

高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定 保健食品中磷脂酰丝氨酸

游景水*, 莫毅梅, 林 丽, 梁洁仪

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测法检测保健食品中磷脂酰丝氨酸的含量。**方法** 将样品用氯仿+甲醇(9:1, *V:V*)提取液溶解定容后过膜, 采用高效液相色谱法(正相色谱柱, 蒸发光散射检测器)进行检测, 流动相为正己烷+异丙醇+水+乙酸+三乙胺(36:55:8:1.5:0.08, *V:V:V:V:V*), 外标法定量。**结果** 在 40~1000 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内磷脂酰丝氨酸浓度的自然对数与峰面积的自然对数线性关系良好, 相关系数为 0.9991, 加标回收率为 99.00%~100.15%, 相对标准偏差为 0.3%~0.7%。**结论** 该方法操作简便、准确、重现性好, 适用于保健食品中磷脂酰丝氨酸含量的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 磷脂酰丝氨酸; 正相色谱柱

Determination of phosphatidylserine in health food by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector

YOU Jing-Shui*, MO Yi-Mei, LIN Li, LIANG Jie-Yi

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of phosphatidylserine in health food by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection. **Method** The sample was dissolved in extract solution with chloroform/methanol (9:1, *V:V*) to a fixed volume and then passed through the membrane and detected by high performance liquid chromatography (normal phase chromatographic column, evaporative light scattering detector). The mixture of n-hexane, isopropanol, water, acetic acid and triethylamine (36:55:8:1.5:0.08, *V:V:V:V:V*) was chosen as the mobile phase and quantified with external standard method. **Results** The natural logarithm of phosphatidyl serine concentration in the range of 40-1000 $\mu\text{g/mL}$ had a good linearity with the natural logarithm of the peak area, and the correlation coefficient was 0.9991. The recoveries were 99.5%-100.15% and the relative standard deviations were 0.3%-0.7%. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which is suitable for the determination of phosphatidylserine in health food.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; phosphatidylserine; normal phase chromatographic column

*通讯作者: 游景水, 执业药师, 质量工程师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: youjingsui@163.com

*Corresponding author: YOU Jing-Shui, Pharmacist, Engineer, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: youjingsui@163.com

1 引言

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)又称复合神经酸,是细胞膜中的活性物质,存在于人类大脑细胞中,能够从天然大豆榨油的剩余物中提取得到。主要功能是改善神经细胞功能,调节神经脉冲的传导,增进大脑记忆功能。磷脂酰丝氨酸具有很强的亲脂性,吸收后能够迅速通过血脑屏障进入大脑,起到舒缓血管平滑肌细胞,增加脑部供血的作用^[1,2]。而磷脂作为一种生物活性物质,有着独特的理化性质和营养价值,具有调节血脂、改善记忆、保护肝脏、健脑益智、以及延缓衰老等功效,被广泛应用于食品、保健品、医药以及饲料行业中^[3-13]。

目前国内外关于磷脂酰丝氨酸的标准检测方法较少报道,但有相关的研究报道,使用反相高效液相色谱法^[3]、高效液相色谱-紫外可见检测法进行检测^[3,4];而磷脂酰丝氨酸没有发色基团,紫外可见吸收信号弱,采用紫外可见检测器无法产生灵敏的信号响应^[14,15];因此有必要研究一种灵敏度更高、更准确的方法来检测保健食品中磷脂酰丝氨酸的含量。鉴于目前国内外现有方法的缺陷,本研究采用蒸发光散射检测器与高效液相色谱法相结合用来测定保健食品中磷脂酰丝氨酸的含量,灵敏度高,且更容易普及。

2 材料与方

2.1 材料与仪器

磷脂酰丝氨酸对照品(97.0%,美国 Sigma 公司);实验用水(一级水);氯仿、甲醇(色谱纯,上海星可高纯溶剂有限公司);正己烷、异丙醇(色谱纯,德国 CNW 公司);软胶囊保健食品(汤臣倍健股份有限公司)。

Waters e2695 高效液相色谱仪(配有蒸发光散射检测器,美国 Waters 公司);XP 205 型电子天平(梅特勒-托利多国际贸易有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱:不锈钢正相色谱硅胶柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm)^[14,15]或同等性能的色谱柱;柱温:45 °C;蒸发光散射检测器参数:飘移管(Drift tube)温度 100 °C;喷雾气流量(Nebulizer gas flow rate)2.8 mL/min;流动相:正己烷+异丙醇+水+乙酸+三乙胺(36:55:8:1.5:0.08, V:V:V:V:V);流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL;运行时间:25 min。

2.2.2 标准溶液的配制

标准储备液的配置:精密称取磷脂酰丝氨酸标准品 20.0 mg,用氯仿/甲醇提取液(9:1, V:V)溶解,在容量瓶中定容至 10 mL,配制浓度为 2.0 mg/mL 的标准溶液。标准溶液置于 4 °C 冰箱中避光保存。

标准工作液的配制:精密量取标准储备液 0.2、0.5、1.0、2.0 和 5.0 mL 至 10 mL 容量瓶中,得到浓度为 40、100、200、400 和 1000 μg/mL 的标准工作液。

将标准工作液,经 0.45 μm 的有机微孔滤膜过滤,进样量 10 μL,用高效液相色谱分析,记录色谱图,以标准品浓度(X)的自然对数为横坐标,标准品的峰面积(Y)的自然对数为纵坐标,绘制标准曲线,求得回归方程。

2.2.3 样品前处理

取保健品软胶囊 10 粒,剪开胶囊挤出内容物于小烧杯中,搅拌混合均匀,精密称取 0.3 g,用氯仿/甲醇提取液(9:1, V:V)溶解并定容到 100 mL,0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样量 10 μL,上机测定。

3 结果与分析

3.1 柱温及检测器的选择

3.1.1 柱温的选择

实验研究了 40、45 和 50 °C 的恒温条件下磷脂酰丝氨酸的分离情况,结果表明,采用 45 °C 柱温可以将样品中磷脂酰丝氨酸色谱峰与共存组分分离,且分析周期短,峰形良好,故选择柱温温度为 45 °C。

3.1.2 检测器的选择

磷脂酰丝氨酸没有发色基团,紫外可见吸收信号弱,也没有荧光信号,紫外可见检测器或荧光检测器不能对其灵敏识别,而蒸发光散射检测器作为一种通用型检测器,不受被测物质的光学特性的影响,且具有较高的灵敏度,因此采用蒸发光散射检测器。

3.2 方法学考察

3.2.1 样品与标准品色谱图

测定空白溶液的色谱图,以考察空白试剂在同样的条件下对目标峰的干扰情况。与磷脂酰丝氨酸标准品溶液的色谱峰保留时间对比,实验结果表明空白溶液在磷脂酰丝氨酸色谱峰的保留时间处未出现色谱峰,表明空白溶液无干扰。空白色谱图、磷脂酰丝氨酸标准品色谱图及样品色谱图分别见图 1~3。

3.2.2 线性实验

将配制的磷脂酰丝氨酸标准溶液上机检测,结果绘制标准曲线,标准品溶液浓度的自然对数与峰面积自然对

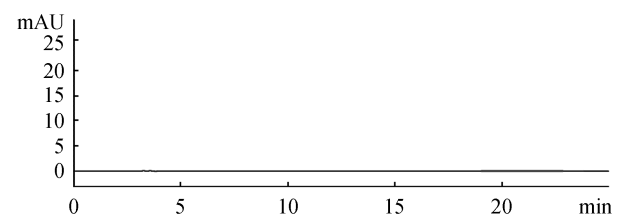


图1 空白色谱图

Fig. 1 Chromatogram of blank

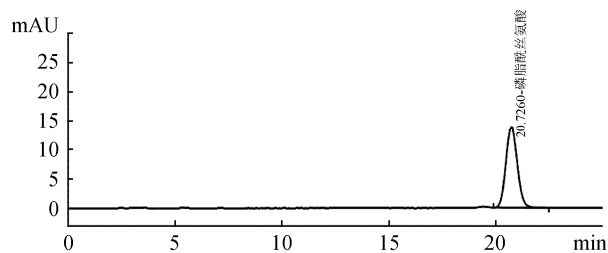


图 2 磷脂酰丝氨酸标准品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of phosphatidylserine standard

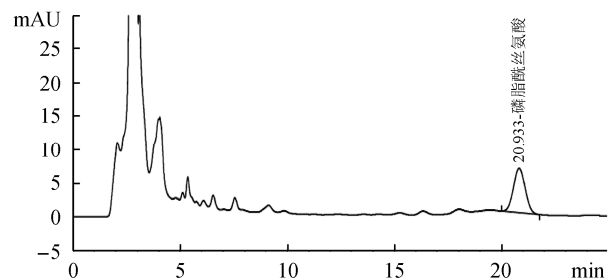


图 3 样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of sample

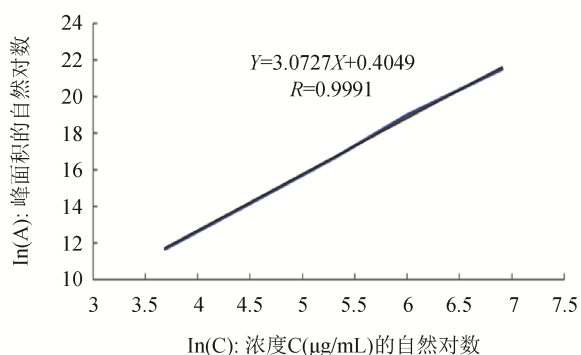


图 4 磷脂酰丝氨酸的标准曲线

Fig. 4 Standard curve of phosphatidylserine

数线性关系见图 4。在磷脂酰丝氨酸浓度为 40~1000 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内, 标准曲线方程 $Y=3.0727X+0.4049$, $R=0.9991$, 线性关系良好。

3.2.3 检出限和定量限

分析方法的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantification, LOQ)由信噪比(S/N)计算。LOD 定义为 $S/N=3$ 时对应的待分析浓度, 结果为 0.48 g/kg, LOQ 定义为 $S/N=10$ 时对应的待分析浓度, 结果为 1.6 g/kg。

3.2.4 精密度实验

称取 6 份样品, 按 2.2.3 步骤处理样品并测定, 根据标准曲线方程计算磷脂酰丝氨酸含量及其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 结果见表 1, 该方法用于磷脂酰丝氨酸的含量, RSD 为 0.8%, 精密度良好, 符合 GB/T 27404-2008^[16]的精密度的要求(精密度 $< 2.0\%$)。

3.2.5 回收率实验

称取实际样品 9 份, 每份约 0.3 g(约相当于 20 mg 磷脂酰丝氨酸), 分成 3 组, 每组分别加入磷脂酰丝氨酸标准品 15、20、25 mg, 按 2.2.3 操作测定。磷脂酰丝氨酸标准品的回收率结果见表 2, 3 个不同添加水平下浓度的回收率在 99.00%~100.15%之间, 相对标准偏差在 0.3%~0.7%之间, 符合 GB/T 27404-2008^[16]回收率与精密度的要求(规定回收率: 95%~105%, 精密度 $< 2.0\%$), 证明该方法具有良好的准确度。

表 1 精密度结果
Table 1 Results of precision

序号	称样量(g)	测定含量(%)	平均测定含量(%)	RSD(%)
1	0.3025	6.42		
2	0.2988	6.36		
3	0.3107	6.38		
4	0.3024	6.45	6.38	0.8
5	0.2956	6.31		
6	0.2941	6.39		

表 2 加标回收率实验结果($n=3$)

序号	理论加标量(mg)	实际测得标准品量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
第一组	15.02	14.87	99.00		
	15.13	15.05	99.47	99.32	0.3
	15.26	15.20	99.61		
第二组	19.85	19.88	100.15		
	20.03	19.80	98.85	99.42	0.7
	20.16	20.01	99.26		
第三组	25.20	25.09	99.56		
	24.78	24.80	100.08	99.81	0.3
	25.07	25.02	99.80		

3.3 实际样品测定

采用本方法对 6 个批次保健食品中的磷脂酰丝氨酸含量进行了测定, 样品的检测结果见表 3。结果表明, 检测值与产品的标示值的相对偏差范围为 0.3%~2.1%, 符合 GB/T 27404-2008^[16]的准确度要求(准确度 $< 5\%$)。

4 结论

本研究采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定保健食品中磷脂酰丝氨酸, 解决了磷脂酰丝氨酸因没有发色

表3 6批保健食品中磷脂酰丝氨酸检测结果($n=6$)
Table 3 Contents of phosphatidylserine in 6 batches of health food ($n=6$)

样品 编号	磷脂酰丝氨酸 检测含量(%)	产品中磷脂酰丝氨酸 酸标示含量(%)	检测值与标示值 的相对偏差(%)
1	6.44		0.3
2	6.35		0.8
3	6.33	6.4	1.1
4	6.27		2.1
5	6.3		1.6
6	6.46		0.9

基团而无法用常规紫外检测器和荧光检测器的难题, 精密度, 准确度和加标回收率均满足实验检测要求, 且该方法操作简便、快速, 可以准确检测保健食品中磷脂酰丝氨酸的含量。

参考文献

- [1] Mark AM, Steven FM, Gilles OE. Brain-specific nutrients: A memory cure [J]. *Nutrition*, 2003, 19(11/12): 957-975.
- [2] Hellhammer J. Effects of soy lecithin phosphatidic acid and phosphatidylserine complex (PAS) on the endocrine and psychological responses to mental stress [J]. *Stress*, 2004, 7(2): 119-126.
- [3] Lin Q, Zhang J, Pei WJ, *et al.* Determination of phosphatidylserine in milk-based nutritional products using online derivatization high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1381: 260.
- [4] 石丹, 王晓彦, 魏显纲, 等. 高效液相色谱检测奶粉中磷脂酰丝氨酸分析方法的建立[J]. *营养学报*, 2015, 37(1): 88.
Shi D, Wang XY, Wei XG, *et al.* Establishment of analytical method for detection of phosphatidylserine in milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *Acta Nutr Sin*, 2015, 37(1): 88.
- [5] Mackenzie A, Vyssotski M, Nekrasov E. Quantitative analysis of dairy phospholipids by ^{31}P NMR [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2009, 86(8): 757.
- [6] 王明娟, 胡昌勤, 金少鸿. 蒸发光散射检测器在药物分析及其它方面的应用[J]. *中国药事*, 2002, 16(7): 431-433.
Wang MJ, Hu CQ, Jin SH. Evaporative light scattering detector in drug analysis and its application in this field [J]. *Chin Pharm Aff*, 2002, 16(7): 431-433.
- [7] 周芳, 李洪军, 杨复习, 等. 磷脂酰丝氨酸研究进展[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(5): 297-300.
Zhou F, Li HJ, Yang FX, *et al.* Progress in research on phosphatidyl serine

[J]. *Food Ind Sci Technol*, 2008, 29(5): 297-300.

- [8] 陈建琴. 蒸发光散射检测器在氨基糖苷类抗生素中的应用进展[J]. *中国药业*, 2008, 17(14): 78-80.
Chen JQ. Application of evaporative light scattering detector in aminoglycoside antibiotics [J]. *Chin Pharm Ind*, 2008, 17(14): 78-80.
- [9] 冯雷刚, 周红梅, 胡光祥, 等. 磷脂酰丝氨酸的应用研究[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(9): 191-193.
Feng LG, Zhou HM, Hu GX, *et al.* Application of phosphatidyl serine [J]. *Food Res Dev*, 2006, 27(9): 191-193.
- [10] Kim HY. Biochemical and biological functions of docosahexaenoic acid in the nervous system: Modulation by ethanol [J]. *Chem Phys Lipids*, 2008, 153(1): 34.
- [11] 刘平, 舒良. 磷脂酰丝氨酸的药理及临床应用研究进展[J]. *国外医学(药学分册)*, 1991, 18(4): 207-210.
Liu P, Shu L. Progress in pharmacology and clinical application of phosphatidyl serine [J]. *Foreign Med Sci Section Pharm*, 1991, 19(4): 207-210.
- [12] 王巧娥, 丁明玉. 蒸发光散射检测技术研究进展[J]. *分析测试学报*, 2006, 25(6): 126-132.
Wang QE, Ding MY. Research progress of evaporative light scattering detection technique [J]. *J Instrum Anal*, 2006, 25(6): 126-132.
- [13] Liu SH, Chang CD, Chen PH, *et al.* Docosahexaenoic acid and phosphatidylserine supplementations improve antioxidant activities and cognitive functions of the developing brain on pentylenetetrazolinduced seizure model [J]. *Brain Res*, 2012, 1451: 19.
- [14] Yang SL, Duan ZQ. Insight into enzymatic synthesis of phosphatidylserine in deep eutectic solvents [J]. *Catal Commun*, 2016, (82): 16.
- [15] 吴厚生, 程晓放, 程立. 一种新的肿瘤免疫抑制因子-磷脂酰丝氨酸[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(1): 55-57.
Wu HS, Cheng XF, Cheng L. A new tumor immunosuppressive factor-phosphatidyl serine [J]. *Chin J Cancer Biother*, 1999, 6(1): 55-57.
- [16] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
GB/T 27404-2008 Laboratory quality control specification food physical and chemical testing [S].

(责任编辑: 姜 珊)

作者简介



游景水, 执业药师、质量工程师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: youjingsui@163.com