

磷脂酰丝氨酸分离研究进展

何爱山, 云志

(南京工业大学化学化工学院, 江苏南京 210009)

摘要:综述了生物体中磷脂酰丝氨酸分离方法的研究进展。主要介绍了溶剂萃取法、薄层色谱分离法、柱色谱分离法和高效液相色谱分离法等常用方法,并简要介绍了其他分离方法以及磷脂酰丝氨酸的生理功能和应用前景。

关键词:磷脂酰丝氨酸;分离;萃取;色谱

中图分类号:Q939

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2008)01-0027-04

Advances in separation of phosphatidylserine

HE Ai-shan, YUN Zhi

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: The procedures for separation of phosphatidylserine(PS) in biological systems are reviewed in this paper. The common methods including solven extraction, thin-layer chromatography separation, column chromatographic separation, high-performance liquid chromatography separation *etc.* are described and commented. Other separation methods as well as the physiological function and application prospect of PS are briefly discussed.

Key words: phosphatidylserines; separation; extraction; chromatography

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)主要用于治疗脑衰老,近几年更以“脑专一性营养物质”引起广泛的关注^[1]。从大豆或牛脑中提取的高纯度磷脂酰丝氨酸(纯度 95% 以上),是一种以有效补充细胞内代谢消耗的磷脂酰丝氨酸为目的的一种高效营养补剂。磷脂酰丝氨酸在动物、高等植物和微生物中分布广泛但是数量少,是细胞膜磷脂的重要组成部分之一。它占哺乳类动物脑中全部磷脂的 10%~20%,对许多细胞代谢过程有重要的调节作用。如磷脂酰丝氨酸通过甲基化可生成磷脂酰胆碱,后者又可作为合成乙酰胆碱的前体,参与调节细胞膜的流动性,并在细胞膜受体与第二信使间起中介作用。另外,磷脂酰丝氨酸还可激活细胞膜上的 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、蛋白激酶 C 和酪氨酸羟化酶^[2]。

近些年来关于磷脂酰丝氨酸的营养和医用价值的研究已有广泛深入报道,有关磷脂酰丝氨酸的分离技术研究近年来也有较多的发展,本文重点对磷脂酰丝氨酸分离技术进行综述。

1 溶剂萃取法

磷脂酰丝氨酸的溶剂萃取法是根据磷脂酰丝氨酸在一些溶剂中溶解度的差异而进行的。磷脂酰丝氨酸在一些溶剂中具有很好的溶解度,如石油醚、乙

醚、氯仿及四氢呋喃等有机溶剂,在甲醇及丙酮中则不溶。根据相似相溶原理,非极性溶剂对磷脂酰丝氨酸具有较好溶解性,但选择性不是很好;而强极性溶剂虽然对磷脂的溶解性不好,但在低浓度下却对磷脂酰丝氨酸有非常高的选择性。所以,为了有效打断非共价键的结合,从极性脂质中高效分离出磷脂酰丝氨酸需要极性和非极性的复配溶液,因此如果将对磷脂酰丝氨酸具有较好溶解性的非极性溶剂(如低级烷烃类)和对磷脂酰丝氨酸具有较高选择性的强极性溶剂(如低碳醇)进行组合,就可获得具有双方优点的混合溶剂^[3]。

Bligh 等以动物组织为原料、氯仿-甲醇-水为溶剂进行萃取富集磷脂酰丝氨酸,在常温下向动物组织中加入一定量的氯仿-甲醇-水(体积比 5:10:4)混合溶剂,搅拌萃取,动物组织首先均匀分散在氯仿和甲醇混合溶剂中,然后溶于水和/或氯仿而产生溶解了脂质的氯仿相和溶解了非脂质的甲醇-水相,过滤,收集氯仿下清液,然后再加入一定量的甲醇-水(体积比 10:9)溶液进一步除去剩余的油类杂质,在氮气条件下蒸除氯仿,再蒸干得粗磷脂酰丝氨酸。

Hara 等也以动物组织为原料,选用了更为经济和环保的正己烷-异丙醇混合溶剂体系,在动物组织混合物中加入正己烷-异丙醇(体积比 3:2)使其

收稿日期:2007-09-25

作者简介:何爱山(1982-),男,硕士生,主要从事天然资源加工分离的研究;云志(1954-),男,博士,研究员,博士生导师,主要研究领域为化工分离、状态方程、高压相平衡、超临界流体、金属间化合物及资源利用,025-83587190, yunzhi@njut.edu.cn。

均匀分散,然后过滤,向残渣中加入混合溶剂漂洗 3 次,再向滤液中加入少量硫酸钠溶液进一步沉淀,最后静置分层,蒸除上层液中的溶剂,就得到粗磷脂酰丝氨酸。

刘代成等^[4]发明了一种从动物脑组织中提取磷脂酰丝氨酸的方法:先将动物脑组织碎成颗粒,在颗粒中加入丙酮,搅拌萃取,除去脑粒中的胆固醇和油类的丙酮上清液,蒸干残渣;向蒸干的残渣加入正己烷或乙醇或氨水乙醇溶液,搅拌萃取,除去含有磷脂复合物的萃取液,残渣蒸干;再向蒸干的残渣中加入乙醚,搅拌萃取,萃取液经蒸浓后加入碱性水溶液,搅拌、冻结、解冻,滤除沉淀,进一步除去剩余的磷脂,然后调节上清液 pH,蒸除乙醚,再蒸干得粗磷脂酰丝氨酸;最后将粗磷脂酰丝氨酸溶于正己烷中,再加入醋酸钠乙醇溶液,搅拌、静置分层,除去含有肌醇磷脂的下层,上部正己烷减压蒸干得磷脂酰丝氨酸。

溶剂萃取法具有操作简单,溶剂来源广泛,处理量大,溶剂相对便宜、便于回收利用等优点,当对产品中磷脂酰丝氨酸含量要求不高时可以使用该法。由于磷脂酰丝氨酸在植物生物膜和动物脂质中的含量较低,因此使用溶剂萃取法需要大量的溶剂;此外,产品中磷脂酰丝氨酸含量较低,需要用其他方法进一步纯化分离。

2 薄层色谱分离法

薄层色谱法(TLC)是将供试品溶液点样于薄层板上,经展开,检视所得的色谱图与标样按同法所得的色谱图对比,是一种比较适用于微量物质的分离或杂质检测的方法。Hanahan^[5]利用薄层色谱分析法中的阶式展开(也叫分级展开)技术,达到了很好的分离磷脂酰丝氨酸的目的。第一次在硅胶 H 薄层(20 cm × 20 cm, 250 μm)上,用氯仿-甲醇-氨水(体积比 65:35:7)为展开剂,第二次用极性较强的丙酮-氯仿-甲醇-醋酸-水(体积比 48:36:12:12:5)为展开剂,将 6-对甲苯胺-2-萘磺酸溶于喹啉酸作显色剂,薄层板上显现出磷脂酰丝氨酸斑点,并可进行定量分析。然后将具有与标准磷脂酰丝氨酸相比移值(R_f)的部分用氯仿-甲醇-水(体积比 1:2:0.8)溶液萃取,在下层氯仿清液中加入部分氯仿进一步萃取分离极性脂质,最后蒸干除去氯仿溶剂,得到纯脂酰丝氨酸。Rome 等^[6]用氯仿-甲醇-水-28%的氨水(体积比 300:100:10:12)混合溶液作展开剂、茚三酮作显色剂,并用 TLC 法分离磷脂酰丝氨酸并

检测纯化过程中磷脂酰丝氨酸的含量。

薄层色谱法的缺点是对样品过于敏感,费时并且操作麻烦,故近年来该方法的使用有减少的趋势。

3 柱色谱分离法

该法是根据柱填充材料对磷脂中不同组分的吸附能力不同而加以分离。用于分离磷脂酰丝氨酸的填充材料用得最多的是硅胶和氧化铝,硅胶是目前应用最为广泛的填充材料,氧化铝的吸附能力通常比硅胶要强,因此比较适用于亲脂成分的分离,氧化铝的样品处理量比硅胶要大,可以根据实际需要选择^[7]。Hanahan 等以脂质为原料,用中性氧化铝柱,氯仿-甲醇(体积比 1:1)溶剂冲洗除去中性脂质和磷脂酰胆碱类混合物,然后用乙醇-氯仿-水(体积比 5:2:1)萃取得到磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸混合物,最后用 TLC 法从磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸的混合物中分离出磷脂酰丝氨酸。Mounts 等^[8]将磷脂装载到硅胶柱中,然后用氯仿-丙酮-甲醇-0.1%的磷酸(体积比 2:1:1:1)溶液洗脱,再减压蒸干得甘油磷脂残渣,残渣溶于氯仿,用碳酸氢盐中和后除去溶剂分离出磷脂酰丝氨酸。

吸附柱色谱法虽然可以得到含量较高的磷脂酰丝氨酸,但是处理量十分有限,而且要用到许多有一定毒性的有机溶剂,溶剂的蒸发消耗大量能源,以及产品中的溶剂残留,分离过程耗时,并且不适合极性磷脂的分离。

4 高效液相色谱分离法

由于高效液相色谱(HPLC)法具有高压、高选择性、高灵敏度和高速等特点,近年来逐步发展用高效液相色谱来分离和分析磷脂酰丝氨酸。根据固定相的不同可将分离脂酰丝氨酸的液相色谱法分为正相色谱和反相色谱。国内用高效液相色谱对磷脂酰丝氨酸进行分离测定的研究多集中在食品、医药等领域。正相、反相高效液相色谱方法都有报道,大多用的是紫外检测器,也有蒸发光散射检测器、示差折光检测器及质谱检测器的报道,近几年来质谱检测器的使用逐渐增多,对磷脂分子构型的研究已开始起步。

Rehman^[9]用 Ultrasphere-Si 型硅胶柱,以乙腈-甲醇-85% H_3PO_4 (体积比 100:10:1.8)作流动相,使用紫外分光检测器,用等度正相高效液相色谱法从甘油磷脂中首先基线分离出磷脂酰丝氨酸,保留时间仅为 3.11 min。然而,在相似的酸性流动相条件

下,用 Nucleosil 5-NH₂ 型氨基柱,磷脂酰丝氨酸最后分离出来,保留时间延长为 55 min^[10]。同样, Szucs 等^[11]用己烷-异丙醇-醋酸盐缓冲液(体积比 8:8:1)为流动相,等度洗提却不能清晰地从磷脂酸和磷脂酰肌醇之间分离出磷脂酰丝氨酸,因此选择合适的色谱柱和溶剂是高效液相色谱分离磷脂酰丝氨酸的关键。虽然等度正相高效液相色谱法操作简单,溶剂平衡易于控制,但是分离效率低,流动相用量相对较大。由于这些缺点,人们更青睐梯度正相高效液相色谱法来分离多组分混合物。高效液相色谱的梯度洗提多为流动相流速梯度、流动相配比梯度^[12-15]和流动相组成梯度^[16-18]的报道。文献中关于梯度法的流动相通常有以下 3 种:①氯仿-甲醇-水/氨水;②己烷-异丙醇-水;③乙腈-甲醇-水。然而,大多数研究者更常用己烷-异丙醇-水为流动相,用等度正相高效液相色谱法从甘油磷脂中分离磷脂酰丝氨酸,因为以己烷-异丙醇-水为流动相溶剂黏度低,用紫外分光检测器系统,操作简单易行。在分离过程中向流动相中加入离子抑制剂如 85% 磷酸、30% 氨水、乙酸等,可以有效改善峰形,抑制色谱峰拖尾^[3]。Abidi 等^[18]还发现在氯仿-四氢呋喃(体积比 1:1)→氯仿-甲醇-三乙胺(体积比 4:92:4)流动相条件下,从磷脂酰肌醇和磷脂酰丝氨酸混合物中分离磷脂酰丝氨酸对梯度变化很敏感。

在常规的高效液相色谱分析过程中,总是面临产生大量废溶剂的问题。Vaghela 等^[16]尝试用窄口径柱从甘油磷脂中同时分离和定量分析磷脂酰丝氨酸。值得一提的是, Becart^[17]和 Vaghela^[16]使用相似的流动相(氯仿-甲醇-氨水)但不同的流动相配比梯度,则磷脂酰丝氨酸的保留时间不同,除了不同的梯度影响外,可能与不同直径硅胶柱的尺寸效应有关。

甘油磷脂分子种类不同主要在于脂酰基碳链长度不同,所以反相高效液相色谱技术已用来分离和定量分析磷脂酰丝氨酸。由于 Ultrasphere ODS 色谱柱在缓冲流动相相对高效稳定,因此文献报道^[19-21]大多采用 Ultrasphere ODS 色谱柱,运用反相高效液相色谱来分离各种动物组织中的磷脂酰丝氨酸。用于反相高效液相色谱分离磷脂酰丝氨酸的流动相可分为以下 3 种类型:①甲醇-水;②乙腈-乙醇-水;③乙腈-水。Abidi^[22]和 Deming 等研究发现,在上面 3 类流动相中添加电解质缓冲液(如磷酸盐或醋酸盐)或者使用缓冲流动相(如醋酸铵),磷脂酰丝氨酸的分离就会受到影响,由于缓冲液中离子反应、离子交换或者离子对的参与,使磷脂酰丝氨酸的

保留时间更合理。在高效液相色谱分离过程中由于流动相含水量过高而缺乏离子对试剂,常会产生一些无定形峰。Abidi 等^[19]应用反相离子对高效液相色谱技术分离磷脂酰丝氨酸,在乙腈-乙醇-水流动相中加入四乙胺磷酸酯作为离子对试剂,可以解决极性磷脂酰丝氨酸通过 ODS 色谱柱在固定相无保留而不能将磷脂酰丝氨酸与其他磷脂分离的难题。

用高效液相色谱与质谱联用,可以在不破坏磷脂酰丝氨酸分子结构的前提下,得到更加全面、准确的磷脂酰丝氨酸分子结构信息,这一点在医药科学、生命科学等基础科学的研究中尤其重要,而且还能克服柱色谱分离中不同物质在薄层板形成 2 个或 2 个以上的重叠体的缺点。Larsen 等^[23]报道了以异丙醇、四氢呋喃和甲酸胺混合溶液为流动相,用反相高效液相色谱联用蒸发光散射检测器和电喷雾质谱检测器,分别在聚苯乙烯/二乙烯苯柱、C₁₈柱和 C₃₀柱上进行等度洗提、基线分离磷脂酰丝氨酸。结果表明,合成的双饱和磷脂酰丝氨酸在 C₃₀柱上得到最好的色谱分离效果,而存在于生物体和牛脑组织中的天然磷脂酰丝氨酸在聚苯乙烯/二乙烯苯柱上获得最好的分离效果。

用高效液相色谱分析磷脂酰丝氨酸的困难在于磷脂酰丝氨酸分子的低挥发性、不耐高温、弱紫外吸收、易吸水、稳定性差。而且,不同来源的磷脂酰丝氨酸组成成分不同,分子中脂肪酸链长度、不饱和度也有差别。磷脂酰丝氨酸分子本身的这种异质性会导致磷脂酰丝氨酸分离过程中出现色谱峰的重叠、拖尾问题。在生物体中,磷脂一般与其他的脂类结合在一起,需要化学手段进行分离、纯化、浓缩之后才能进行液相色谱分析。因检测难度相对较大,较早期的文献报道并不多见。但是随着科学研究的深入和分析仪器的更新,用高效液相色谱分离磷脂酰丝氨酸逐渐成为近年来的研究热点。

5 其他分离方法

探头正面或负面离子快速原子轰击质谱法表面沉积技术已经运用于磷脂酰丝氨酸的分离和鉴定^[24-25]。Szucs 等^[11]和 Ingvarssen 等^[26]成功运用的高效毛细管电泳或胶束电动毛细管色谱(MEKC)技术同时分离和定量分析磷脂样品中的其他甘油磷脂,胶束电动毛细管色谱法可以快速分离磷脂酰丝氨酸并且溶剂消耗少。Tranchida 等^[27]最近报道了基于气相色谱(GC)、液相色谱(LC)、GC-LC 及填充超临界流体色谱(pSFC)的综合色谱法分析磷脂,可

能成为分离磷脂酰丝氨酸的一种重要方法。

参考文献

- [1] McDaniel M A, Maier S F, Einstein G O. "Brain-specific" nutrients: A memory cure? [J]. *Nutrition*, 2003, 19(11/12): 957 - 975.
- [2] 刘平, 舒良. 磷脂酰丝氨酸的药理及临床应用研究进展[J]. *国外医学: 药学分册*, 1991, 18(4): 207 - 210.
- [3] Abidi S L. Separation procedures for phosphatidylserines[J]. *J Chromatogr B*, 1998, 717: 279 - 293.
- [4] 刘代成, 杨雅婷. 一种从动物脑提取磷脂酰丝氨酸的方法: 中国, 1583766A. 2[P]. 2005 - 02 - 23.
- [5] Hanahan D J. A guide to phospholipid chemistry[M]. New York: Oxford University Press, 1997: 155.
- [6] Rome L D F, Rome P M. Purifying process for phosphatidylserine: US, 0103393 A1[P]. 2002 - 08 - 01.
- [7] 袁黎明. 制备色谱及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [8] Mounts T L, Abidi S L, Rennick K A. Analysis of phospholipid major classes by HPLC with evaporative light-scattering detection[J]. *JAOCS*, 1992, 69(5): 438 - 442.
- [9] Rehman S U. Rapid isocratic method for the separation and quantification of major phospholipid classes by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr Biomed Appl*, 1991, 567: 29 - 37.
- [10] Bernhard W, Linck M, Creutzburg H, et al. High performance liquid chromatographic analysis of phospholipids from different sources with combined fluorescence and ultraviolet detection [J]. *Anal Biochem*, 1994, 220(1): 172 - 180.
- [11] Szucs R, Verleysen K, Duchateau G S M J E, et al. Analysis of phospholipids in lecithins comparison between micellar electrokinetic chromatography and highperformance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 738(1): 25 - 29.
- [12] Rivnay B. Combined analysis of phospholipids by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography analysis of phospholipid classes in commercial soyabean lecithin[J]. *J Chromatogr*, 1984, 294: 303 - 315.
- [13] Seewald M, Eichinger H M. Separation of major phospholipid classes by high-performance liquid chromatography and subsequent analysis of phospholipid-bound fatty acids using gas chromatography[J]. *J Chromatogr*, 1989, 469: 271 - 280.
- [14] Letter W S. A rapid method for phospholipids class separation by HPLC using evaporative light scattering detector[J]. *J Liq Chromatogr*, 1992, 15(2): 253 - 266.
- [15] Kim H Y, Wang T C, Ma Y C. Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) of phospholipids using electrospray ionization[J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 3977 - 3982.
- [16] Vaghela M N, Kilara A. Quantitative analysis of phospholipids from whey protein concentrates by high-performance liquid chromatography with a narrow-bore column and an evaporative light-scattering detector [J]. *JAOCS*, 1995, 72: 729 - 733.
- [17] Becart J, Chevalier C, Biesse J P. Quantitative analysis of phospholipids by HPLC with light scattering detector: Application to raw materials for cosmetic use[J]. *J High Resol Chromatogr*, 1990, 13: 126 - 129.
- [18] Abidi S L. High-performance liquid chromatography of phosphatidic acids and related polar lipids[J]. *J Chromatogr A*, 1991, 587(2): 193 - 203.
- [19] Abidi S L, Mounts T L. Separation of molecular species of phosphatidylserine by reverse-phase ion-pair HPLC[J]. *J Liq Chromatogr*, 1992, 15(14): 2487 - 2502.
- [20] Hullin F, Bossant M J, Salem N Jr. Aminophospholipid molecular species asymmetry in the human erythrocyte plasma membrane [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1061: 15 - 25.
- [21] Seenaiha B, Ellingson J S. High-performance liquid-chromatographic method for determination of the metabolism of polyunsaturated molecular-species of phosphatidylserine labeled in the polar group[J]. *J Chromatogr B*, 1994, 660: 380 - 385.
- [22] Abidi S L, Mounts T L. Reversed-phase retention behavior of fluorescence labeled phospholipids in ammonium acetate buffers [J]. *J Liq Chromatogr*, 1994, 17(1): 105 - 122.
- [23] Larsen A, Mokastet E, Lundanes E, et al. Separation and identification of phosphatidylserine molecular species using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr B*, 2002, 774: 115 - 120.
- [24] Chen S, Kirschner G, Traldi P. Positive ion fast atom bombardment mass spectrometric analysis of the molecular species of glycerophosphatidylserine[J]. *Anal Biochem*, 1990, 191: 100 - 105.
- [25] Chen S, Benfenati E, Fanelli R, et al. Molecular species analysis of phospholipids by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry: Application of surface precipitation technique biomed[J]. *Environ Mass Spectrom*, 1989, 18(12): 1051 - 1056.
- [26] Ingvarsdn L, Michaelsen S, Sorensen H. Analysis of individual phospholipids by high-performance capillary electrophoresis [J]. *JAOCS*, 1994, 71(2): 183 - 188.
- [27] Tranchida P Q, Donato P, Dugo P, et al. Comprehensive chromatographic methods for the analysis of lipids[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(3): 191 - 205. ■

埃克森美孚化工新型薄膜技术有助于推动新一代混合动力和电动汽车的发展

埃克森美孚化工及埃克森美孚在日本的关联公司——东燃化学公司共同开发了锂离子电池用隔膜新技术, 可提高新一代混合动力和电动汽车的能效和价格可承受性。

该新型隔膜技术旨在显著提高锂离子电池的功率、安全性及可靠性, 有助于加快这种更小、更轻型电池在新一代更低排放车辆上的应用。

“新型隔膜技术的开发, 使锂离子电池能够满足混合动力和电动汽车的要求。埃克森美孚化工公司一直致力于运用新技术使新一代车辆更具能效和成本优势, 并减轻质量。”埃克森美孚化工公司高级副总裁吉姆哈锐思说, “我们目前正与业界领先的电池生产商合作, 积极拓展锂离子电

池在混合动力和电动汽车中的应用”。

隔膜是电池整体设计体系中一个不可或缺的材料, 它对电池整体性能而言是至关重要的。埃克森美孚化工公司的新技术平台基于其在锂离子电池隔膜领域 20 多年的丰富经验, 采用了先进的聚合物技术及生产工艺, 该技术使其能够针对电池生产商的特定需求提供量身定制的隔膜产品。

埃克森美孚化工公司于 2007 年 12 月 2—5 日在美国加利福尼亚州阿纳海姆(Anaheim)举行的第二十三届世界电动车会议暨展览会(EVS-23)期间展示该新型隔膜技术。(杜燕华)