

高效液相色谱法测定大豆磷脂类保健食品中 磷脂酰胆碱含量

刘彬丽, 唐亚利, 金绍明, 宁霄, 曹进*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定大豆磷脂类保健食品中磷脂酰胆碱含量的分析方法。**方法** 采用高效液相色谱仪、Kromasil 100-5-SIL 硅胶柱, 以流动相正己烷:异丙醇:水=0.25:4:1(V:V:V), 流速为 0.5 mL/min, 检测波长为 207 nm, 柱温为 30 °C, 进样量 10 μ L, 进行检测。**结果** 磷脂酰胆碱浓度为 0.1~2.0 mg/mL 时, 线性关系良好, 回归方程的相关系数 $r^2=0.9998$, 相对标准偏差(relative, standard deviation, RSD)为 0.50%, 平均回收率为 98.01%~98.73%。**结论** 该方法高效, 准确, 简便, 适合于检测大豆磷脂类保健食品中磷脂酰胆碱的含量。

关键词: 大豆磷脂; 磷脂酰胆碱; 保健食品; 高效液相色谱法

Determination of phosphatidylcholine from soybean phospholipid health products by high performance liquid chromatography

LIU Bin-Li, TANG Ya-Li, JIN Shao-Ming, NING Xiao, Cao Jin*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of phosphatidylcholine from soybean phospholipid health products by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The sample was tested by HPLC with Kromasil 100-5-SIL silica gel column. Mobile phase was *n*-hexane: isopropanol: water=0.25:4:1 (V:V:V) with flow rate of 0.5 mL/min, the detection wavelength was 207 nm, column temperature was 30 °C, and injection volume was 10 μ L. **Results** When the concentration of phosphatidylcholine was 0.1-2.0 mg/mL, the linear relationship was good. The correlation coefficient of regression equation was $r^2=0.9998$, the relative standard deviation (RSD) was 0.50%, and the average recoveries were 98.01%-98.73%. **Conclusion** This method is efficient, accurate and simple, which is suitable for detecting the content of phosphatidylcholine in soybean phospholipid health food.

KEY WORDS: soybean phospholipids; phosphatidylcholine; health food; high-performance liquid chromatography method

1 引言

近年来,随着人们物质生活水平的提高,保健意识也逐渐增强,市场上随之出现了各式各样的保健品,特别是

具有改善和增强大脑记忆功能的大豆磷脂类保健食品更是品牌众多,成为热销的保健食品。

磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)又俗称卵磷脂,是大豆磷脂类保健食品的主要成分,磷脂酰胆碱的含量是

*通讯作者: 曹进, 研究员, 主要研究方向为食品分析。E-mail: caojin@nifdc.org.cn

*Corresponding author: CAO Jin, Professor, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: caojin@nifdc.org.cn

评价大豆磷脂类保健食品质量的重要指标。目前, 文献报道的保健食品中磷脂酰胆碱的含量测定方法较多, 如分光光度法^[1-4]、薄层色谱法^[5-7]、液相色谱法^[8-11]、液质联用法^[12]、核磁共振法^[13]、红外光谱法^[14]等。分光光度法和薄层色谱法存在操作复杂、重复性差、容易受到其他因素干扰的缺点。高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分离效率高, 分析速度快, 重现性好, 是目前检测磷脂酰胆碱含量应用最广泛的方法。文献资料报道的常用流动相有正己烷/异丙醇/冰乙酸^[15]、乙腈/甲醇/水^[16]、乙腈/甲醇/磷酸^[17]等三元甚至多元等度或梯度洗脱体系, 这种体系分析结果常出现峰延展拖尾, 分离度不理想。

本研究考察了大豆磷脂类保健食品中磷脂酰胆碱测定的前处理方法和液相色谱条件, 考察了不同溶剂提取效率, 以期建立更便捷、准确的方法, 对大豆磷脂类保健食品的质量进行有效控制。

2 材料与方 法

2.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Kromasil 100-5-SIL 液相色谱柱 (瑞典 Kromasil 公司); KQ-700DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Mettler AL204 电子天平 (瑞士梅特勒公司)。

正己烷、异丙醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 磷脂酰胆碱标准品 (纯度 $\geq 99\%$, 美国 sigma 公司)。

大豆磷脂软胶囊样品 2 批 (市售)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

(1) 标准储备液配制

精密称取磷脂酰胆碱标准品 20 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加正己烷溶解并定容至刻度, 制成浓度为 2.0 mg/mL 的储备液, 摇匀待用。

(2) 标准工作液配制

精密量取上述标准储备液适量, 配制成浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL 的标准工作液。

将磷脂酰胆碱标准工作液, 经 0.45 μm 有机微孔滤膜过滤, 高效液相色谱分析, 记录色谱图, 以磷脂酰胆碱浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到回归方程。

2.2.2 样品前处理

准确称取样品 0.1 g 于 10 mL 容量瓶中, 加正己烷溶解并定容, 超声提取 30 min, 用 0.45 μm 有机微孔滤膜过滤, 滤液放入进样瓶中, 上机测定。

2.2.3 色谱条件

Kromasil 100-5-SIL 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 4.6 μm), 流动相为正己烷:异丙醇:水=0.25:4:1 (V:V:V),

流速设为 0.5 mL/min, 检测波长为 207 nm, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。

3 结果与分析

3.1 提取溶剂选择

本研究考察了不同溶剂下的提取效率。分别采用正己烷, 正己烷-异丙醇-乙酸水 (8:8:1, V:V:V)、甲醇、氯仿、甲醇-氯仿 (1:1, V:V) 超声提取。结果表明, 用正己烷超声提取和甲醇超声提取, 效率较高, 2 种方法提取率无明显差异, 但因甲醇提取会产生较大的溶剂峰, 影响色谱分析, 故选择正己烷超声提取。结果见表 1。

表 1 提取溶剂的选择
Table 1 Selection of extraction solvent

| 提取溶剂 | 提取效率/% |
|----------------------------|--------|
| 正己烷 | 92.3 |
| 甲醇 | 90.8 |
| 正己烷-异丙醇-乙酸水 (8:8:1, V:V:V) | 85.7 |
| 氯仿 | 79.3 |
| 甲醇-氯仿 (1:1, V:V) | 82.9 |

3.2 色谱条件优化

本研究考察了正相和反相两大类流动相体系: 1) 甲醇-乙腈-酸, 色谱图基线不稳, 干扰分析, 很难达到有效分离, 因为甲醇、乙腈在 200~210 nm 有吸收, 而磷脂酰胆碱的检测波长也多在 200~210 nm 范围内, 因此影响检测效果。2) 正己烷-异丙醇-酸 (即 GB 5009.272-2016 方法^[18]), 这种体系虽能分离磷脂酰胆碱, 但色谱峰对称性差, 峰形严重拖尾。本研究尝试采用正己烷-异丙醇-水为流动相, 通过调整三者比例, 当正己烷:异丙醇:水=0.25:4:1 (V:V:V) 时, 色谱图基线平稳, 磷脂酰胆碱与基质中干扰物能完全分离, 且无拖尾现象, 整个分析时间只需 9 min, 而国标方法中磷脂酰胆碱的保留时间为 30 min, 相比国标条件大大缩短了分析时间, 提高了效率, 减少了流动相的使用量, 降低了成本。磷脂酰胆碱标准品色谱图及样品色谱图分别见图 1、图 2。

3.3 线性关系

按 2.2.1 配制的磷脂酰胆碱标准溶液绘制曲线, 磷脂酰胆碱的标准曲线方程为 $Y=8236X-89.774$, 相关系数 $r^2=0.9998$, 表明磷脂酰胆碱浓度在 0.1~2.0 mg/mL 范围内具有良好的线性关系。

3.4 精密度

精密称取 6 份样品, 按 2.2.2 方法处理样品并测定, 计算磷脂酰胆碱的含量及相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD), 计算结果见表 2。6 份样品的 RSD 值为 0.50%, 表明该方法具有良好的精密度。

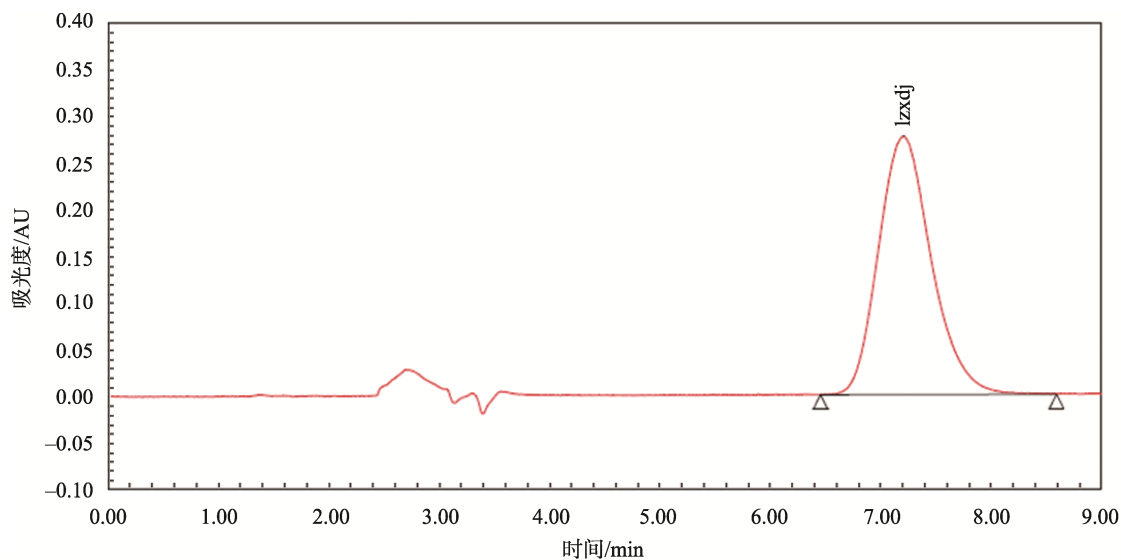


图 1 磷脂酰胆碱标准品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of phosphatidylcholine standard solution

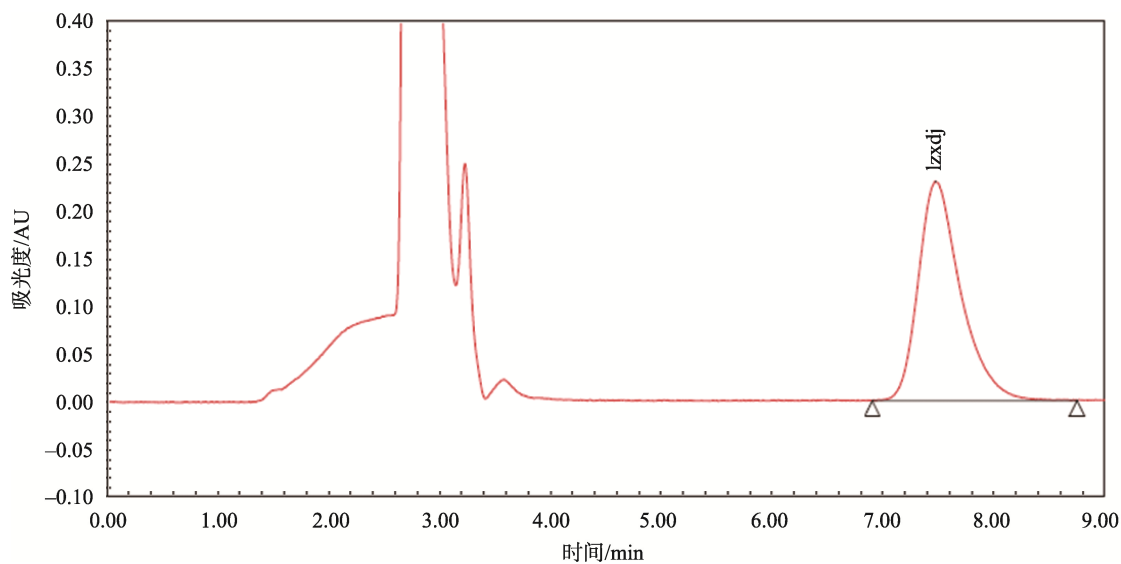


图 2 样品色谱图

Fig. 2 Chromatograms of sample

表 2 精密度实验结果($n=6$)
Table 2 The precision of the experiment ($n=6$)

| 序号 | 称样量/g | 含量/(g/100 g) | 平均含量 /(g/100 g) | RSD/% |
|----|--------|--------------|--------------------|-------|
| 1 | 0.1120 | 15.79 | 15.76 | 0.50 |
| 2 | 0.1008 | 15.68 | | |
| 3 | 0.1150 | 15.88 | | |
| 4 | 0.1089 | 15.71 | | |
| 5 | 0.1037 | 15.69 | | |
| 6 | 0.1123 | 15.81 | | |

3.5 回收率

磷脂酰胆碱在高中低 3 个不同水平下回收率测定结果见表 3, 回收率为 98.01%~98.73%, RSD 为 1.73%~2.25%, 说明该方法准确性良好。

3.6 实际样品测定

用本方法对市售 2 批次大豆磷脂软胶囊中的磷脂酰胆碱含量进行了测定, 样品的检测结果见表 4, 其磷脂酰胆碱含量均大于其标示量。

表 3 加样回收实验结果 ($n=3$)
Table 3 Results of recovery tests ($n=3$)

| 序号 | 加标量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|----|--------|--------|--------|---------|-------|
| 1 | 14.05 | 13.78 | 98.08 | | |
| 2 | 14.05 | 13.52 | 96.23 | 98.01 | 1.78 |
| 3 | 14.05 | 14.01 | 99.72 | | |
| 4 | 17.56 | 17.03 | 96.98 | | |
| 5 | 17.56 | 17.35 | 98.80 | 98.73 | 1.73 |
| 6 | 17.56 | 17.63 | 100.40 | | |
| 7 | 21.07 | 20.54 | 97.48 | | |
| 8 | 21.07 | 20.37 | 96.68 | 98.34 | 2.25 |
| 9 | 21.07 | 21.25 | 100.85 | | |

表 4 2 批大豆磷脂软胶囊样品测定结果
Table 4 Content of 2 batches of phosphatidylcholine in health food

| 样品编号 | 磷脂酰胆碱平均含量/(g/100 g) | 产品中磷脂酰胆碱标示量/(g/100 g) |
|------|---------------------|-----------------------|
| 1 | 15.76 | 14 |
| 2 | 14.12 | 8 |

4 结论与讨论

保健食品具有特定的保健功能, 随着生活水平的提高, 保健品的消费市场越来越广阔。但近年来不法商家在追逐利益最大化的诱惑下, 无视保健食品的质量, 严重影响了保健品市场的管理。本研究通采用国标方法, 优化了样品提取溶剂和液相色谱条件, 结果表明, 以正己烷作为溶剂进行超声提取, 样品提取率较高; 以正己烷:异丙醇:水=0.25:4:1(V:V:V)为流动相时, 磷脂酰胆碱色谱峰与基质峰能完全分离, 且峰型良好分析时间短, 大大提高了分析效率, 降低了成本。本研究建立的 HPLC 法测定大豆磷脂类保健品中磷脂酰胆碱含量, 具有样品处理方法简便, 精确度和回收率高, 分析时间短, 分离效果好等优势, 因此可应用性强, 对控制大豆磷脂类保健品的质量具有重要意义。

参考文献

- [1] 甘宾宾, 蔡卓, 黎少豪. 紫外分光光度法测定卵磷脂保健食品中磷脂酰胆碱含量[J]. 食品工业科技, 2007, 10(28): 219-220.
Gan BB, Cai Z, Li SH. Determination of phosphatidylcholine in lecithin health food by ultraviolet spectrophotometry [J]. Food Ind Sci Technol, 2007, 10(28): 219-220.
- [2] 刘鹏莉, 张双灵, 魏玉良, 等. 分光光度法测定大豆卵磷脂中磷脂酰胆

碱含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2): 555-561.

- Liu PL, Zhang SL, Wei YL, et al. Determination of phosphatidylcholine in soy lecithin by spectrophotometry [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(2): 555-561.
- [3] 王永平, 谭永霞, 肖飞. 卵磷脂保健食品中磷脂酰胆碱的含量测定[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 208-209.
Wang YP, Tan YX, Xiao F. Determination of phosphatidylcholine in lecithin health food [J]. Food Sci, 2005, 26(6): 208-209.
- [4] 关明, 李燕, 赵淑贤. 紫外分光光度法测定卵磷脂胶囊中的磷脂酰胆碱[J]. 中国酿造, 2008, 23(12): 95-96.
Guan M, Li Y, Zhao SX. Determination of phosphatidylcholine in lecithin capsules by ultraviolet spectrophotometry [J]. China Brew, 2008, 23(12): 95-96.
- [5] 王岩, 关明, 陈坚. 双波长扫描法测定卵磷脂中乙酰胆碱的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(6): 546-547.
Wang Y, Guan M, Chen J. Determination of phosphatidylcholine in lecithin capsules by ultraviolet spectrophotometry [J]. Xinjiang Med Univ J, 2003, 26(6): 546-547.
- [6] 邵荣, 吴丽芹, 云志. 薄层扫描测定大豆卵磷脂中磷脂酰胆碱的含量[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 618-621.
Shao R, Wu LQ, Yun Z. Determination of phosphatidylcholine in soy lecithin by thin layer scanning [J]. Food Sci, 2008, 29(12): 618-621.
- [7] 杨路平, 王唯红, 张君仁. 薄层扫描法测定大豆磷脂及蛋磷脂中磷脂酰胆碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(9): 1067-1069.
Yang LP, Wang WH, Zhang JR. Determination of phosphatidylcholine in soybean phospholipids and egg phospholipids by TLC scanning [J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(9): 1067-1069.
- [8] 那海秋, 董宇, 周兆梅, 等. 高效液相色谱法测定大豆磷脂类保健食品中磷脂酰胆碱[J]. 理化检验-化学分册, 2013, 49(6): 728-730.
Na HQ, Dong Y, Zhou ZH, et al. Determination of phosphatidylcholine in soybean phospholipid health food by high performance liquid chromatography [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2013, 49(6): 728-730.
- [9] 杨亦文, 李艳, 吴彩娟, 等. 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.
Yang YW, Li Y, Wu CJ, et al. Rapid and accurate determination of soybean phosphatidylcholine by HPLC-RI [J]. J Instrum Anal, 2004, 23(5): 118-121.
- [10] 杨艳, 华永有, 林宏琳. 高效液相色谱法测定保健食品中磷脂酰胆碱含量[J]. 海峡预防医学杂志, 2014, 20(2): 40-42.
Yang Y, Hua YY, Lin HL. Determination of phosphatidylcholine in health foods by high performance liquid chromatography [J]. Strait J Prev Med, 2014, 20(2): 40-42.
- [11] 曹栋. HPLC-ESLD 法分离测定大豆磷脂酰胆碱[J]. 中国油脂, 2005, 30(12): 43-45.
Cao D. Separation and determination of soybean phosphatidylcholine by HPLC-ESLD [J]. China Oil, 2005, 30(12): 43-45.
- [12] 黄思静, 汪义杰, 朱斌. 超高效液相色谱-高分辨质谱法测定磷脂酰胆碱的含量[J]. 化学试剂, 2008, 40(4): 341-344.
Huang SJ, Wang YJ, Zhu B. Determination of phosphatidylcholine by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. Chem Reag, 2008, 40(4): 341-344.
- [13] 崔常乐, 滕英来, 汪勇, 等. 核磁共振磷谱内标法测定磷脂酰胆碱的含量[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(5): 158-162.

- Cui CL, Teng YL, Wang Y, *et al.* Determination of phosphatidylcholine by NMR internal standard method [J]. *Chin Cereal Oil Ass*, 2016, 31(5): 158–162.
- [14] Nzai JM. Soy lecithin phospholipid determination by fourier transform infrared spectroscopy and the acid digest/arsenoolybdate method: A comparative study [J]. *JAOCS*, 1999, 76(1): 61–66.
- [15] 杨海锋, 赵志辉, 顾赛红, 等. 饲料级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 HF, Zhao ZH, Gu SH, *et al.* Detection of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol in feed grade soybean phospholipids [J]. *China Feed*, 2010, (6): 41–43.
- [16] 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]. *化工时代*, 2008, 22(11): 35–37.
- Wu LQ, Shao R, Yun Z. Determination of phosphatidylcholine in soy lecithin by high performance liquid chromatography [J]. *Chem Ind Tim*, 2008, 22(11): 35–37.
- [17] 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, 22(10): 54–56.
- Guan M, Wang Y, Chen J. Determination of phosphatidylcholine in lecithin by high performance liquid chromatography [J]. *Chem Bioeng*, 2005, 22(10): 54–56.
- [18] GB 5009.272-2016 食品中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇的测定[S].
- GB 5009.272-2016 Determination of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol in food [S].

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



刘彬丽, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: liubinli2011@163.com



曹进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品分析。

E-mail: caojin@tsinghua.org.cn