

磷脂的高效液相色谱分析

崔莹

(华东师范大学 河口海岸学国家重点实验室, 上海 200062)

摘要:天然磷脂是含磷酸的类脂化合物,广泛存在于植物、动物及微生物体中,在工业生产、食品科学、医药学、生命科学等研究方面都有重要的应用。磷脂的研究手段多样,高效液相色谱在磷脂的分离、检测方面具有优势。本文结合近年来国内外高效液相色谱分离磷脂的研究报道,对高效液相色谱分离、检测磷脂的方法进行了分类、评价。

关键词:天然磷脂; 高效液相色谱法; 分离; 检测

中图分类号: O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-8143(2007)01-0071-04

Separation and Detection of Phospholipids by High Performance Liquid Chromatography

Cui Ying

(State Key Laboratory of Estuarine & Coastal Research,
East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Phospholipids are mixtures of lipids containing phosphorus. They widely exist in the plants, animals and micro-organism. They have great application in the industry, food science, medical science and life science. There are several methods to separate and detect the phospholipids, one of which is high performance liquid chromatography. This paper classified those methods which were used to separate and detect phospholipids and summarized the technique development of separation and detection of phospholipids.

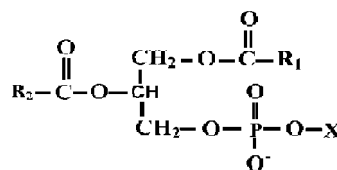
Key words: Natural phospholipids; High performance liquid chromatography; Separation; Detection

前言

天然磷脂是含磷酸的类脂化合物,广泛存在于植物的种子、动物的脑、肝、卵和微生物体中。磷脂是细胞膜的主要成分,还是重要的生物活性物质及信息分子前体的贮备形式,与某些人类疾病有关,如炎症、糖尿病等^[1,2]。在微生物学研究中,磷脂还是理想的生物标志物,通过磷脂分子组成可以揭示微生物生物量、群落组成和生理状况等信息^[3,4],在生物地球化学研究中亦有重要意义。磷脂为两性分子,可作乳化剂、稳定剂、和湿润剂^[5]。可见,磷脂在工业生产、食品科学、医药学、生命科学、自然地理学等研究方面都有重要的应用,而对磷脂进行分离、提纯则是各种研究的前提和关键。

1 磷脂的结构组成

磷脂按分子结构可分为磷酸甘油酯和鞘磷脂。磷酸甘油酯是脂肪酸、甘油和磷酸结合的衍生物,结构通式如下:



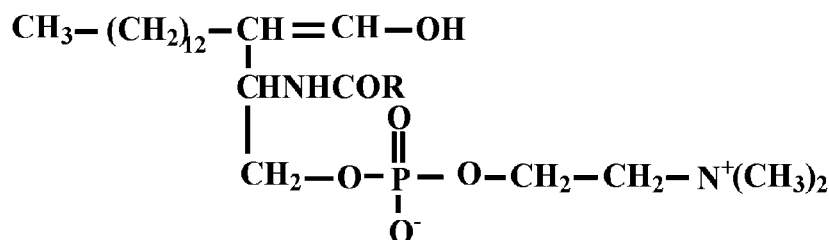
式中 R_1 、 R_2 代表脂肪酸残基,其碳原子数一般为 12-18,以偶数碳居多^[2],根据分子中 X 基团的不同,磷酸甘油酯又可分为多种分子类型,如磷脂酸 (PA), 磷脂酰甘油 (PG), 二磷脂酰甘油 (DPG), 磷

收稿日期: 2006-4-26

作者简介: 崔莹 (1980), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事高效液相色谱检测技术的研究。E-mail: ycui@sklec.ecnu.edu.cn

脂酰乙醇胺 (PE), 磷脂酰胆碱 (PC), 磷脂酰丝氨酸 (PS), 磷脂酰肌醇 (PI)。溶血磷脂是磷脂酰基被部分水解的产物。

鞘磷脂 SM (SP) 又名神经磷脂, 是由神经酰胺与磷酸直接相连, 磷酸集团再与胆碱或胆胺连接成酯, 结构通式如下:



2 磷脂的高效液相色谱测定

对磷脂总量测定的方法有比色法、称重法、紫外分光光度法和红外光谱法, 对磷脂进行分离、检测的方法有薄层色谱法、液相色谱、以及核磁共振法^[6]。高效液相色谱分离磷脂可以避免破坏磷脂分子结构, 得到更准确的分子结构信息, 利用制备型液相色谱, 还可获得纯度较高的单个组分^[7], 具有方便、快速、高灵敏度、无损伤的特点。

高效液相色谱分析磷脂的困难在于磷脂分子的低挥发性、不耐高温、弱紫外吸收、易吸水、稳定性差等特点。不同来源的磷脂组成成分不同, 分子中脂肪酸链长度、不饱和度亦有差别, 磷脂分子本身的这种异质性会导致磷脂分离过程中出现色谱峰的延展、重叠、拖尾^[8]。且在生物体中, 磷脂一般与其他的脂类结合在一起, 需化学手段进行分离、纯化、浓缩之后进行色谱分离、检测^[9]。

分离磷脂的液相色谱方法据固定相的不同分为正相色谱法和反相色谱法。正相色谱多用 Silica 硅胶柱为固定相, 也有 CN 氰基柱、NH₂ 氨基柱和 DDL 二醇柱的报道^[10, 11, 12]。反相色谱多以 C₁₈、C₈、ODS^[13, 14] 为固定相。正相色谱分离磷脂的基础是磷脂各组分的极性差异, 反相色谱分离磷脂的基础则是各磷脂组分的疏水性差异。

正相色谱分离磷脂常用的流动相有氯仿 - 甲醇 - 氨水、正己烷 - 异丙醇 - 水以及乙腈 - 甲醇 - 水^[11]。磷脂在不同类型柱子上的保留存在差异, 各组分的流出顺序也不同。如乙腈 - 甲醇 - 磷酸为流动相时, 在硅胶柱上各组分流出顺序为 PS、PE、PC、SP^[15], 而在氨基柱上的流出顺序为 PC₁、SP、PC₂、PG、PE、PI、PS^[11]。流动相也影响流出顺序, 同

在硅胶柱上, 正己烷 - 异丙醇 - 水为流动相的流出顺序为: PE、PI、PC^[8], 而甲醇 - 乙腈 - 磷酸为流动相洗脱的流出顺序为 PI、PE、PC^[16]。PC、LPC 溶血磷脂酰胆碱、SP 的极性大, 在硅胶柱上一般最后流出, SP 通常为两个峰^[8, 17]。在分析弱酸、弱碱性的磷脂时, 会出现峰延展、拖尾等现象, 为了防止磷脂组分与固定相之间发生非特异性反应, 损伤柱子, 在流动相中添加一定量的离子抑制剂如 85% 磷酸、乙酸铵、30% 氨水、乙酸等, 可有效改善峰形, 抑制色谱峰拖尾^[1, 12, 17, 19]。但低 pH 可能会引起样品水解生成溶血磷脂^[20]。

反相色谱的流动相为甲醇 - 乙腈 - 水, 有时也用到正己烷、异丙醇和氯仿^[11]。在反相柱上分离磷脂, 由于磷脂分子的异质性, 一个组分会分成几个峰, 给定量带来困难。如卢学清等测定熊胆中磷脂类化合物时, 发现在 PE - C₁₈ 柱上 PC、PG 都分出双峰, 还出现托尾、肩峰等问题^[13]。但反相色谱与质谱检测器组合, 可以实现磷脂的分离和痕量检测, 检测限达 ppm^[4, 12, 21]。

检测磷脂的检测器有紫外^[15, 17]、蒸发光散射^[22]、示差折光^[23]及质谱检测器^[12]。磷脂虽然缺乏强发色团, 但其分子结构中的不饱和基团和官能团 (如碳碳双键、羰基、磷酸基团、氨基) 在 200-214nm 下有强吸收, 检测波长一般在 203nm 或 205nm。但 Suchocka 认为磷脂的检测范围在 200-237nm, 并分别在 235nm 和 254nm 处检测磷脂, 在 C₈ 柱上分离了 PC、PE、LPC、PI^[24]。磷脂的紫外吸收强度与分子结构中是否有发色团、发色团数目有关, 如含氨基的 PC、PE、PS 紫外吸收就大, 缺乏发色团的 PI 紫外吸收就弱, 色谱图中信号的强度并不能代表绝对的磷脂浓度^[25]。将磷脂分子进行衍生化

可增大磷脂的紫外吸收,降低检测限。通过化学反应将磷脂变成具有发色基团的化合物,或直接在磷脂分子上连接发色团或荧光基团,再用紫外或荧光检测器进行检测^[26]。但是衍生化反应过程复杂,前处理步骤繁琐,对定量结果的准确度影响较大,操作繁琐。

蒸发散射光检测器和质谱检测器均为非选择型的检测器,应用不受样品种类限制。但蒸发光散射检测器对溶剂要求高,线性较差,且灵敏度较紫外检测器低^[11,25]。杨亦文等研究发现紫外检测器受磷脂来源影响较大,难以实现准确定量。而示差折光检测器受来源影响较小,但灵敏度较低,不能用于梯度洗脱,且对环境要求高,受温度影响较大^[23]。质谱检测器成本较高,但可大大降低检测限,并可得到分子结构信息,是目前国内外研究的热点^[27]。

分离流速一般在 0.152 0 mL/min,多为 1.0 mL/min,制备色谱流速一般为 2.0 mL/min,连接质谱检测器时流速小,一般为 0.150 5 mL/min。简单样品等度洗脱即可以完成分离,复杂样品则需梯度洗脱,通过改变溶剂的配比从而改变溶剂的极性来完成对极性差异很大的样品的快速、完全分离^[7,12]。

3 国、内外研究现状

国内用高效液相色谱对磷脂进行分离测定的研究多集中在食品、医药、工业、基础科学等领域。如食品、保健品、血浆、熊胆中的磷脂测定^[10,13-16]。正相、反相色谱方法都有报道,多用紫外检测器^[10],也有蒸发光散射检测器^[28,29]、示差折光检测器^[23]及质谱检测器^[28,29]的报道,近几年来质谱检测器的使用逐渐增多,对磷脂分子构型的研究已开始起步。曹栋、夏海涛等用硅胶柱分离了大豆磷脂酰胆碱,然后用 C18柱、ODS柱对磷脂酰胆碱分子进行进一步的分离,分别得到 5种、11种分子类型^[28,29]。

国外对磷脂的研究涉及更加广泛,如食品、医药、生命科学、地球化学等领域。研究深度和广度上都较国内大,目前已可用高效液相色谱与质谱联用,在不破坏磷脂分子结构的前提下,得到更加全面、准确的磷脂分子结构信息,这在医药科学、生命科学等基础科学的研究中尤其重要。如 R ütters,

Fang等通过高效液相色谱与质谱的联用对磷脂进行分子机构解析,系统研究了海洋沉积物中微生物群落结构^[3,4,12,27,30,31]。2004年,Klaus - G用 LC - ESI - MS - MS对沉积物中磷脂进行分离与分子结构解析,从而对海洋沉积物中微生物生物量及群落结构进行研究^[27]。

随着检测技术的发展,高效液相色谱与质谱联用对磷脂分子种类进行定性、定量分析和结构解析将是今后磷脂分离、检测技术发展的方向。

参考文献

- [1] Hayakawa J, Okabayashi Y. Simultaneous analysis of phospholipid in rabbit bronchoalveolar lavage fluid by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, (35): 583 - 592.
- [2] 曹栋,裴爱泳,王兴国. 磷脂结构、性质、功能及研究现状 [J]. 粮食与油脂, 2004, (5): 3 - 6.
- [3] Fang J, Barceba M J, Alvarez P J J. A direct comparison between fatty acid analysis and intact phospholipids profiling for microbial identification. *Organic Geochemistry*, 2000, (31): 881 - 887.
- [4] Fang J, Barceba M J. Structural determination and quantitative analysis of bacterial phospholipids using liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, (33): 23 - 35.
- [5] 王墨林,安红,陈志强,邢玉尚,佟白,吴晓辉,吴平,田志茗,宋伟明. 大豆磷脂的系统研究与开发 [J]. 精细化工, 2001, 18(1): 8 - 13.
- [6] 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.
- [7] Kang D H, Row K H. Fractionation of soybean phospholipids by preparative high - performance liquid chromatography with sorbents of various particle size. *Journal of Chromatography A*, 2002 (949): 217 - 223.
- [8] Rivnay B. Combined analysis of phospholipids by high - performance liquid chromatography and thin - layer chromatography. *Journal of chromatography*, 1984, (294): 303 - 315.
- [9] Fang J, Findlay R H. The use of a classic extraction method for simultaneous recovery of organic pollutants and microbial lipids from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 1996, 27: 63 - 71.
- [10] 董晓渭,冯学伟,李桂贞. 高效液相色谱法测定大豆磷

- 脂中的磷脂酰胆碱[J]. 华东理工大学学报, 2000, 26(3): 315 - 317.
- [11] Abidi S L. Separation procedures for phosphatidylserines Journal of chromatography B, 1998, (717): 279 - 293
- [12] R üters H, Sass H, Cyp ionka H, Rullk? tter J. Microbial communities in a Wadden Sea sediment core - clues from analyses of intact glyceride lipids, and released fatty acids Organic Geochemistry, 2002, (33): 803 - 816
- [13] 卢学清, 王智华, 洪筱坤. 等度反相高效液相色谱法测定熊胆中磷脂类化合物[J]. 色谱, 2000, 18(1): 57 - 60
- [14] 刘宝全, 姜波, 慕剑华. 蛋黄磷脂的反相 HPLC法分离[J]. 大连民族学院学报, 2003, 5(1): 50 - 51
- [15] 马焕文, 郭述苏, 樊红, 于金萍, 杨霞. 高效液相色谱分析血小板膜磷脂各成分[J]. 前卫医药杂志, 1997, 14(3): 141 - 143
- [16] 姜秋芬, 骆子生, 李兴发, 姜玲玲. 高效液相色谱法测定大鼠肝过氧化物酶体膜磷脂[J]. 色谱, 2000, 18(2): 142 - 144
- [17] Rodriguez - Bemaldo de Quiros A, L ópez - Hem ández J, Sinal - Lozano J. Separation of phosphor - lipids classes in sea urchin, *Paracentrotus lividus* by high - performance liquid chromatography Journal of chromatography B, 2002, (770): 71 - 75
- [18] Zink K - G, Wilkers H, Disko U, Elvert M, Horsfield B. Intact phospholipids - microbial "life markers" in marine deep subsurface sediments Organic geochemistry, 2003, (34): 755 - 769
- [19] Edward J L, Maria S K, Paul E M, Charles L H. Separation and quantitation of phospholipids and lysophospholipids by high - performance liquid chromatography Analytical Biochemistry, 2000, (285): 246 - 254
- [20] Seewald M, Eichinger Hans M. Separation of major phospholipid classes by high - performance liquid chromatography and subsequent analysis of phospholipid - bound fatty acids using gas chromatography Journal of chromatography, 1989, (469): 271 - 280
- [21] Fang J, Barcelona M J, Nogi Y, Kato C. Biochemical implication and geochemical significance of novel phospholipids of the extremely barophilic bacteria from the Marianas Trench at 11000m. Deep - sea Research, 2000, (47): 1173 - 1182
- [22] Avalli A, Contarini G. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/ HPLC/ ELSD. Journal of Chromatography A. 2005(1071): 185 - 190
- [23] 杨亦文, 李艳, 吴彩娟, 任其龙. HPLC - RI法快速准确测定大豆磷脂酰胆碱含量[J]. 分析测试学报, 2004, 23(5): 118 - 121
- [24] Suchocka Z, Gronostajska D, Suchocki P, Pachecka J. New HPLC method for separation of blood plasma phospholipids Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2003, (32): 859 - 865
- [25] Abidi S L, Mounts T L. Reversed - phase separations of nitrogenous phospholipids on an octa - decanoyl poly (vinyl alcohol) phase[J]. Journal of chromatography A, 1997, (773): 93 - 101
- [26] Wang Yong - hui, Knull I S, Liu C, Orr J D. Derivatization of phospholipids[J]. Journal of chromatography B, 2003, (793): 3 - 14
- [27] Klaus - G Mangelsdorf Z K. Efficient and rapid method for extraction of intact phospholipids from sediments combined with molecular structure elucidation using LC - ESI - MS - MS analysis[J]. Analytical chemistry, 2004, (380): 798 - 812
- [28] 曹栋, 裘爱泳, 王兴国. 大豆磷脂酰胆碱分子类型的研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(12): 49 - 52
- [29] 夏海涛, 候近龙, 刘玉芬. 高效液相色谱法分析大豆中磷脂酰胆碱的分子种[J]. 分析实验室, 2003, 22(1): 9 - 11
- [30] Fang J, Barcelona M J, Semrau J D. Characterization of methanotrophic bacteria on the basis of intact phospholipids profiles[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, (189): 67 - 72
- [31] R üters H, Sass H, Cyp ionka H, Rullk? tter J. Phospholipid analysis as a tool to study complex microbial communities in marine sediments[J]. Journal of microbiological methods, 2002, (48): 149 - 160