

# 卵磷脂类保健食品中 PE、PC 的高效液相色谱测定

崔 蓉 王洪玮 许 辉 赵京辉  
(北京大学公共卫生学院,北京 100083)

**摘 要:**为准确快速地对卵磷脂保健食品中有效成分进行定量分析,我们建立了卵磷脂保健食品中磷脂主要组分磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)的高效液相色谱测定方法。方法的日间精密度为 5.4%~9.0%;PE、PC 的加标回收率分别为 83.0%~105.6%和 81.3%~86.0%,均可满足卫生分析的要求。对 5 种卵磷脂保健食品中的 PC、PE 的含量进行了测定,PC、PE 的含量分别为 15.2%~24.2%和 3.1%~6.1%。方法的样品前处理方法简单,且检测灵敏度高,分析速度快,适于在国内推广使用。

**关键词:**色谱法,高压液相;磷脂酰胆碱类;磷脂酰乙醇胺;营养保健食品

**中图分类号:**R15;TS218 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2002)04-000-0

国内的保健食品市场上有许多卵磷脂保健食品,但对卵磷脂保健食品中磷脂主要组分测定方法的报道较少,国内仅查到两篇文章应用薄层色谱法测定大豆磷脂。<sup>[1,2]</sup>国外对于磷脂分析测定的报导较多,<sup>[3~6]</sup>但多为生物膜中磷脂的测定。

我们对卵磷脂保健食品中磷脂主要组分磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)的高效液相色谱测定方法进行了研究,在选定的实验条件下,可准确快速地完成上述 2 种物质的定量测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Varian 5000 液相色谱仪,UV-100 紫外分光检测器

PC 含量为 99%,德国 Merck 公司食品;PE 含量为近似 98%,含 60%缩醛磷脂(PL),美国 Sigma 公司食品;磷脂酰丝氨酸(PS)含量 ≥99%,美国 Sigma 公司食品。

乙腈、甲醇为色谱纯;氯仿为保证试剂;85%磷酸、正己烷、异丙醇、丙酮、二氯甲烷均为国产分析纯。

### 1.2 标准溶液的配制

准确量取 PC 250 μL,准确称取 PE 0.0250 g 分别置于 5 mL 容量瓶中,以 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(3:2,体积分数)溶解,定容至刻度,制成储备液,浓度分别为 5.0 mg/mL 和 5.0 mg/mL, -20℃ 冰箱保存。使用时取一定量的储备液, N<sub>2</sub> 吹干,以正己烷-异丙醇(3:1,体积分数)溶解、定容至一定体积,配制应用液。

### 1.3 色谱条件

色谱柱为 MicroPak Si-5 硅胶柱(4.0 mm ×15.0

cm);柱温:室温;流动相:乙腈-甲醇-85%磷酸(100:10:0.6,体积分数),流速 1.0 mL/min;紫外检测器,检测波长:203 nm;进样量:10 μL(定量进样管)。

### 1.4 试样处理

准确称取约 30 mg 试样于 10 mL 带盖离心管中,加入 8.0 mL 丙酮,涡旋混合 3 min,4 000 r/min 离心 5 min,弃去上层液体,剩余残液用 N<sub>2</sub> 吹干,将得到的混合磷脂用正己烷-异丙醇(3:1,体积分数)的混合溶液溶解,定容至 5 mL,用 0.45 μm 针筒式微孔滤膜过滤器过滤, -20℃ 冰箱保存,以备分析。

### 1.5 试样测定

取已处理好的试样溶液 10 μL,在与标准溶液测定相同的色谱条件下进行分析,测定保留时间和峰面积,外标法定量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相的选择 文献报导测定磷脂类化合物所用流动相有多种,<sup>[5,7,8]</sup>我们应用文献中报导的几种流动相对 PC 和 PE 分离进行了选择实验。结果表明,以乙腈-甲醇为流动相时,PC、PE 的保留时间十分接近,2 种组分无法分离;以正己烷-异丙醇-醋酸盐缓冲液作为流动相时,配制的流动相易出现结晶,不宜使用;以乙腈-85%磷酸-甲醇(100:0.8:10)的混合溶液作为流动相时,对混合标准溶液进样分析,PE、PC 分离良好。固定乙腈与甲醇的用量,又进行了不同的 85%磷酸用量对组分分离影响的对比实验。结果见表 1。可见固定乙腈-甲醇用量不变,组分的保留时间随磷酸比例的减少而增大。

磷酸比例大,分析速度快,但相邻组分分离不太理想。本实验确定乙腈 - 甲醇 - 85 %磷酸的配比为 100 10 0.6(体积分数)。结果可参见图 1。

| 表 1 流动相配比的选择         |          |       |       |       |
|----------------------|----------|-------|-------|-------|
| 乙腈 - 甲<br>醇 - 85 %磷酸 | 保留时间 min |       |       |       |
|                      | PS       | PE    | PL    | PC    |
| 100 10 1.2           | 2.285    | 2.829 | 4.116 | 5.206 |
| 100 10 1.0           | 2.325    | 2.966 | 4.229 | 5.407 |
| 100 10 0.8           | 2.449    | 3.247 | 4.596 | 5.600 |
| 100 10 0.6           | 2.641    | 3.508 | 4.858 | 5.991 |
| 100 10 0.4           | 3.061    | 4.271 | 6.214 | 8.014 |

2.1.2 流速的选择

在已选定的流动相配比下,固定检测波长为 203 nm,改变流速分别为 0.8、1.0、1.2、1.5 mL/min。实验结果表明,流速的增大可缩短分析周期,但相邻组分的分离度有所降低。本实验选择流速为 1.0 mL/min。

2.2 试样预处理条件的选择

2.2.1 萃取分离

文献报导用于磷脂萃取的多为有机溶剂直接萃取。<sup>[9]</sup>我们在研究中发现,用有机溶剂直接萃取,在已选定的色谱条件下进行分析,所得的溶剂峰为较宽的超载峰,因 PS 的保留时间较短,因此宽的溶剂峰易遮掩 PS 的色谱峰,使溶剂峰与 PS 的色谱峰无法分离。故选择丙酮作为溶剂溶解试样,使试样中与磷脂共存的易溶于丙酮的物质与磷脂分离弃去,然后用适当的溶剂溶解磷脂进行分析测定。同时对丙酮的用量,试样的萃取方式,涡旋萃取时间以及离心时间进行了选择。

丙酮用量的选择 称取约 30 mg 试样,在试样管中分别加入 2.0、4.0、6.0、8.0 mL 丙酮,充分振摇混匀,4 000 r/min 离心 10 min,倾出上层液体,用 N<sub>2</sub> 吹干残液,加入正己烷 - 异丙醇(3 1,体积分数)混合溶液溶解试样管中的剩余物质,在选定的色谱条件下,进样 10 μL,分析测定。结果见表 2。结果表明,加入不同量的丙酮,试样溶液进样所得的色谱峰的峰面积与试样质量的比值(A/M)其相对标准偏差在 10 %之内。但丙酮量的增大,可使溶剂与 PS 的色谱峰的分离有所改善,故选择丙酮的用量为 8.0 mL。

不同萃取方式的选择 固定其它实验条件不变,分别在试样中分 1 次、2 次、3 次加入丙酮 8.0 mL 进行比较实验。分 2 次加入丙酮 8.0 mL,即每次加入 4.0 mL,第一次加入 4.0 mL 丙酮后,充分振摇,离心后,倾出上层液体,再加入丙酮 4.0 mL,振摇,离心后,倾出上层液体,用 N<sub>2</sub> 吹干残液,加入正己烷 -

异丙醇(3 1,体积分数)混合溶液溶解试样管中的剩余物质,待测。分 3 次加入丙酮 8.0 mL,即为分 3 次分别加入 3.0、3.0、2.0 mL 丙酮,处理方法同上。在相同色谱条件下测定,结果见表 3。表中结果可见,分 2 次、3 次加入丙酮,试样 A/M 明显减少,说明分次加入丙酮,可引起 PE、PC 的损失,故选择 1 次加入丙酮 8.0 mL 萃取分离试样。

| 表 2 丙酮用量的选择      |             |                       |                       |
|------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| 测定次数<br><i>n</i> | 丙酮加入量<br>mL | A/M AU/mv g           |                       |
|                  |             | PE                    | PC                    |
| 3                | 2.0         | 2.54 ×10 <sup>7</sup> | 5.08 ×10 <sup>7</sup> |
| 3                | 4.0         | 2.60 ×10 <sup>7</sup> | 4.95 ×10 <sup>7</sup> |
| 3                | 6.0         | 2.99 ×10 <sup>7</sup> | 5.72 ×10 <sup>7</sup> |
| 3                | 8.0         | 3.07 ×10 <sup>7</sup> | 5.77 ×10 <sup>7</sup> |

| 表 3 不同萃取方式选择的结果  |                |                       |                       |
|------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| 测定次数<br><i>n</i> | 萃取方式           | A/M AU/mv g           |                       |
|                  |                | PE                    | PC                    |
| 3                | 1 次加入丙酮 8.0 mL | 1.27 ×10 <sup>8</sup> | 2.25 ×10 <sup>8</sup> |
| 3                | 2 次加入丙酮 8.0 mL | 1.01 ×10 <sup>8</sup> | 1.75 ×10 <sup>8</sup> |
| 3                | 3 次加入丙酮 8.0 mL | 0.74 ×10 <sup>8</sup> | 1.52 ×10 <sup>8</sup> |

涡旋萃取时间的选择 固定其它实验条件不变,在试样中加入 8.0 mL 丙酮,改变涡旋时间分别为 1、2、3、5、7 min。结果表明,涡旋时间的不同对溶剂峰宽窄的影响不明显,本实验选择涡旋时间为 3 min。

离心时间的选择 固定其它分析条件不变,在试样中加入 8.0 mL 丙酮,涡旋 3 min,4 000 r/min 离心。改变离心时间,结果见表 4。表中可见,不同的离心时间下,试样 A/M 差异无显著性,本实验选择离心时间为 5 min。

| 表 4 离心时间的选择      |             |                       |                       |
|------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| 测定次数<br><i>n</i> | 离心时间<br>min | A/M AU/mv g           |                       |
|                  |             | PE                    | PC                    |
| 3                | 5           | 2.90 ×10 <sup>8</sup> | 4.62 ×10 <sup>8</sup> |
| 3                | 10          | 2.76 ×10 <sup>8</sup> | 4.65 ×10 <sup>8</sup> |
| 3                | 20          | 2.92 ×10 <sup>8</sup> | 5.00 ×10 <sup>8</sup> |

2.2.2 磷脂的溶解

文献报导用于磷脂溶解的多为不同比例混合的氯仿 - 甲醇溶液,<sup>[5,10,11]</sup>也有报导用正己烷 - 异丙醇(3 1,体积分数)溶解磷脂。<sup>[5]</sup>我们应用上述几种溶剂系统溶解磷脂,在相同的实验条件下进样分析。实验结果表明,用正己烷 - 异丙醇(3 1,体积分数)溶解磷脂,所得色谱图的溶剂峰较窄,且溶剂峰与 PS、PE、PL、PC 分离较好。故选择正己烷 - 异丙醇(3 1,体积分数)作为磷脂的溶剂。

2.3 方法的评价

2.3.1 校正曲线制作

在已选定的色谱条件下,将配好的标准溶液系列应用液进样分析,以待测物质 PC、PE、PS 的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制校正曲线。回归直线方程及相关系数见表 5。由表中数据可见,PE、PC 在各自标准系列浓度范围内线性关系良好,可以满足上述物质的定量分析的要求。

| 表 5 PC、PE 的回归方程及相关系数 mg/mL |          |                                               |        |
|----------------------------|----------|-----------------------------------------------|--------|
| 物质名称                       | 浓度范围     | 回归方程                                          | 相关系数   |
| PC                         | 0.2~3.0  | $y_1 = 2.25 \times 10^4 + 1.31 \times 10^6 x$ | 0.9995 |
| PE                         | 0.05~1.0 | $y_2 = 1.49 \times 10^5 + 3.41 \times 10^6 x$ | 0.9997 |

2.3.2 检测限

检测限以 3 倍噪声水平所相当的待测物质的量计算,PC 的检测限为 0.2 μg; PE 的检测限为 0.05 μg。

2.3.3 精密度

在校正曲线线性范围内,取高、低 2 种浓度的试样溶液,1 d 内相同条件下,每种浓度的试样溶液取 6 个平行样,测定试样溶液中的 PC 和 PE,考察日内精密度。以相对标准偏差表示,日内精密度的 5.1%~7.2%,均小于 10%,符合卫生分析的要求。

在校正曲线线性范围内,取高、低 2 种浓度的试样溶液,相同条件下,每种浓度每天取 3 个平行样,测定试样溶液中的 PC 和 PE,连续测定 6 d,考虑日间精密度,结果见表 6。表中可见,日间精密度的 5.4%~9.0%,均小于 10%,方法的重视性好,符合卫生分析的要求。

| 表 6 PC、PE 测定的日间精密度 |          |      |                 |       |
|--------------------|----------|------|-----------------|-------|
|                    | 浓度 mg/mL | 测定次数 | $\bar{x} \pm s$ | RSD % |
| PC                 | 0.608    | 6    | 0.608 ±0.045    | 7.4   |
|                    | 1.66     | 6    | 1.660 ±0.090    | 5.4   |
| PE                 | 0.111    | 6    | 0.111 ±0.010    | 9.0   |
|                    | 0.427    | 6    | 0.427 ±0.034    | 8.0   |

2.3.4 准确度 采用加标回收率的测定方法评价方法的准确度。在离心管中分别加入高、低 2 种浓度的 PC、PE 的混合标准液,N<sub>2</sub> 吹干,称取约 5.0 mg 的试样加入到已加标的离心管中,每种浓度取 3 个平行样,同时作 2 份试样空白,按试样的处理方法处理,最后用正己烷-异丙醇(3 1,体积分数)的混合溶液溶解,稀释至 2.50 mL,在已选定的色谱条件下,进样 10 μL,分析测定,计算加标回收率。结果见表 7、8。表中可见 PE、PC 的加标回收率分别为 83.0%~105.6%和 81.3%~86.0%,可满足卫生分析的要求。

表 7 PE 的加标回收率 mg

| 试样中 PE 的量 | 加入 PE 的量 | 测得值   | 回收率 % |
|-----------|----------|-------|-------|
| 0.323     | 0.10     | 0.408 | 85.0  |
| 0.273     | 0.10     | 0.365 | 92.0  |
| 0.313     | 0.10     | 0.415 | 102.0 |
| 0.305     | 0.30     | 0.622 | 105.6 |
| 0.240     | 0.30     | 0.490 | 83.3  |
| 0.259     | 0.30     | 0.508 | 83.0  |

表 8 PC 的加标回收率 mg

| 试样中 PC 的量 | 加入 PC 的量 | 测得值  | 回收率 % |
|-----------|----------|------|-------|
| 1.13      | 0.50     | 1.56 | 86.0  |
| 1.20      | 0.50     | 1.62 | 84.0  |
| 1.00      | 0.50     | 1.42 | 84.0  |
| 1.20      | 1.50     | 2.48 | 85.3  |
| 1.18      | 1.50     | 2.45 | 84.7  |
| 1.09      | 1.50     | 2.31 | 81.3  |

2.3.5 试样溶液的稳定性实验 按照试样处理的方法制备试样溶液,-20℃ 冰箱保存,分别于 1、3、7 d 测定试样溶液中的 PE 和 PC,以第一天的测定值为基准,求测定结果的相对偏差。测定结果的相对偏差皆在 10%以内,故处理后的试样溶液,-20℃ 冰箱内保存可稳定一周。结果见表 9。

表 9 试样溶液的稳定性实验结果

| 天数 | 浓度 mg/mL |      | 相对偏差 % |     |
|----|----------|------|--------|-----|
|    | PE       | PC   | PE     | PC  |
| 1  | 0.351    | 1.39 | 0.0    | 0.0 |
| 3  | 0.366    | 1.47 | 4.3    | 5.8 |
| 7  | 0.375    | 1.49 | 6.8    | 7.2 |

2.4 试样测定

用本文建立的方法对 5 种卵磷脂保健食品中的 PC、PE 含量进行了测定,结果见表 10。色谱图可参见图 2。

表 10 卵磷脂保健食品中 PC、PE 含量的测定 %

| 样 品 | PC   | PE  |
|-----|------|-----|
| 1 号 | 24.2 | 6.1 |
| 2 号 | 16.4 | 3.1 |
| 3 号 | 17.9 | 5.0 |
| 4 号 | 17.1 | 3.7 |
| 5 号 | 15.2 | 4.6 |

3 结论

本文建立了卵磷脂保健食品中磷脂主要组分磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)的高效液相色谱测定方法。采用丙酮萃取分离试样,剩余残液用 N<sub>2</sub> 吹干,以正己烷-异丙醇(3 1)的混合溶液溶解待测磷脂组分。试样前处理方法简单。且具有结果准确

可靠,检测灵敏度高,分析速度快等优点,适于国内推广使用。

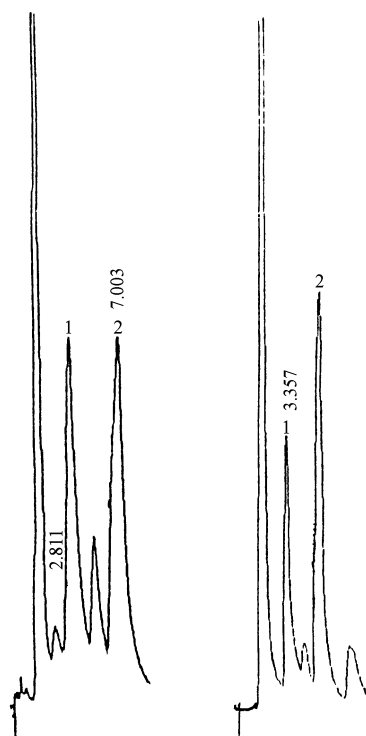


图1 标准色谱图 图2 样品色谱图  
1. PE 2. PC 1. PE 2. PC

#### 参考文献:

- [1] 徐桂云,常理文.大豆磷脂组成的薄层色谱分析[J].分析化学,1998,26(1):81—84.
- [2] 马辰,段宏瑾.大豆磷脂中磷脂类成分的含量测定[J].中国中药杂志,1999,24(11):671—672.
- [3] Johannes Mühling, Mark Radloff. Nanogram detection of phospholipids on thin-layer chromatograms[J]. Anal Biochem,1998,257:67—70.
- [4] Christer Silversand, Carl Haux. Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids[J]. J Chromatogr B,1997,703:7—14.
- [5] Shafiq-ur-rehman. Rapid isocratic method for the separation and quantification of major phospholipid classes by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr,1991,567:29—37.
- [6] K B Choudhari, S Jayanthi, R B Murty, et al. A high-performance liquid chromatographic method for the analysis of lipids from lyophilized formulations[J]. J Chromatogr A,1996,724:343—347.
- [7] 卢学清,王智华,洪筱坤,等.熊胆中磷脂类化合物的等梯度高效液相色谱分离分析[J].色谱,1999,17(6):559—562.
- [8] 郭戎,许益民,吴丽文,等.高效液相色谱法测定补骨脂中磷脂酰胆碱的含量[J].中国中药杂志,1993,18(6):356—357.
- [9] Klaus Eder, Anna Maria Reichlmayr-laris, Manfred Kirchgerner. Studies on the extraction of phospholipids from erythrocyte membranes in the rat[J]. Clinica Chimica Acta,1993,219:93—104.
- [10] W Bernhard, M Linck, H Creutzburg, et al. High-performance liquid chromatographic analysis of phospholipids from different sources with combined fluorescence and ultraviolet detection[J]. Anal Biochem,1994,220:172—180.
- [11] Jan Hradec, Petr Dufek. Isolation and quantitation of phosphatidylcholine by reversed-phase liquid-liquid extraction[J]. J Chromatogr B,1997,703:259—262.

**A study on determination of major phospholipid classes in lecithin dietary supplements by high-performance liquid chromatography/Cui Rong, Wang Hongwei, Xu Junhui, et al. //Chinese Journal of Food Hygiene. - 2001, 14(4):21~24.**

**Abstract:** A high-performance liquid chromatography method for the quantification of major phospholipid classes-phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) in lecithin dietary supplements was described in order to determine their effective constituent accurately and rapidly. The method precision of PC and PE ranged from 5.4% to 9.0%. The recoveries for PC and PE ranged from 81.3% to 86.0% and from 83.0% to 105.6% respectively. 5 kind of lecithin dietary supplements samples were measured under the optimized liquid chromatographic condition. The content of PC and PE ranged from 15.2% to 24.2% and from 3.1% to 6.1% respectively. The method described in the present study is simple, rapid and accurate, it could be recommended as a routine analytical method.

**Author's address:** Cui Rong, Public Health School, Peking University, Beijing 100083, PRC.

**Key Words:** Chromatography, High Pressure Liquid; Phosphatidylcholines; Phosphatidylethanolamines; Dietary Supplements

[收稿日期:2001-09-28]