หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำฟอสฟาทิดิลโคลีนจากเลซิตินดิบที่ได้จากถั่วเหลืองให้บริสุทธิ์
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวสิริลักษณ์ พจนพรพันธุ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. กรณ์กนก อายุสุข
	รศ.ดร. คณิต กฤษณังกูร
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวเคมี
สายวิชา	เทคโนโลยีชีวเคมี
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
พ.ศ.	2555

บทคัดย่อ

ฟอสฟาทิดิลโคลีน (PC) เป็นฟอสโฟลิปิดสำคัญ ที่นำมาใช้ประโยชน์ด้านสุขภาพและเภสัชกรรม เช่น ช่วยเรื่องความจำ และลดระดับคอเลสเตอรอล และยังใช้เป็นสารห่อหุ้มยา และสารออกฤทธิ์ที่สำคัญต่างๆ เลซิตินดิบเป็นผลพลอยได้จากโรงงานรีไฟน์น้ำมันถั่วเหลือง มี PC เป็นองค์ประกอบเพียง 22% ที่เหลือประกอบด้วยน้ำมัน 46% และฟอสโฟลิปิดชนิดอื่นๆ ได้แก่ ฟอสฟาทิดิลอิโนซิทอล (PI) และฟอสฟาทิดิลเอทาโนลามีน (PE) รวมกัน 32% ในกรณีที่จะนำ PC ไปใช้ในทางเภสัชกรรมนั้น ต้องใช้ PC ที่มีความบริสุทธิ์สูง (85-99%) ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการทำให้ PC บริสุทธิ์ โดยศึกษาความเข้มข้นของเอทานอล (85%, 90%, 95% และเอทานอลบริสุทธิ์) อัตราส่วนเลซิตินดิบต่อเอทานอล (1:1, 1:2 และ 1:3 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)) และอุณหภูมิ (อุณหภูมิห้อง (~ 26°C), 40, 50 และ 60°C) ในการแยกส่วนเลซิตินดิบจากถั่วเหลืองเพื่อให้ได้ส่วนสกัดที่มี PC สูง และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณองค์ประกอบในเลซิตินของถั่วเหลืองด้วยโครมาโต-กราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเฟสปกติ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเลซิตินดิบจากถั่วเหลืองคืออัตราส่วนเลซิตินดิบต่อเอทานอลบริสุทธิ์เท่ากับ 1:1 สกัดที่อุณหภูมิ 40°C ได้ความบริสุทธิ์และผลผลิตของ PC เท่ากับ 63.97% และ 36.10% ตามลำดับ

จากนั้นนำสารสกัดเอทานอลที่มี PC บริสุทธิ์ 63.97% มาทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธีคือ (1) การเพิ่มความมีขั้วของสารสกัดเอทานอลโดยการเติมน้ำที่อัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ต่อสารสกัดเอทานอลเท่ากับ 1 (โดยปริมาตร) และวิธีที่ (2) การทำให้ PE ในสารสกัดเอทานอลอยู่ในรูปของเกลือแคลเซียม ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์หรือแคลเซียมคลอไรด์ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการทำให้ PC บริสุทธิ์ด้วยอัตราส่วนน้ำต่อสารสกัดเอทานอลเท่ากับ 0.2:1 ได้ PC บริสุทธิ์ 89.14% ที่ผลผลิตของ PC เท่ากับ 36.17% ส่วนวิธีที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมในการทำให้ PC

บริสุทธิ์ได้แก่ การเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 1.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ความบริสุทธิ์ของ PC เท่ากับ 86.14% และผลผลิตของ PC เท่ากับ 13.04% ขณะที่แคลเซียมคลอไรด์ไม่มีประสิทธิภาพในการทำให้ PC บริสุทธิ์ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์กับการเติมน้ำ พบว่าการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์นั้นสามารถลดปริมาณ PE ได้มากกว่า แต่สภาวะที่เป็นเบสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ PC ทำให้ได้ผลผลิตของ PC ต่ำกว่าวิธีใช้น้ำ ดังนั้นในการจะเลือกใช้วิธีการใดในการทำให้ PC บริสุทธิ์ในระดับขนาดที่ใหญ่ขึ้นจึงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความบริสุทธิ์ที่ต้องการ เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ รวมถึงต้นทุนการผลิต เป็นต้น

คำสำคัญ: การทำให้บริสุทธิ์/ ฟอสฟาทิดิลโคลีน/ เลซิตินดิบจากถั่วเหลือง

Thesis Title	Purification of phosphatidylcholine from crude soybean lecithin
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Siriluck Pojjanapornpan
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Kornkanok Aryusuk
	Assoc. Prof. Dr. Kanit Krisnangkura
Program	Master of Science
Field of Study	Biochemical Technology
Department	Biochemical Technology
Faculty	School of Bioresources and Technology
B. E.	2555

Abstract

Phosphatidylcholine (PC) is an important phospholipid that is widely used in supplemental and pharmaceutical applications due to its intrinsic health benefits such as memory enhancement and cholesterol reduction. It is also applied for encapsulation of drugs and active ingredients. Crude soybean lecithin (CSL), a by-product of soybean oil refining, contains only ~ 22% of PC with 46% oil and 32% other phospholipids (phosphatidylinositol; PI and phosphatidylethanolamine; PE). In order to be used in pharmaceutical products, 85-99% purity of PC is required. Thus, in this research, different percentages (85%, 90%, 95% and absolute) of ethanol were used for fractionation of CSL to obtain PC-enriched fractions. Effects of CSL to ethanol ratio (1:1, 1:2 and 1:3 (w/ v)) and temperature (ambient (~ 26^{o}C), 40, 50 and 60^{o}C) on PC enrichment were studied. Normal phase high performance liquid chromatography (NP-HPLC) was used for identification and quantification of the soybean lecithin compositions. It was found that the optimum condition for extraction of PC from CSL was 1:1 of absolute ethanol to CSL at 40^{o}C. The purity and yield of PC were 63.97% and 36.10%, respectively.

PC was further purified from the 63.97% purity PC-enriched fraction by two different methods (1) increasing the polarity by addition of different ratios of water (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5) to 1 (v/v) of PC enriched fraction and (2) formation of PE-calcium salt in the PC-enriched fraction by addition of different ratios of calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$) or calcium chloride ($CaCl_2$). The result of method (1) showed that 89.14% purity with 36.17% yield of PC was obtained by using

0.2: 1 (v/v) of water to PC-enriched fraction. In method (2), one percent of $Ca(OH)_2$ added to PC-enriched fraction gave the highest PC purity of 86.14% with 13.04% yield while calcium chloride was not effective for enrichment of PC. Comparing PC yield between method (1) and method (2), the PC yield of method (1) was higher than method (2) as well as PE content. It might be caused by the hydrolysis of PC by $Ca(OH)_2$. Thus, the selection of the method for purification of PC on a large-scale production may depend on various factors such as required purity, yield of the final product and the separation cost.

Keywords: Crude soybean lecithin/ Phosphatidylcholine/ Purification