

高效液相色谱法检测蛋黄卵磷脂中的磷脂酰胆碱

刘静波¹,常皓¹,王二雷¹,宫新统¹,姜轶群²

(1. 吉林大学 军需科技学院营养与功能食品研究室,长春 130062; 2. 吉林大学 生命科学学院,长春 130021)

摘要:为建立一种准确、简便的蛋黄卵磷脂中磷脂酰胆碱的检测方法,采用高效液相色谱-紫外检测法对其进行了研究。SHIMADZU LC-2010 高效液相色谱仪配备 AGILENT ZORBAX RX-SIL 型硅胶柱,在 200 nm 下对磷脂酰胆碱进行检测,流动相采用简单的甲醇/乙酸二元体系,加入的乙酸溶液改善了磷脂酰胆碱的峰形,有效抑制了严重的拖尾现象。流速较低,为 0.5 mL/min,减少了流动相的使用量。采用外标法定量,标准曲线线性范围较宽,为 10 ~ 160 μg/mL。检出限为 0.5904 μg/mL,定量限为 1.9680 μg/mL。经方法学验证性试验,证明本方法精密度、稳定性良好,准确度较高。

关键词:食品加工技术;高效液相色谱;磷脂酰胆碱;卵磷脂

中图分类号:TS253.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-5497(2012)Sup. 1-0449-05

Phosphatidylcholine of egg yolk lecithin detection using high performance liquid chromatography (HPLC)

LIU Jing-bo¹, CHANG Hao¹, WANG Er-lei¹, GONG Xin-tong¹, JIANG Yi-qun²

(1. Laboratory of Nutrition and Functional Food, College of Quartermaster Technology, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: In order to establish an accurate, simple detection method of phosphatidylcholine of egg yolk lecithin, this research paid attention to high performance liquid chromatography (HPLC)-ultraviolet (UV) detector method. SHIMADZU LC-2010 HPLC equipped with AGILENT ZORBAX RX-SIL silica gel column was used. Detection wave was 200 nm. Simpler binary system of methanol and ethanoic acid was used as mobile phase, and added ethanoic acid improved phosphatidylcholine chromatograph peak shape, tail formation was inhibited efficiently. Flow rate was 0.5 mL/min. It was relatively small and reduced mobile phase usage. External standardization quantization was used, and the standard curve linear range was wide and it was 10 ~ 160 μg/mL. Detection limit was 0.5904 μg/mL, and quantitative limit was 1.9680 μg/mL. The validation test proved the proposed method is characterized by high precision and good stability.

Key words: food processing technology; high performance liquid chromatography (HPLC); phosphatidylcholine; lecithin

收稿日期:2011-11-22.

基金项目:吉林省科技厅农业重点基金项目(20050202-3).

作者简介:刘静波(1962-),女,教授,博士生导师. 研究方向:营养与功能性食品. E-mail:ljb168@sohu.com

通信作者:姜轶群(1982-),女,讲师,博士. 研究方向:生物化学与分子生物学. E-mail:jiangyiq@jlu.edu.cn

卵磷脂是生物膜的重要成分,具有延缓衰老,调节脂肪代谢,预防心脑血管疾病,提高大脑活力,提高免疫力等作用^[1-2],广泛应用于食品、医药、化妆品、饲料、涂料、农业生产等领域^[3-5]。磷脂酰胆碱是卵磷脂中最重要的功能成分。目前对于大豆卵磷脂的研究较多,蛋黄来源的卵磷脂近年来才由于其含量高、氧化稳定性较好而逐渐引起人们的重视。蛋黄卵磷脂的检测方法主要有丙酮不溶物法、测磷法和紫外分光光度法,但都不能准确地检测出其主要功能成分磷脂酰胆碱的含量。

高效液相色谱法是目前分离磷脂各组分、检测磷脂酰胆碱含量最为广泛研究和应用的方法。常用流动相主要有正己烷/异丙醇/冰乙酸^[6]、氯仿/甲醇/水/乙酸^[7-8]、乙腈/甲醇/水^[9]、乙腈/甲醇/磷酸^[10]等三元甚至多元体系,比较复杂,流速大多为 1 mL/min。磷脂酰胆碱包括许多不同的分子种类,液相分析时常出现峰延展、拖尾现象,甚至会将磷脂酰胆碱组分分出好几个峰,给定量研究带来了困难。从磷脂酰胆碱标准曲线的线性范围来看,使用紫外检测器时其最低限体积浓度大多为几百微克每毫升,所需标准品量较大。蒸发光散射检测器是一种通用型检测器^[11],检测灵敏,且流动相选择范围广,但价格昂贵^[12]。因此本文采用了高效液相色谱-紫外检测法,旨在建立一种准确、简便的蛋黄卵磷脂磷脂酰胆碱的测定方法。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

磷脂酰胆碱标准品(Phosphatidylcholine, PC):Sigma-Aldrich 公司,美国;蛋黄卵磷脂样品(自制);甲醇(色谱纯)、乙酸(分析纯):北京化工厂生产;纯净水:杭州娃哈哈集团有限公司生产。

1.2 仪器与设备

AG204 电子分析天平: METTLER TOLEDO 公司,瑞士;LC-2010 高效液相色谱仪: SHIMADZU 公司,日本。

1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX RX-SIL (Agilent, 美国);等度洗脱;流动相:甲醇/0.2 mol 乙酸溶液(96.25/3.75);柱温:30 °C;检测器:紫外检测器;检测波长:200 nm;进样量:15 μL;流速:0.5 mL/

min。

1.3.2 PC 标准储备液的配制

精确称取 PC 标准品 0.01 g,用色谱纯甲醇定容于 25 mL 容量瓶中,配成 PC 为 0.4 mg/mL 的标准储备液,摇匀,待用。

1.3.3 样品液的配制

精确称取卵磷脂样品 0.005 g,用色谱纯甲醇定容于 25 mL 容量瓶中,摇匀,待测。

1.3.4 PC 紫外检测波长的确定

根据文献记录^[13-14],磷脂酰胆碱在不同溶液中的紫外最大吸收波长在 210 nm 以内,尤其集中在 204~206 nm。为避免高效液相与紫外检测器系统与独立的紫外检测器效果不同,本文摒弃预先用独立的紫外检测器扫描磷脂酰胆碱的最大吸收波长的做法,而直接根据磷脂酰胆碱标准品响应值的大小来筛选其最大吸收波长。198~206 nm 范围内,在每个纳米波长下测定其峰面积和峰高响应值,结果显示在 200 nm 下磷脂酰胆碱峰面积和峰高响应值都达到最大,如图 1、图 2 所示,因此确定磷脂酰胆碱的检测波长为 200 nm。

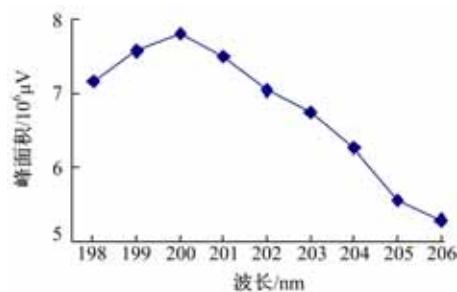


图 1 不同波长下 PC 峰面积的响应值

Fig. 1 Peak area of PC under different waves

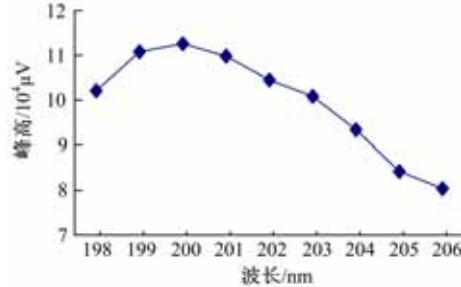


图 2 不同波长对 PC 峰高的响应值

Fig. 2 Peak height of PC under different waves

1.3.5 分析柱与流动相的选择

C₁₈ 色谱柱是应用最为广泛的液相分析柱之一^[15],本文以甲醇/乙腈/水体系作为流动相分离检测磷脂酰胆碱,结果磷脂酰胆碱标准品被分离出好几个峰,不利于定量。后将安捷伦 ZORBAX

RX-SIL 硅胶柱作为分析柱,首先考察正己烷-异丙醇体系作为流动相,标准品不出峰,后改为甲醇作为流动相,标准品出峰,但由于其具有许多不同的分子种类,因此出现严重的拖尾现象。向甲醇中尝试加入一定量的 0.2 mol/L 的乙酸溶液后,可改善峰形。而乙酸的量太小时,峰形改善不明显,乙酸的量太大时,虽峰形明显改善,但发生基线向上漂移现象,因此最后选择加入 3.75% 的乙酸水溶液,即甲醇与乙酸溶液的体积比为 96.25 : 3.75,此时峰形与基线的效果最理想。如图 3 所示。

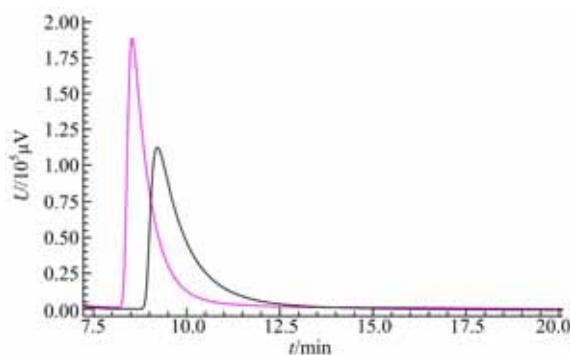


图 3 甲醇与甲醇加乙酸体系流动相的 PC 标准品峰形对比

Fig. 3 PC peak shape contrast of methanol and methanol with ethanoic acid as mobile phase

1.3.6 流动相流速的选择

考察了流速为 0.4~1.0 mL/min 范围内磷脂酰胆碱的出峰情况。结果表明,流速的大小对峰形无影响,只对出峰快慢有影响,流速大则出峰快,流速小则出峰慢。选择较小的流速 0.5 mL/min 作为技术参数,既节省了溶剂使用成本,且保证了出峰时间较快(14 min 以内)。

1.3.7 卵磷脂标准曲线的制作

溶剂空白以及 PC 标准品的色谱图如图 4、图 5 所示。通过对比可见,图 5 中的峰 5 为 PC 标准品色谱峰。以峰面积为指标,采用外标法测定卵磷脂样品中磷脂酰胆碱含量。准确吸取 400 μg/mL 的磷脂酰胆碱标准溶液 0.25、1、2、3、4 mL,分别置于 5 个 10 mL 的容量瓶中,并用色谱纯甲醇定容,得到体积浓度分别为 10、40、80、120、160 μg/mL 的磷脂酰胆碱标准系列溶液。分别将其在已确定的色谱条件下进样,测定峰面积。以磷脂酰胆碱标准系列溶液体积浓度为横坐标,以响应的峰面积值为纵坐标,绘制峰面积-体积浓度曲线,如图 6 所示,得到的线性回归方程为 $y =$

$17996x - 53820$, 相关系数 R 值为 0.9986。

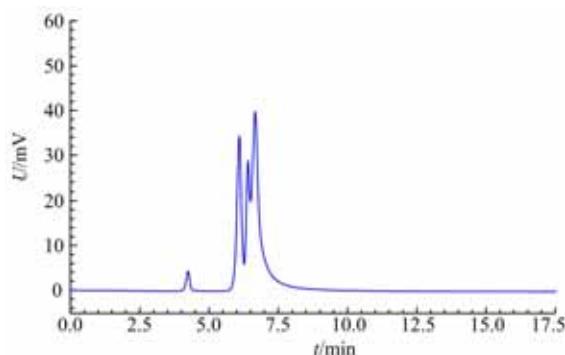


图 4 甲醇空白色谱图

Fig. 4 Chromatogram of methanol as blank

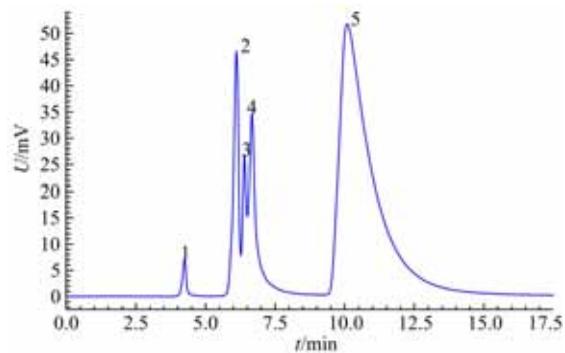


图 5 PC 标准品色谱图

Fig. 5 Chromatogram of PC standard

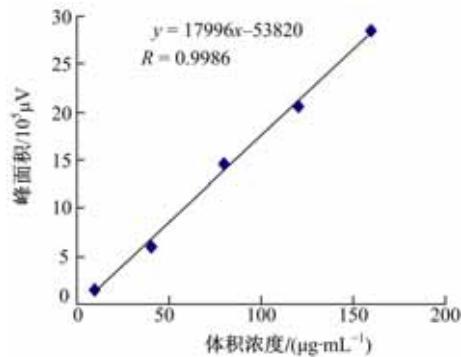


图 6 PC 定量标准曲线

Fig. 6 Quantitative standard curve of PC

1.3.8 样品测定

取 3 份自提的蛋黄卵磷脂样品,测定结果取平均值。

1.3.9 方法学验证性试验及检出限和定量限的计算

精密度考察:将 120 μg/mL 的磷脂酰胆碱标准溶液重复进样 6 次,结果分别为 1973146, 1952301, 1941246, 1956948, 1987580, 1999090, 统计分析, RSD 值为 1.1269%。

稳定性考察:将 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的磷脂酰胆碱标准溶液分别在 0、2、4、8、12 h 进样,峰面积分别为 2052626, 2146596, 2006059, 1987580, 2113157, 2029689, 统计分析, RSD 值为 3.0261%。

准确度考察:进行加标回收率试验,精确吸取 3 份各 0.2 mL 已测卵磷脂样品液,置于 6 个 10 mL 的容量瓶中,向其中分别加入 80、120、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 磷脂酰胆碱标准液各 6 mL,用色谱纯甲醇定容,进样检测,回收率为 93.5701% ~ 104.1224%, 平均回收率为 97.5989%, 如表 1 所示。

表 1 加标回收率试验结果

Table 1 Result of recovery

序号	峰面积/ μV	实际体积浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	理论体积浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	平均回收率/%
1	1205140	69.5032	73.0811	95.1042	
2	1767990	101.0832	97.0811	104.1224	97.5989
3	1985653	113.2957	121.0811	93.5701	

2 结果与分析

蛋黄卵磷脂样品的液相色谱图如图 7 所示。峰 8 为磷脂酰胆碱 PC 的色谱峰。记录 3 份样品溶液磷脂酰胆碱的峰面积,取平均值,根据线性回归方程 $y = 17996x - 53820$ 计算出样品溶液磷脂酰胆碱体积浓度。25 mL 的样品溶液磷脂酰胆碱体积浓度为 125.4057 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 则蛋黄卵磷脂中磷脂酰胆碱的质量分数为 62.7029%。

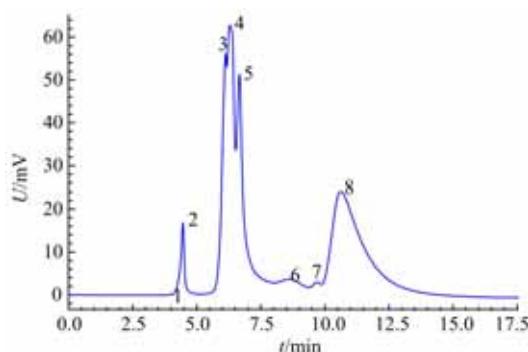


图 7 蛋黄卵磷脂样品的液相色谱图

Fig. 7 Chromatography of egg yolk lecithin

3 结果与讨论

建立了一种高效液相色谱与紫外检测器联用的方法可对蛋黄卵磷脂中的磷脂酰胆碱进行定性和定量测定。该方法流动相采用甲醇/乙酸二元体系,加入的乙酸溶液改善了磷脂酰胆碱的峰形,有

检出限(LOD)和定量限(LOQ)为

$$\text{LOD} = 3 \text{ S/N}$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ S/N}$$

检出限为 3 倍信噪比,定量限为 10 倍信噪比。选取一段时间计算噪音峰面积平均值,测定 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 磷脂酰胆碱标准品的峰面积,通过此时的信噪比换算成 3 倍和 10 倍信噪比时的磷脂酰胆碱标准品体积浓度,即分别为检出限和定量限。测得检出限为 0.5904 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 定量限为 1.9680 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 如表 4 所示。

效抑制了拖尾现象,且流速较低,为 0.5 mL/min , 在保证出峰时间较快的前提下(14 min 以内)减少了流动相溶剂的使用量,降低了成本。在高效液相-紫外检测器系统环境中确定了磷脂酰胆碱的最大吸收波长为 200 nm, 磷脂酰胆碱标准曲线线性范围为 10~160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。经方法学验证性试验,证明本方法精密度、稳定性良好,准确度较高。

参考文献:

- [1] Anton M, Nau F, Nys Y. 禽蛋的生物活性成分及其潜在应用价值[J]. 中国家禽, 2007, 29(9): 45-48.
- Anton M, Nau F, Nys Y. Egg bioactive components and its potential application value[J]. China Poultry, 2007, 29(9): 45-48.
- [2] 谭利伟, 麻丽坤, 赵进, 等. 蛋黄卵磷脂的应用研究进展[J]. 中国家禽, 2005, 27(21): 35-36.
- Tan Li-wei, Ma Li-kun, Zhao Jin, et al. Egg yolk lecithin's application research progression[J]. China Poultry, 2005, 27(21): 35-36.
- [3] Rossi Margherita. Bioactive Egg Compounds : Use of Lecithin and Lecithin Fractions[M]. Germany, Berlin: Springer-verlag, 2007.
- [4] Cirri M, Maestrelli F, Mennini N, et al. Influence of the preparation method on the physical-chemical properties of ketoprofen-cyclodextrin-phosphatidylcholine ternary systems[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 50: 690-694.
- [5] 马全红, 郝晓帧, 旷英姿, 等. 表面活性剂对茶多酚脂

- 质体的制备及透皮性能的影响[J].东南大学学报,2007,37(1):132-135.
- Ma Quan-hong, Hao Xiao-zhen, Kuang Ying-zi, et al. Effect of surfactant on preparation and percutaneous absorption of tea polyphenol liposomes[J]. Journal of Southeast University, 2007,37 (1):132-135.
- [6] 杨海峰,赵志辉,顾赛红,等.大豆磷脂中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇的检测研究[J].中国饲料,2010(6):41-43.
- Yang Hai-feng, Zhao Zhi-hui, Gu Sai-hong, et al. Soybean phospholipid phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol detection research [J]. Chain Forage, 2010(6):41-43.
- [7] Palacios Luz E, Wang Tong. Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization[J]. Jaocs, 2005, 82 (8): 571-578.
- [8] Palacios Luz E, Wang Tong. Extraction of egg-yolk lecithin[J]. Jaocs, 2005, 82(8):565-569.
- [9] 吴丽芹,邵荣,云志.高效液相色谱测定大豆卵磷脂中磷脂酰胆碱的含量[J].化工时刊,2008,22(11):35-37.
- Wu Li-qin,Shao Rong,Yun Zhi. Analysis of phosphatidylcholine in soy lecithins by HPLC[J]. Chemical Industry Times,2008,22(11):35-37.
- [10] 关明,王岩,陈坚.高效液相色谱法测定卵磷脂中磷脂酰胆碱的含量[J].化学与生物工程,2005(10):54-56.
- Guan Ming, Wang Yan, Chen Jian. High performance liquid chromatographic method for the determination of phosphatidylcholine of lecithin[J]. Chemistry & Bioengineering, 2005(10):54-56.
- [11] 龚雁,王巧娥,杨屹,等.高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定蛋黄卵磷脂的含量[J].色谱,2006,24(4):373-375.
- Gong Yan, Wang Qiao-e, Yang Yi, et al. Determination of egg-yolk phosphatidylcholine by normal-phase high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2006, 24(4):373-375.
- [12] 汪风云,周海凡,巩彪. HPLC 法测定保健品卵磷脂胶囊中卵磷脂的含量[J].河南预防医学杂志,2009,20 (1):17-18.
- Wang Feng-yun, Zhou Hai-fan, Gong Biao. Determination of phosphatidylcholine in health food by HPLC [J]. Henan J PrevMed, 2009,20(1):17-18.
- [13] 王剑霞,黄光亮,陈禧翎. HPLC 同时测定大豆磷脂中磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰胆碱含量[J].中国现代应用药学,2011,28(6):564-565.
- Wang Jian-xia,Huang Guang-liang,Chen Xi-ling. Determination of Dhospatidylcholine and lysophosphatidylcholine in soybean phospholipids by HPLC[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy,2011,28(6):564-565.
- [14] 宫新统,林松毅,刘静波. HPLC 在高纯度蛋黄卵磷脂提取技术中的应用研究[J].食品科学,2008,29(12):242-243.
- Gong Xin-tong,Lin Song-yi,Lin Jing-bo. Application of high performance liquid chromatography(HPLC) determination in optimization of extraction technology of lecithin from egg yolk[J]. Food Science, 2008, 29 (12): 242-243.
- [15] 崔莹.高效液相色谱分析磷脂研究进展[J].中国测试技术, 2007,33(1):60-61.
- Cui Ying. Advance of phospholipids analysis by high performance liquid chromatography[J]. China Measurement Technology , 2007,33(1):60-61.