每个点对应的磷脂。 R_f 值测算结果见表2。

表2 R_f 测算值
Table 2 Results of R_f value

	序号	A点	B点	C点	D点	展开剂流动距离
色斑距	1	1.1	1.65	3.5	7.15	8.25
基线距	2	1.1	1.75	3.45	6.2	8.25
离(cm)	3	1.2	1.6	3.3	6.04	8.22
R_f 值	1	0.133	0.2	0.424	0.867	
	2	0.133	0.212	0.418	0.752	
	3	0.146	0.195	0.401	0.735	

注:A、B、C、D点为距基线由近到远色斑点。

文献中溶血磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷脂酰胆碱以及磷脂酰乙醇胺的 R_f 值分别约为0.1、0.2、0.4和0.9^[10]。表1中计算出来A、B、C、D点 R_f 平均值是0.137、0.202、0.414、0.785,所以可以确认为A点是溶血磷脂酰胆碱,B点是鞘磷脂,C点为磷脂酰胆碱,D点为磷脂酰乙醇胺。磷脂酰胆碱的斑是最大的斑,有相关文献报道是因为磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇与磷脂酰胆碱的斑混在一团,未能分开^[11]。

3 结论

本实验采用有机溶剂提取蛋黄中磷脂,用分光光度法测定了磷脂提取物的含量,其含量在6.8%左右。用纸层析证实了鸡蛋磷脂中的X基团为胆碱、丝氨酸、乙醇胺、肌醇。用薄层层析检测出磷脂混合物中有溶血磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺。它们的 R_f 值分别约为0.4、0.2、0.1、0.9。在以后的工作中,本实验室准备用高效液相色谱对蛋黄磷脂进行定量研究。

HPLC 法同时测定五味子不同部位中 三种木脂素成分含量

郑春英, 李宏涛, 吴 桐, 牛雯颖, 陆欣媛, 平文祥*

(黑龙江大学生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘 要: 目的: 采用 HPLC 法同时测定五味子不同部位中五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素含量。方法: 采用 Symmetry C₁₈ 柱, 甲醇-乙腈-水(1:1:1) 作流动相, 流速 1ml/min, 检测波长 250nm。结果 五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素含量测定方法的线性关系良好, 线性范围和相关系数为 0.04~0.2mg/ml ($r=0.9999$); 回收率分别为 103.03%、99.83% 和 101.55%; RSD 分别为 0.99%、2.15%、1.39% ($n=10$)。结论: 该方法精密度、重现性和分离效果好, 分析快速准确, 适合于该药材中五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素含量的测定, 不同部位三成分均存在一定的差别。

关键词: HPLC; 五味子; 五味子醇甲; 五味子甲素; 五味子乙素

Simultaneous Determination of Schizandra, Deoxyschizandra and γ -Schizandra in Different Parts
of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill by HPLC

ZHENG Chun-Ying, LI Hong-tao, WU Tong, NIU Wen-Ying, LU Xin-Yuan, PING Wen-Xiang*

(Heilongjiang Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: Objective: To establish a HPLC method for the determination of schizandra, deoxyschizandra and γ -schizandra in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill, so as to investigate their contents in different parts. Methods: The determination was performed on a Symmetry C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μ m). The mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-water (1:1:1) with the flow rate of 1 ml/min. The wavelength was set at 250 nm. Results: A good linearity was obtained with the correlation

收稿日期 2006-10-02

*通讯作者

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11511289); 黑龙江大学杰出基金项目; 黑龙江大学博士启动基金项目

作者简介: 郑春英(1968-), 副教授, 博士, 主要从事食品、药品有效成分分析。

本研究结果表明鸡蛋磷脂种类比较多, 可以成为磷脂产品的又一大来源, 分析其中每种磷脂成分, 可为开发新的廉价昆虫细胞培养基提供参考。

参考文献:

- [1] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [2] 代忠波, 丁平. 卵磷脂的研究概况[M]. 中国乳品工业出版社, 2005.
- [3] CLAU J D, REMONDETTO G E, GUERRERO S A. Anticarsia gemmatilis nuclear polyhedrosis virus replication in serum-free and serum-reduced insect cell cultures[J]. J Biotechnol, 1993, 31: 1-15.
- [4] ZHANG Y H, ENDEN G, MERCHUK J C. Insect cells-baculovirus system Factors affecting growth and low MOI infection[J]. Biochem Eng J, 2005, 27: 8-16.
- [5] 张佑红, 王华林, 朱雄伟, 等. 适合棉铃虫细胞HzAm1生长的培养基筛选及低血清驯化[J]. 生物工程学报, 2006, 22(4): 686-688.
- [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] 张颖颖, 杨亦文, 吴彩娟, 等. 磷脂分析检测方法的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(1): 58-62.
- [8] DE KONING A J. Analysis of egg lipids[J]. J Chem Edu, 1974, 51(1): 48-50.
- [9] 唐尧, 赵郁, 饶桂香. 复方氨基酸补铁液中氨基酸的薄层鉴别[J]. 华西药学杂志, 1997, 12(4): 257-258.
- [10] DOBSON G, DEGHTON N. Analysis of phospholipid molecular species by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of diacylglycerol nicotinate[J]. Chem and Phys Lipids, 2001, 111: 1-17.
- [11] HOYOON T. Phosphatidylcholine isolation from egg yolk phospholipids by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatography A, 2004, 949: 209-216.