

南美白对虾虾头中磷脂提取工艺的优化

边晶晶, 谢 晶, 陈舜胜 *

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘 要:以南美白对虾虾头为原料, 研究利用正己烷-异丙醇混合溶剂提取虾头中的磷脂。以磷脂相对提取率为评价指标, 在单因素试验的基础上进行正交试验, 确定优化提取工艺条件为: 正己烷与异丙醇的混合比为 3:1(V/V)、料液比 1:8(g/mL)、提取时间 2h、提取温度 40℃, 此条件下与经典氯仿-甲醇法比较, 相对提取率达 98.11%。磷脂丙酮不溶物含量为 85.4%, 乙醚不溶物含量为 0.2%, 两项指标均高于一级浓缩磷脂的标准。通过薄层色谱分离定性, 共有 5 种磷脂, 其中 4 种分别为磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、神经鞘磷脂和磷脂酰丝氨酸, 剩余一种尚未确证。正己烷-异丙醇提取法安全、有效, 为充分利用虾头等废弃物资源, 从中提取磷脂提供了新的方法。
关键词: 磷脂; 南美白对虾; 混合溶剂; 丙酮不溶物; 乙醚不溶物; 薄层色谱

Optimization of Extraction Process for Phospholipids from *Penaeus vannamei* Head

BIAN Jing-jing, XIE Jing, CHEN Shun-sheng*

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Phospholipids extraction from the heads of *Penaeus vannamei* with a mixture of *n*-hexane and isopropyl alcohol was optimized by an orthogonal array design based on one-factor-at-a-time experiments. The extraction efficiency of phospholipids was investigated with respect to four process conditions including *n*-hexane/isopropyl alcohol volume ratio, material/liquid ratio, extraction time and temperature. The optimal values of the process conditions were determined to be 3:1, 1:8, 2 h and 40 °C, respectively. Under these conditions, the extraction efficiency of phospholipids was 98.11% as calculated relative to the one obtained by the classic chloroform-methanol method. The insoluble residues of the phospholipids obtained by the optimized method in acetone and ether were 85.4% and 0.2%, respectively. Both indices exceeded the standard grade I of concentrated phospholipids. Five phospholipids were separated and characterized by thin-layer chromatography, including phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), sphingomyelin (SM) and an unknown compound. This study demonstrates that the hexane-isopropyl alcohol extraction method is safe and effective and provides a new method to extract phospholipids from *Penaeus vannamei* head and made full use of waste resources.

Key words: phospholipid; *Penaeus vannamei*; mixed solvents; insoluble residue in acetone; insoluble residue in ether; thin-layer chromatography

中图分类号: TS254

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0011-05

南美白对虾(*Penaeus vannamei* Boone, 1931), 学名凡纳滨对虾, 是当今世界养殖虾类产量最高的三大品种之一, 也是对虾中单产量最高的虾种^[1]。在我国, 南美白对虾养殖取得了较大的发展, 已成为对虾养殖区主要的养殖品种。目前我国南美白对虾主要以出口为主, 而出口产品又以虾仁为主, 因此在对虾的加工过程中会产生大量的虾头、虾壳等下脚料。据估算, 我国大陆每年剔除的虾头约 7 万吨, 其中大部分用于生产饲料或

肥料, 少量用于制备几丁质^[2]。因虾头中含有甲壳素、蛋白质、钙、镁、磷、卵磷脂等营养成分, 若不加以充分利用, 易造成环境污染和资源浪费^[3-4]。Miniadis-Meimaroglou 等^[5]测定出野生海虾的肌肉和头胸部的总脂肪含量分别占湿质量的 1.03% 和 2.36%, 头胸部磷脂中磷脂酰乙醇胺含量 24.7%、磷脂酰胆碱含量 47.2%。Shipar^[6]对红虾大脑脂质的物理化学性质及主要脂肪酸和毒性进行了分析, 红虾大脑脂质中自由脂肪酸的含量较

收稿日期: 2011-06-25

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目(2006BAD05A18); 上海市教育委员会重点学科建设项目(J50704)

作者简介: 边晶晶(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工。E-mail: xiaojj678@126.com

* 通信作者: 陈舜胜(1956—), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: sschen@shou.edu.cn

高,可以用于食品和制皂工业。

磷脂是一类含磷酸根脂质的总称,是脂肪的重要组成部分,是细胞膜的组成成分。磷脂主要由丙三醇、脂肪酸、磷酸、氨基醇(胆碱、乙酰胺、肌醇等)相连接组成,根据连接氨基醇的不同分为磷脂酰胆碱(卵磷脂,PC)、磷脂酰乙醇胺(脑磷脂,PE)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)等^[7]。磷脂具有抗衰老、降血脂、健脑抗疲劳、刺激细胞增生,促进血液循环等保健功能^[8]。磷脂作为乳化剂,具有脱模、分散、润湿、消泡、稀释等作用,已在食品、医药、化妆品、农业等行业得到广泛的应用^[9]。本实验对南美白对虾虾头中磷脂进行研究,为其综合利用、提高产品的附加值提供理论依据,从而促进南美白对虾养殖业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南美白对虾虾头 上海南汇果园菜市场;正己烷、异丙醇、钼酸钠、硫酸联铵、氧化锌、氯化钠、氢氧化钾(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE) 上海作舟科技有限公司;磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline, PC)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl sersine, PS)、神经鞘磷脂(sphingomyelin, SM) 美国 Sigma 公司;硅胶 G60 薄层层析板(10 × 20cm) 德国 Merck 公司。

1.2 仪器与设备

SX2-2.5-12 高温箱型电炉 上海博讯实业有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅 山东华鲁电热仪器有限公司;RB-52A 旋转蒸发器、SHZ-3 循环水式真空泵 上海青浦沪西仪器厂;DS-1 高速组织捣碎机 上海标本模型厂;DZF-6330 真空干燥箱 上海新苗医疗器械制造有限公司;UV-1800PC 紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 正己烷-异丙醇提取磷脂工艺流程

虾头→解冻破碎→正己烷-异丙醇提取→过滤→滤液→分液→上层液体→浓缩→冷丙酮提纯→沉淀(磷脂)

1.3.2 试验设计

采用正己烷和异丙醇的混合溶剂提取虾头中的磷脂。以正己烷与异丙醇的混合比、料液比、提取时间、提取温度作为影响提取效果的主要因素,以磷脂相对提取率作为衡量提取效果的评价指标。先对4个因素分别进行5水平单因素试验,最后进行正交试验,得到磷脂提取的优化工艺条件。

1.3.3 样品中磷脂组分的薄层色谱分析

按1.3.1节工艺流程得到的磷脂,用氯仿溶解,并

以磷脂标准品为对照,分别点样于硅胶 G60 薄层层析板上,在层析液(氯仿-乙酸乙酯-丙酮-异丙醇-乙醇-甲醇-水-乙酸=30:6:6:6:16:28:6:2, V/V)^[10]中展开约50min。喷显色剂进行定性分析。

磷脂标准品的配制:将各磷脂标准品分别溶解在氯仿溶液中配成2mg/mL溶液, -20℃保存。

磷脂特征显色剂配制参考文献^[11]方法。

1.3.4 样品的丙酮不溶物与乙醚不溶物测定

丙酮不溶物的测定依据 SN/T 0802.2—1999《进出口磷脂丙酮不溶物检验方法》;乙醚不溶物的测定依据 SN/T 0802.1—1999《进出口磷脂乙醚不溶物检验方法》。

1.4 磷脂相对提取率的计算

1.4.1 氯仿-甲醇提取法

虾头解冻后,称取5g,依照文献^[12]方法提取磷脂,收集氯仿层,经32℃真空浓缩,用冷丙酮洗涤至无色,收集沉淀。

1.4.2 磷脂含量的测定

钼蓝比色法测磷脂质量,参照 GB/T 5537—2008《粮油检验:磷脂含量的测定》^[13],灰化比色,从标准曲线上查出磷含量,根据公式算出磷脂含量。

1.4.3 相对提取率

$$\text{相对提取率}/\% = \frac{X_1}{X_2} \times 100$$

式中: X_1 为正己烷-异丙醇法提取的磷脂含量/(mg/g); X_2 为氯仿-甲醇法提取的磷脂含量/(mg/g)。

2 结果与分析

2.1 虾头磷脂提取条件的初步选择

2.1.1 正己烷与异丙醇混合比的选择

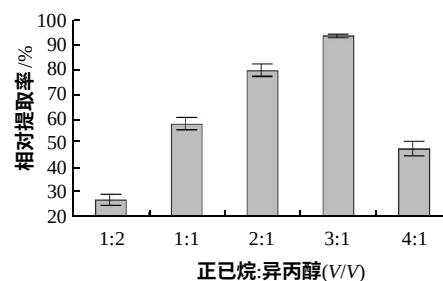


图1 正己烷与异丙醇的混合比对虾头磷脂提取的影响

Fig.1 Effect of *n*-hexane/isopropyl alcohol ratio on extraction rate of phospholipids from the heads of *Penaeus vannamei*

天然产物中,磷脂常常与蛋白质以脂蛋白复合物的形式存在,要充分地吧磷脂抽提出来,所用溶剂必须

能破坏这种复合物,并且对脂质有良好地溶解能力。因此在提取磷脂时常选用混合二元溶剂。正己烷作为非极性溶剂,适合游离态脂类的浸出。异丙醇作为非极性溶剂,能破坏脂类与非脂成分的结合。在提取温度40℃、料液比1:10(g/mL)、提取时间2h条件下,选择正己烷与异丙醇的混合比为1:2、1:1、2:1、3:1、4:1(V/V)进行单因素试验,提取结果如图1所示。

从图1可知,当正己烷的用量增加至75%,异丙醇降至25%时,提取效果最好。确定最佳提取剂混合比为3:1。

2.1.2 提取时间的选择

正己烷与异丙醇的混合比为3:1(V/V)、料液比1:10(g/mL)、提取温度40℃条件下,分别提取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5h,提取结果如图2所示。

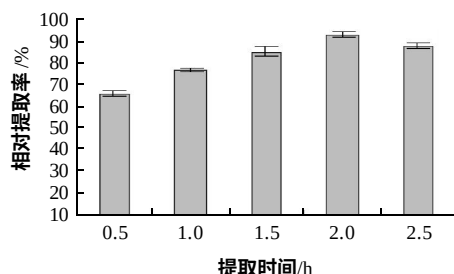


图2 提取时间对虾头磷脂提取的影响

Fig.2 Effect of extraction time on the extraction rate of phospholipids from the heads of *Penaeus vannamei*

提取时间越长,提取越彻底,但是提取2.5h提取率下降(图2),可能是时间越长磷脂被磷脂酶降解以及磷脂氧化逐渐明显^[14-15]。所以提取时间选择在2h以内。

2.1.3 料液比的选择

正己烷与异丙醇的混合比3:1(V/V)、提取温度40℃、提取时间2h条件下,分别在料液比1:4、1:6、1:8、1:10、1:12(g/mL)进行提取,结果如图3所示。

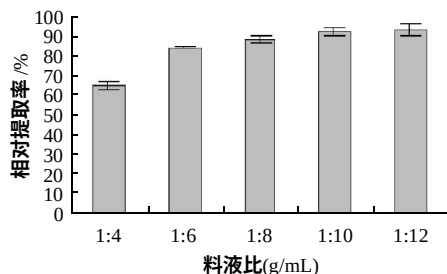


图3 料液比对虾头磷脂提取的影响

Fig.3 Effect of material/liquid ratio on the extraction rate of phospholipids from the heads of *Penaeus vannamei*

从图3可知,随着溶剂量的增多,磷脂相对提取率逐渐升高,但增加趋势逐渐变缓,提取率料液比1:10与1:12的提取率没有明显的差异,并且过量的提取剂会造成资源的浪费,增加回收工作量,所以本试验料液比选取1:10。

2.1.4 提取温度的选择

正己烷与异丙醇的混合比3:1、料液比1:10、提取时间2h条件下,分别在20、30、40、50、60℃进行提取,结果如图4所示。

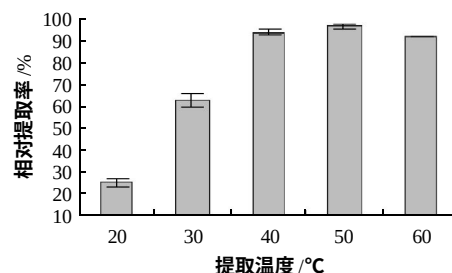


图4 温度对虾头磷脂提取的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on the extraction rate of phospholipids from the heads of *Penaeus vannamei*

从图4可知,在20~60℃之间磷脂相对提取率随着提取温度的升高先增加后降低。这是因为提高温度能提高分子的动能和扩散作用,但温度过高又会导致料液间出现汽化层,渐渐阻碍分子的扩散。该提取条件下,40℃和50℃对磷脂提取结果相差不大,需进行进一步的正交试验确定最佳提取温度。

2.2 虾头磷脂的提取条件的正交试验

根据单因素试验结果,选择正己烷和异丙醇作为混合提取剂,以提取温度、提取时间、料液比为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 设计正交试验,因素与水平见表1。

表1 虾头磷脂提取正交试验因素与水平

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the extraction conditions tested in orthogonal array design

水平	因素			
	A 正己烷和异丙醇混合比(V/V)	B 提取温度/℃	C 提取时间/h	D 料液比(g/mL)
1	1:1	40	1	1:6
2	2:1	45	1.5	1:8
3	3:1	50	2	1:10

由表2相对提取率极差分析可知,各因素对虾头磷脂含量的影响程度依次为A(提取剂混合比)>C(提取时间)>B(提取温度)>D(料液比),从极差值可看出提取溶剂的混合比对磷脂相对提取率的影响比其他3个因素大得多,因此从南美白对虾头中提取磷脂关键是选择合适的混合溶剂比例,通过异丙醇破坏磷脂与蛋白质的复合物以及正己烷的良好溶解脂质的能力最大化的将磷脂抽提出来。极差分析得到的最优水

平组合为 $A_3B_3C_3D_2$ 。对 $A_3B_3C_3D_2$ 组合进行验证实验, 得出虾头磷脂的相对提取率为 98.69%。从直观结果看, 第 7 组 $A_3B_1C_3D_2$ 磷脂提取率为 98.11%, 结果相差不大, 从节能的方面考虑选取 $A_3B_1C_3D_2$ 为最优工艺条件。

所以提取温度 40℃、提取时间 2h、料液比 1:8、正己烷与异丙醇比 3:1 为最佳提取工艺条件, 从每克虾头(湿质量)中提取得到 13.52mg 磷脂。

表 2 虾头磷脂提取正交试验设计及结果
Table 2 Orthogonal array design matrix and results

试验号	因素				相对提取率/%
	A	B	C	D	
1	1(1:1)	1(40℃)	1(1h)	1(1:6)	44.68
2	1	2(45℃)	2(1.5h)	2(1:8)	51.38
3	1	3(50℃)	3(2h)	3(1:10)	59.05
4	2(2:1)	1	2	3	79.90
5	2	2	3	1	92.67
6	2	3	1	2	86.93
7	3(3:1)	1	3	2	98.11
8	3	2	1	3	89.76
9	3	3	2	1	97.46
K_1	155.11	222.69	221.37	234.81	
K_2	259.50	233.81	228.74	236.42	
K_3	285.33	243.44	249.83	228.71	
k_1	51.70	74.23	73.39	78.27	
k_2	86.50	77.94	76.25	78.81	
k_3	95.11	81.15	83.27	76.24	
R	43.41	6.92	9.48	2.57	
主次顺序	$A > C > B > D$				
优水平	A_3	B_3	C_3	D_2	
最优组合	$A_3B_3C_3D_2$				

2.3 虾头磷脂组分分析

将磷脂标准品与南美白对虾虾头磷脂点在同一块硅胶板上展层显色后, 将样品与各标准品在薄层板上所得斑点的比移值(原点至斑点中心的距离与原点至溶剂前沿的距离的比值)进行对照比较, 与标准品具有相同比移值的斑点即为该磷脂。图 5 为南美白对虾头中提取的磷脂与磷脂标准品的薄层色谱图。从图 5 得知, 南美白对虾头磷脂含有五种磷脂, 磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、神经鞘磷脂、磷脂酰丝氨酸和一种未知磷脂组分, 此组分尚需通过磷脂标准品进一步鉴定。南美白对虾头磷脂组分中磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱所对应的斑点较大, 说明南美白对虾头中磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱含量较多, 这与野生海虾(*Penaeus kerathurus*)头胸部的磷脂^[5]研究结果一致。



1. 磷脂酰乙醇胺(PE); 2. 磷脂酰胆碱(PC); 3. 神经鞘磷脂(SM); 4. 南美白对虾头磷脂; 5. 磷脂酰丝氨酸(PS)。

图 5 磷脂薄层色谱图

Fig.5 Thin-layer chromatogram of phospholipids extracted from the heads of *Penaeus vannamei*

2.4 正己烷-异丙醇提取磷脂的效果

磷脂不溶于丙酮, 可完全溶解于乙醚^[16], 所以丙酮不溶物和乙醚不溶物是衡量磷脂的很重要的指标, 根据进出口磷脂丙酮、乙醚不溶物检验方法测得上述混合提取剂提取的磷脂丙酮不溶物含量为 85.4%, 乙醚不溶物含量为 0.2%。两项指标均高于一级浓缩磷脂标准(一级浓缩磷脂丙酮不溶物含量 $\geq 65\%$, 乙醚不溶物含量 $\leq 0.3\%$), 低于粉状磷脂丙酮不溶物含量标准, 高于粉状磷脂乙醚不溶物含量标准(粉末磷脂丙酮不溶物含量 $\geq 95\%$, 乙醚不溶物含量 $\leq 0.5\%$)。

用氯仿和甲醇的混合溶剂提取南美白对虾头中磷脂, 三次平行实验结果分别为 13.91、13.67、13.75mg/g, 平均值为 13.78mg/g, 相对标准偏差为 0.89%。正己烷与异丙醇比例为 3:1(V/V)、料液比 1:8(g/mL)、40℃的条件下提取 2h, 每克虾头(湿质量)中能得到 13.52mg 磷脂, 并且与经典氯仿甲醇法提取得到 13.78mg 磷脂的结果比较, 相对提取率达 98.11%。

3 结 论

本实验确定优化提取工艺条件为正己烷与异丙醇的混合比为 3:1(V/V)、料液比 1:8(g/mL)、提取时间 2h、提取温度 40℃, 此条件下与经典氯仿-甲醇法比较, 相对提取率达 98.11%。磷脂丙酮不溶物含量为 85.4%, 乙醚不溶物含量为 0.2%, 两项指标均高于一级浓缩磷脂的标准。通过薄层色谱分离并通过磷脂特征显色剂显色, 确定南美白对虾头中共有五种磷脂, 根据磷脂标准品已确定其中四种分别为磷脂酰乙醇胺, 磷脂酰胆碱, 神经鞘磷脂和丝氨酸酰磷脂, 剩余一种尚未确证, 还需通过标准品进行鉴定。氯仿/甲醇法虽然是水产类新鲜样品脂类提取常用的方法, 但近年来发现氯仿是一种可疑的致癌物, 甲醇能损害视神经, 对人体的危害较大。本实验采用正己烷/异丙醇提取法更为安全、有效, 为充分利用虾头等废弃物资源, 从中提取磷脂提供了新的方法。

参考文献：

- [1] 迟淑艳, 杨奇慧, 周歧存, 等. 南美白对虾幼体和仔虾淀粉酶和脂肪酶活力的研究[J]. 水产科学, 2005, 24(4): 4-5.
- [2] COWARD-KELLY G, AGBOGBO F K, HOLTZAPPLE M T. Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(13): 1515-1520.
- [3] CAO Wenhong, ZHANG Chaohua, HONG Pengzhi, et al. Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate[J]. Food Science and Technology, 2009, 42(1): 244-249.
- [4] GIERARED F, SUMAYA-MARTINEZ M T, LAROQUE D, et al. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(11): 1486-1491.
- [5] MINIADIS-MEIMAROGLOU S, KORA L, SINANOGLU V J. Isolation and identification of phospholipid molecular species in wild marine shrimp *Penaeus kerathurus* muscle and cephalothorax[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2008, 152(2): 104-112.
- [6] SHIPAR M A H. Physical and chemical characteristics, major fatty acids, antimicrobial activity and toxicity analysis of red shrimp (*Metapenaeus brevicornis*) brain lipid[J]. Food Chemistry, 2007, 102(3): 649-655.
- [7] 王道营, 徐幸莲, 徐为. 磷脂的提取与分析检测技术[J]. 粮油加工与食品机械, 2005(7): 51-54.
- [8] 汪一红, 胡纱纱, 王承明, 等. 响应曲面法优化棉籽毛油中磷脂的分离工艺研究[J]. 粮油加工, 2009(2): 47-52.
- [9] 路英军, 杨福明. 大豆磷脂的应用及展望[J]. 科技信息, 2007(18): 295; 428.
- [10] WEERHEIM A M, KOLB A M, STURK A, et al. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography[J]. Analytical Biochemistry, 2002, 302(2): 191-198.
- [11] GOSWAMI S K, FREY C F. Spray detection of phospholipids on thin-layer chromatograms[J]. Journal of Lipid Research, 1971(12): 509-510.
- [12] FOLCH J, LEES M, SLOANE S G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. Journal Biological Chemistry, 1957, 226: 497-509.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T5537 — 2008 粮油检验: 磷脂含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [14] 安红, 宋伟明, 张宏波. 磷脂化学及应用技术[M]. 北京: 中国计量出版社, 2006.
- [15] 杨文鸽, 姜永江, 桑卫国. 正交试验优化马面鲀 *Navodon septentrionalis* 卵巢磷脂的提取条件[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2001, 20(1): 35-37.
- [16] 孙万成, 蒋笃孝. 溶血磷脂的理化性质研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 61-63; 66.