

HPLC - RI 法快速准确测定 大豆磷脂酰胆碱含量

杨亦文, 李 艳, 吴彩娟, 任其龙, 吴平东

(浙江大学 二次资源化工国家专业实验室, 浙江 杭州 310027)

摘 要: 用 HPLC - RI 法和 HPLC - UV 法对大豆卵磷脂样品中的磷脂酰胆碱含量进行分析, 并与二维 TLC - P 法 (AOCSJa7 - 86) 作比较。以 Waters Spherisorb S5W($5\mu\text{m}$ Silica) $4.6\times 250\text{ mm}$ 硅胶柱为固定相, 正己烷 - 异丙醇 - 水 (体积比 1 : 4 : 1) 为流动相。色谱条件: 流速 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 $10\mu\text{L}$, 柱温 35°C , RI 检测器温度 35°C 。

由外标法得出其中磷脂酰胆碱的含量, 分别采用大豆磷脂酰胆碱标样和蛋黄磷脂酰胆碱标样作为外标物。

结果表明 HPLC - RI 法受标样来源影响小, 分析结果准确, 分析过程简便、快速, 适合作为常规分析方法。

关键词: 磷脂酰胆碱; 高效液相色谱; 示差折光检测; 紫外检测

中图分类号: O657.72; O629.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2004)05 - 0118 - 04

Determination of Soybean Phosphatidylcholine by HPLC - RI

YANG Yi-wen, LI Yan, WU Cai-juan, REN Qi-long, WU Ping-dong

(National Laboratory of Secondary Resources Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: The quantitative determination of soybean phosphatidylcholine in soybean lecithin samples was conducted by using the HPLC - UV and HPLC - RI (Refractive Index) methods. The results were compared with the recommended AOCS Ja7 - 86 method (a two dimensional TLC - P method). A Waters Spherisorb S5W column ($4.6\times 250\text{ mm}$ packed with $5\mu\text{m}$ Silica) and an isocratic mobile phase consisting of *n*-hexane - 2-propanol - water (1 : 4 : 1 by volume) were employed. The HPLC conditions were: flowing rate $0.8\text{ mL}/\text{min}$, injection aliquot $10\mu\text{L}$, column temperature 35°C , and the temperature of the RI detector (differential refractive index detector) 35°C . The content of soybean phosphatidylcholine in lecithin samples was determined by the external standard method, using soybean phosphatidylcholine and egg yolk phosphatidylcholine as external standards. The results showed that the proposed HPLC - RI method was scarcely affected by the source of phosphatidylcholine standards, and hence the method is reliable. The HPLC - RI method is also simple and quick. Therefore, it can be used as a routine analytical method for the determination of soybean phosphatidylcholine.

Key words: Phosphatidylcholine; HPLC; RI; UV

卵磷脂从广义上讲是指包含磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, 简称 PC)、磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, 简称 PE)、肌醇磷脂 (phosphatidylinositol, 简称 PI) 和溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, 简称 LPC) 等在内的丙酮不溶磷脂, 而狭义的卵磷脂就是指磷脂酰胆碱 PC, 是由甘油、胆碱、磷酸、脂肪酸组成的一类含磷脂类物质^[1]。

磷脂酰胆碱具有亲水和疏水双重性, 是一类天然的表面活性剂, 具有重要的生理功能和乳化性能, 在食品、保健品和医药等行业中有重要的用途。准确分析卵磷脂样品中 PC 的含量是一个关键问题。但是, 由于磷脂酰胆碱实际上是混合物, 而不是化合物, 其组成随原料油脂中的脂肪酸组成而变化, 给准确分析带来了很大困难。

卵磷脂分析方法很多, 传统的薄层色谱测磷 (TLC - P) 法是广泛被接受的定量分析方法。被美国油脂化学协会 (AOCS) 收录为标准方法的二维 TLC - P 法是一种更准确的定量分析磷脂的方法^[2]。这种方法是在分离后收集各种磷脂, 测定磷含量, 再按照各类磷脂的平均相对分子质量计算出它们的含量。但是这种方法步骤较烦琐, 对操作技术要求较高。另外, 如果有很多样品, 定量分析需要很

收稿日期: 2003 - 09 - 09; 修回日期: 2004 - 05 - 19

作者简介: 杨亦文 (1963 -), 男, 浙江磐安人, 副教授, 博士。

长时间。HPLC 法分析 PC 的文章已经发表了很多,大多数使用 UV 检测器,其测量值会受到脂肪酸组成差异的影响,而本文所采用的 HPLC- RI 方法几乎不受这些差异的影响^[3,4]。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(包括 510 高压泵,717 自动进样器,410 示差折光检测器,996 二极管阵列检测器);卡尔·费休水分测定仪。

大豆 PC 标样(德国 Lipoid 公司产品,PC 含量为 98.1%(以干基计),水含量为 1.68%);蛋黄 PC 标样(德国 Lipoid 公司产品,PC 含量为 98.0%(以干基计),水含量为 5.65%);大豆 PC 样品(实验室自制);正己烷(色谱纯);异丙醇(色谱纯);超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱: Waters Spherisorb S5W(5 μ m Silica) 4.6 $\times$ 250 mm 硅胶柱;流动相: 正己烷-异丙醇-水(体积比 1:4:1);进样量: 10 μ L;流速: 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹;柱温: 35 $^{\circ}$ C;示差折光检测器温度: 35 $^{\circ}$ C;紫外检测波长: 204 nm。

1.3 标准及样品溶液的制备

标准溶液: 精确称取 0.338 5 g 大豆 PC 标样和 0.345 2 g 蛋黄 PC 标样分别溶于 50 mL 流动相中,用移液管分别移取 8、5、2、1 mL 上述 PC 标准溶液,用流动相稀释至 10 mL,配成一系列的大豆 PC 标准溶液和蛋黄 PC 标准溶液,浓度见表 1。

表 1 PC 标准溶液浓度
Table 1 Concentrations of phosphatidylcholine (PC) standard solutions

Soybean PC standard	Concentration $\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	Egg yolk PC standard	Concentration $\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$
sPC- Std- 1	6.530	ePC- Std- 1	6.383
sPC- Std- 2	5.224	ePC- Std- 2	5.107
sPC- Std- 3	3.265	ePC- Std- 3	3.192
sPC- Std- 4	1.306	ePC- Std- 4	1.277
sPC- Std- 5	0.653	ePC- Std- 5	0.638

样品溶液: 大豆卵磷脂样品按照美国专利 US 4983327 由实验室自制得到^[5]。准确称取一定量的样品,溶于流动相中,即得到大豆卵磷脂样品溶液,其浓度分别为 3.940 和 4.548 mg $\cdot$ mL⁻¹。

1.4 HPLC 分析

紫外检测器和示差折光检测器串联,自动进样,每次进样量 10 μ L。每个样品分析 2 次,得到的峰面积取平均值。根据标准溶液 PC 浓度和色谱峰面积可得大豆 PC 标样和蛋黄 PC 标样在 UV 及 RI 检测器下的标准曲线,然后由实际样品的 PC 峰面积和各标准曲线可得大豆卵磷脂样品在 UV 检测器和 RI 检测器及不同标样下的 PC 含量。

1.5 二维 TLC- P 含量测定

按 AOCS Ja7- 86 进行^[2]。硅胶板尺寸为 200 $\times$ 200 mm(青岛海洋化工厂)。展开剂 A 为氯仿-甲醇-氨水(7 mol $\cdot$ L⁻¹)(体积比 65:30:4),展开剂 B 为氯仿-甲醇-冰醋酸-水(体积比 170:25:25:6)。样品展开后将 PC 对应的斑点刮下,用高氯酸和硝酸消化,钼酸铵显色,乙酸丁酯萃取。采用分光光度计在 310 nm 下测定吸光度,得到磷含量。以磷酸二氢钾为标样,得到吸光度对磷含量的标准曲线。最后根据以大豆 PC 平均相对分子质量为基础得到的磷脂转化因子,将磷含量换算成样品中 PC 的含量。重复测定 2 次,取平均值。

2 结果与讨论

2.1 紫外光谱

由 996 二极管阵列检测器可以直接得到样品的紫外光谱图,为选择检测波长提供依据。实验发

现 sPC 标样的最大吸收波长与标样浓度有关。随着浓度的降低,最大吸收波长由 205.2 nm(6.530 mgPC · mL⁻¹) 降到 204.1 nm(5.224 mgPC · mL⁻¹),再降到 202.9 nm(3.265 mgPC · mL⁻¹),最后降为 201.7 nm(0.653 mgPC · mL⁻¹)。ePC 与此类似。为了统一起见,最后将波长定为 204 nm。

2.2 色谱分析

HPLC - UV 法分析 PC 时,得到的峰形较好,出峰时间不超过 15 min,重复性好,蛋黄 PC 标样和大豆 PC 标样在此条件下的色谱图相似。图 1a 为大豆 PC 标样在紫外检测器下的色谱图。示差折光检测器下的色谱图见图 1b。

在此色谱条件下 PE、LPC 和 PC 的保留时间相差较大,而且由文献^[4]报道可知其它磷脂(如 PI、PS 等)也可以和 PC 完全分开,即不会有其它磷脂峰混在 PC 色谱峰中,分析结果是可靠的。

2.3 PC 标准曲线

大豆 PC 标样和蛋黄 PC 标样在 RI 及 UV 检测下的标准曲线见表 2。

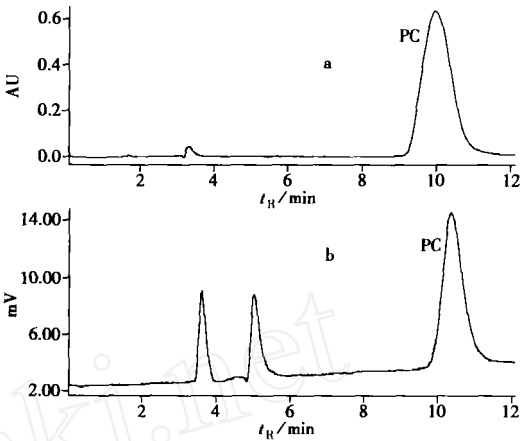


图 1 大豆 PC 标样在紫外检测器(204 nm) (a)和示差折光检测器(b)下的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of sPC- Std- 2 with UV detector(a) and RI detector(b)

表 2 PC 标准曲线回归方程
Table 2 Regression equations of PC standards

	HPLC- RI	HPLC- UV
sPC	$Y = 6.72 \times 10^4 X - 8.69 \times 10^3, r = 0.999\ 7$	$Y = 8.31 \times 10^6 X + 3.91 \times 10^5, r = 0.993\ 3$
ePC	$Y = 6.81 \times 10^4 X - 7.41 \times 10^3, r = 0.999\ 6$	$Y = 6.65 \times 10^6 X + 7.81 \times 10^5, r = 0.998\ 7$

Notes: Y is the peak area of PC; X is the concentration of the standard solution in mgPC · mL⁻¹

2.4 实际样品中 PC 含量的测定结果

实际样品中 PC 含量的测定结果见表 3。

表 3 实际样品 PC 含量 HPLC 测定结果 *
Table 3 PC content in real lecithin samples determined by HPLC *

Sample	w ₁ / %	w ₂ / %	(w ₁ - w ₂ / w ₁) / %	w ₃ / %	w ₄ / %	(w ₃ - w ₄ / w ₃) / %
sPC- Sam- 1	75.82	74.37	1.91	79.28	111.00	40.01
sPC- Sam- 2	94.04	92.42	1.72	102.19	138.02	35.06

* w₁: 由示差折光检测器下 sPC 的标准曲线得到的样品 PC 含量; w₂: 由示差折光检测器下 ePC 的标准曲线得到的样品 PC 含量; w₃: 由紫外检测器 204 nm 下的 sPC 的标准曲线得到的样品 PC 含量; w₄: 由紫外检测器 204 nm 下的 ePC 的标准曲线得到的样品 PC 含量 (w₁. PC content in sPC samples determined by HPLC- RI and sPC standard; w₂. PC content in sPC samples determined by HPLC- RI and ePC standard; w₃. PC content in sPC samples determined by HPLC- UV and sPC standard; w₄. PC content in sPC samples determined by HPLC- UV and ePC standard.)

2.5 二维 TLC - P 法测定结果

以每组的 1# (未加磷酸二氢钾溶液) 为空白,得到 2 组吸光度值,然后以吸光度为 X 值,磷含量 (μg) 为 Y 值,作标准曲线,得到 2 条标准曲线。然后由样品吸光度值和最初的取样量以及磷脂转换因子,即可得到样品的 PC 含量。结果见表 4。

表 4 样品的二维 TLC 法测定结果 *
Table 4 PC content in sample sPC- Sam- 1 and sPC- Sam- 2 determined by TLC- P *

Sample		Regression equation	PC content w/ %	Average content w/ %
sPC- Sam- 1	1 st time	$Y = 9.968\ 8 X, r = 0.995\ 4$	76.92	79.01
	2 nd time	$Y = 9.807\ 5 X, r = 0.990\ 1$	81.09	
sPC- Sam- 2	1 st time	$Y = 10.914 X, r = 0.992\ 4$	96.24	96.64
	2 nd time	$Y = 10.843 X, r = 0.992\ 5$	97.04	

* Y 为磷含量; X 为吸光度 (Y is the phosphorus content in μg; X is the absorbance)

2.6 讨 论

由表 3 可见,在大豆磷脂酰胆碱的 HPLC 分析中,RI 和 UV 检测器的结果相差很大。尤其是当采用不同的标样时。如果以 TLC- P 法作为标准方法,则用 RI 检测器得到的结果的准确度比用 UV 检测器好得多。

由表 3 还可以看出,以 RI 检测器来检测 PC 时,以大豆和蛋黄 PC 标样来分析大豆卵磷脂样品得到的结果偏差较小,说明分析结果受 PC 标样来源即脂肪酸组成的影响不大。而以 UV 检测器来检测 PC 时,以大豆和蛋黄 PC 标样来分析大豆卵磷脂样品得到的结果偏差很大,说明结果受卵磷脂来源即脂肪酸组成的影响较大。

因为大豆卵磷脂中脂肪酸以不饱和脂肪酸为主,而蛋黄卵磷脂中脂肪酸则以饱和脂肪酸为主。HPLC- UV 法很容易受不同的脂肪酸组成和检测波长的微小偏差的影响,要求样品和标准品有相同的脂肪酸组成,否则很难得到准确的结果。

可见 RI 检测器优于 UV 检测器。但是,RI 检测器的灵敏度比 UV 检测器低很多,而且容易受温度的影响,基线的稳定性较差。所以要求样品浓度较高,HPLC 条件尽量稳定。尽管如此,由于磷脂酰胆碱实际上是混合物,而不是化合物,其中的脂肪酸组成因而其相对分子质量、双键数目和位置均在变化,所以 HPLC- RI 法分析大豆卵磷脂中的 PC 含量能够满足实验室工艺研究和生产中的分析要求。

二维 TLC- P 法整个分析过程非常烦琐,分析时间长,误差来源多。由表 4 可见,其重复性较差,可见二维 TLC- P 法对分析技巧要求较高。而 HPLC- RI 法快速、简便,分析时间短,结果准确,所以适合作为常规分析方法。

3 结 论

采用 HPLC- RI 方法分析大豆卵磷脂中的磷脂酰胆碱含量,过程简便,结果可靠,重复性好,出峰时间不超过 15 min,分析结果受磷脂酰胆碱标样的来源影响小,可以用于分析不同纯度的卵磷脂样品,如磷脂粗品或是中间品、产品等,是一种可以替代传统磷含量测定法的大豆卵磷脂中磷脂酰胆碱含量分析方法。适合作为常规分析方法。

参考文献:

- [1] 宋国安. 大豆磷脂的开发及应用前景[J]. 中国油脂, 2001, 26(4): 33- 35.
- [2] AMERICAN OIL CHEMISTS ' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists ' Society [M]. 5th ed. Section J: Lecithin. Ja7- 86 Phospholipids in lecithin concentrates by thin-layer chromatography. Champaign, AOCS press, 1998. 1- 3.
- [3] 胡小中, 温光源, 龙金林. 磷脂分析检测技术研究进展[J]. 中国油脂, 2003, 28(3): 41- 44.
- [4] YAMAGISHI T, AKIYAMA H, KIMURA S, *et al.* Quantitative determination of phosphatidylcholine by an HPLC- RI system [J]. JAOCS, 1989, 66(12): 1801- 1808.
- [5] GUNTHER B, LOSCH R. Process for isolating a phosphatidylcholine free of other phospholipids in the starting material[P]. US: 4,983,327, 1991- 01- 08.