

高效液相色谱法测定保健食品中 磷脂酰丝氨酸含量

刘光兰*, 吴 银, 陈彩云, 郑海蓉
(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱法测定磷脂酰丝氨酸含量的分析方法。**方法** 样品经过三氯甲烷溶解, 以正己烷:异丙醇:1%磷酸水溶液=(25:70:5, V:V:V)为流动相, 等度洗脱, 经 SIL 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)分离, 并于 205 nm 波长下检测。**结果** 磷脂酰丝氨酸在浓度 0.13504~0.67520 mg/mL 之间呈现良好的线性关系, $r^2=0.9993$, 平均回收率为 96.16%~99.60%, 相对标准偏差为 1.1%。**结论** 该方法测定保健食品中磷脂酰丝氨酸含量具专属性强, 耗时短、操作简便、准确、重现性好, 可在实验室推广。**关键词:** 高效液相色谱法; 保健食品; 磷脂酰丝氨酸

Determination of phosphatidylserine in health food by high performance liquid chromatography

LIU Guang-Lan*, WU Yin, CHEN Cai-Yun, ZHENG Hai-Rong
(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 (HPLC). **Methods** Samples were dissolved by chloroform and separated by SIL chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase consisting of n-hexane: isopropanol: 1%phosphoric acid water (25:70:5, V:V:V) by isocratic elution. The detection wave length was 205 nm. **Results** Phosphatidylserine had a good linear relationship in range of 0.13504~0.67520 mg/mL ($r^2=0.9993$), the average recovery was 96.16%~99.60%, and the relative standard deviation was 1.1%. **Conclusion** This method has the advantages of high specificity, short time, simple operation, accuracy and good reproducibility in the determination of phosphatidylserine in health food, which can be popularized in the laboratories.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; health food; phosphatidylserine

1 引 言

磷脂酰丝氨酸又称二酰甘油磷脂酰丝氨酸^[1-4], 是细胞膜组分之一, 尤其在人体的神经系统, 是大脑的细胞膜的重要组成部分, 被誉为“脑黄金”DHA 之后的一大新兴的“智能营养素”^[5], 常用的检测方法为高效液相色谱法(蒸发光检测器)^[6-11]。由于蒸发光检测器为通用型检测器, 其专

属性有限, 灵敏度相对较低, 且仅能使用具有挥发性的试剂, 所能选用的试剂比较局限, 在样品处理过程中三氯甲烷等有毒试剂用量比较大, 易对人体造成伤害。在以往的相关研究中, 对其研究的相关文献比较少^[12,13], 用高效液相色谱法(紫外检测器)分离的研究也不多^[7,14]。本研究采用高效液相色谱法(紫外检测器)检测磷脂酰丝氨酸的含量, 并优化其检测条件, 以期对磷脂酰丝氨酸的研究与检测提

*通讯作者: 刘光兰, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 1048005722@qq.com

*Corresponding author: LIU Guang-Lan, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 1048005722@qq.com

供依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

1260 高效液相色谱仪(配紫外检测器, 美国安捷伦公司); EQ-500 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SIL 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm, 日本岛津公司)。

磷脂酰丝氨酸对照(批号: SLCB0702; 含量: 96.9%, 德国 Sigma 公司); 异丙醇、正己烷(色谱纯, 德国 CNW 公司); 磷酸、三氯甲烷(分析纯, 广州化学试剂公司); 样品为含磷脂酰丝氨酸类软胶囊。

2.2 色谱条件

色谱柱: SIL 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm, 日本岛津公司); 流动相: 正己烷:异丙醇:1%磷酸水溶液=(25:70:5, V:V:V), 梯度洗脱; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 5 μL; 检测器: 紫外检测器; 运行时间: 23 min, 检测波长: 205 nm。

2.3 实验方法

2.3.1 标准系列溶液的配制

(1)标准储备液的配制

磷脂酰丝氨酸: 精密称取磷脂酰丝氨酸标准品适量, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 先加入 25.00 mL 三氯甲烷, 使其溶解, 再用正己烷:异丙醇(25:75, V:V)的混合溶液, 定容, 摇匀, 即得磷脂酰丝氨酸标准储备液(0.3376 mg/mL)。

(2)标准溶液的配制

精密吸取磷脂酰丝氨酸标准储备液, 分别配制浓度为 0.1350、0.3376、0.4051、0.5402、0.6752 mg/mL 的标准溶液, 其中用正己烷:异丙醇(35:65, V:V)为溶剂定容至刻度, 经 0.45 μm 滤膜过滤后, 精密吸取标准溶液 5 μL 进样。

2.3.2 供试品溶液配制

称取混匀的测试样适量置于 25 mL 棕色容量瓶中, 先加入 5.00 mL 三氯甲烷, 使其溶解, 再用正己烷: 异丙醇(25:75, V:V)的混合溶液, 定容, 摇匀, 经 0.45 μm 的滤膜过滤, 即得供试液。进样 5 μL, 在 2.2 色谱条件下, 进行分析测定。

2.3.3 精密度实验

精密称取测试样 6 份, 按 2.3.2 试样制备方法处理样品, 检测样品含量, 计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.3.4 稳定性实验

取同一批供试品溶液置于室温下分别放置 0、5、10、15、20、24 h 后进样, 测定其峰面积的相对标准偏差。

2.3.5 加标回收率实验

精密称取约 0.05 g 样品 9 份(已知样品的磷脂酰丝氨酸含量: 6.0%), 分成 3 组, 每组 3 份, 各组分别精密加入磷脂酰丝氨酸储备液(浓度: 0.33760 mg/mL) 6.00、8.00、

10.00 mL, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜过滤后, 作为加标样品溶液, 取该样品溶液 5 μL 进样。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的确定

采用正己烷:异丙醇:1%磷酸水溶液=(25:70:5, V:V:V)为流动相, 梯度洗脱 23 min 就能把样品中磷脂酰丝氨酸洗脱出, 流动相的比例使磷脂酰丝氨酸不受其他杂质峰的影响, 达到准确的分离和定量, 见图 1、2。

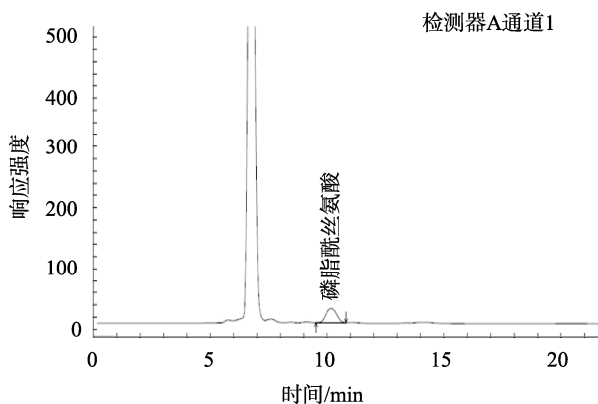


图 1 样品色谱图

Fig.1 Chromatogram of the sample

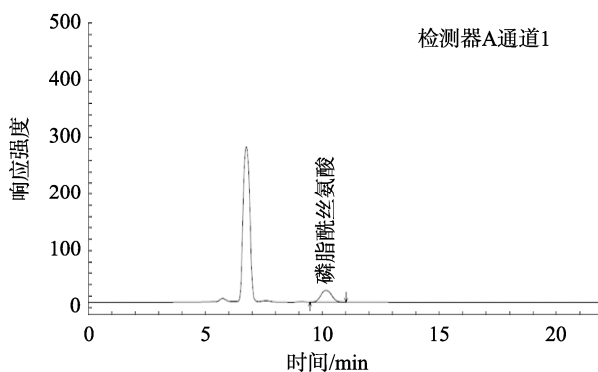


图 2 标准品色谱图

Fig.2 Chromatogram of standard

3.2 线性关系

以磷脂酰丝氨酸峰面积 Y 为纵坐标, 磷脂酰丝氨酸标准溶液浓度(X , mg/mL)为横坐标绘制标准曲线, 磷脂酰丝氨酸线性方程为 $Y=2.0 \times 10^{-7}X-0.0135$, 相关系数 r^2 均为 0.9993, 用该方法测定磷脂酰丝氨酸的含量, 在浓度 0.13504~0.67520 mg/mL 之间呈现良好的线性关系。

3.3 检出限

分析方法的定量限(limit of quantitation, LOQ)和检出限(limit of detection, LOD)由信噪比(S/N)计算。LOD 定义为 $S/N=3$ 时对应的待分析物浓度, LOQ 定义为 $S/N=10$ 时对应的分析物浓度。结果显示, 当样品取样量为 0.0600 g, 稀释体积为 25 mL 时, 磷脂酰丝氨酸的检出限为 0.187 mg/g, 满足检测的条件。

3.4 精密度

精密度结果见表 1, 结果显示磷脂酰丝氨酸的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.9%, 具有较好

的精密度, 可以用于磷脂酰丝氨酸的测定。

3.5 稳定性

取同一批供试品溶液置于室温分别放置 0、5、10、15、20、24 h 后进样, 得到峰面积的 RSD 为 0.9%, 说明供试品溶液的磷脂酰丝氨酸在室温条件下放置 24 h 稳定。

3.6 加标回收率

加标回收率结果见表 2, 在不同添加水平下, 测试样品中磷脂酰丝氨酸方法的回收率范围为 96.16%~99.60%, 平均回收率为 97.70%, RSD 为 1.1%, 由此可见该方法对磷脂酰丝氨酸的含量测定科学有效。

表 1 磷脂酰丝氨酸精密度实验结果($n=6$)
Table 1 Results precision of phosphatidylserine ($n=6$)

序号	称样量/g	稀释体积/mL	浓度/(mg/mL)	含量/(mg/g)	平均含量/(mg/g)	RSD/%
1	0.06793	25	0.1574555	57.948	57.690	0.9
2	0.06596	25	0.1501395	56.906		
3	0.06599	25	0.1519872	57.580		
4	0.06802	25	0.1580257	58.081		
5	0.06505	25	0.1512526	58.129		
6	0.06508	25	0.1496892	57.502		

表 2 磷脂酰丝氨酸加标回收率实验结果($n=9$)
Table 2 Results standard recovery rate of phosphatidylserine($n=9$)

序号	样品称样量/g	样品质量浓度/(mg/mL)	测得加入对照品量/mg	实际加标量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.05302	0.20149	1.9787	2.02559	97.68	97.70	1.1
2	0.05405	0.20543	2.0176	2.02559	99.60		
3	0.05413	0.20481	1.9975	2.02559	98.61		
4	0.05017	0.22088	2.6276	2.70079	97.29		
5	0.05021	0.22145	2.6397	2.70079	97.73		
6	0.05022	0.22097	2.6271	2.70079	97.27		
7	0.05056	0.24911	3.3109	3.3759	98.07		
8	0.05045	0.24627	3.2464	3.3759	96.16		
9	0.05002	0.24609	3.2666	3.3759	96.76		

4 结论与讨论

本研究建立了高效液相色谱法测定磷脂酰丝氨酸含量的检测方法, 用正己烷:异丙醇:1%磷酸水溶液(=25:70:5, V:V:V)为流动相, 等度洗脱; 流速: 0.5 mL/min, 结果表明本研究在线性范围 0.13504~0.67520 mg/mL 之间呈现良好的线性关系, 检出限为 0.187 mg/g, 精密度为 0.9%, 磷脂酰丝氨酸在室温条件下放置 24 h 稳定, 平均

回收率为 97.70%, 因此在本方法的条件下可以获得良好的检测效果。该方法前处理简便、检测结果准确, 分离效果好, 在实际工作中可以有效地提高检测效率, 达到准确的检测要求。

参考文献

- [1] 姚娜, 张小里, 赵彬侠, 等. 磷脂酶 D 催化大豆磷脂合成磷脂酰丝氨酸工艺[J]. 化工进展, 2011, (1): 281-284.
Yao N, Zhang XL, Zhao BX, et al. Synthesis of phosphatidyl serine from

- soybean phospholipid catalyzed by phospholipase D [J]. *Chem Ind Eng Prog*, 2011, (1): 281–284.
- [2] 卢欣睿, 崔亚顺, 王培琪, 等. PSS 定点突变及酶活研究[J]. *微生物学杂志*, 2014, (6): 94–97.
Lu XR, Cui YS, Wang PQ, *et al.* PSS site-directed mutation and enzymatic research [J]. *J Microbiol*, 2014, (6): 94–97.
- [3] 饶雪娥, 林伟铃. 磷脂酰丝氨酸的应用研究进展[J]. *海峡药学*, 2015, (11): 9–11.
Rao XE, Lin WL. Progress in the application of phosphatidyl serine [J]. *Strait Pharm J*, 2015, (11): 9–11.
- [4] 游景水, 莫毅梅, 梁洁仪, 等. 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[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(10): 2537–2540.
You JS, Mo YM, Liang JY, *et al.* Determination of phosphatidylserine in health food by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(10): 2537–2540.
- [5] 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, (1): 88–92.
Shi D, Wang XY, Wei XG, *et al.* Establishment of HPLC method for determination of phosphatidyl serine in milk powder [J]. *Acta Nutr Sin*, 2015, (1): 88–92.
- [6] 黄兴民, 郑家概, 张飞杨, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定保健食品中磷脂酰丝氨酸的方法优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(12): 3806–3810.
Huang XM, Zheng JG, Zhang FY, *et al.* Optimization of HPLC method for determination of phosphatidylserine in health food by evaporative light scattering method [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(12): 3806–3810.
- [7] 王小宾, 张秉华, 杨树民, 等. HPLC-ELSD 测定磷脂酰丝氨酸和磷脂酰胆碱含量的方法研究[J]. *西北药学杂志*, 2018, (3): 337–340.
Wang XB, Zhang BH, Yang SM, *et al.* HPLC-ELSD method for determination of phosphatidylserine and phosphatidylcholine [J]. *Northwest Pharm J*, 2018, (3): 337–340.
- [8] 王国祥, 戴琛, 张春华. 高效液相色谱蒸发光散射检测器测定乳制品中磷脂类化合物[J]. *工程科技*, 2018, (1): 246–248.
Wang GX, Dai C, Zhang CH. Determination of Phospholipids in dairy products by high performance liquid chromatography evaporative light scattering detector [J]. *Eng Technol*, 2018, (1): 246–248.
- [9] 张艳杰. 添加植物甾醇酯和磷脂酰丝氨酸对营养粉特性的影响[J]. *食品工业*, 2018, (2): 135–138.
Zhang YJ. Effects of adding phytosterol ester and phosphatidylserine on the characteristics of nutritional powder [J]. *Food Ind*, 2018, (2): 135–138.
- [10] 薛姣, 顾业伟, 韩玉谦. DHA 型磷脂酰丝氨酸对东莨菪碱痴呆模型小鼠学习记忆力的影响[J]. *中国海洋药物*, 2020, (1): 30–34.
Xue J, Gu YW, Han YQ. Effect of DHA-type phosphatidylserine on learning and memory of mice with scopolamine dementia [J]. *Chin J Mar Drug*, 2020, (1): 30–34.
- [11] 苏永恒, 张伟, 马青青. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定保健食品中的磷脂酰丝氨酸[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(6): 792–794.
Su YH, Zhang W, Ma QQ, Huang XM. Determination of phosphatidylserine in health food by high performance liquid chromatograph with evaporative light scattering detector [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(6): 792–794.
- [12] 周彦峰, 张涛, 江波, 等. 磷脂酰丝氨酸的酶法制备与分离研究进展[J]. *中国油脂*, 2018, (10): 60–64.
Zhou YF, Zhang T, Jiang B, *et al.* Research progress of enzymatic preparation and separation of phosphatidylserine [J]. *China Oils Fats*, 2018, (10): 60–64.
- [13] 陈玉莹, 吴俊. 微颗粒研究进展[J]. *临床检验杂志*, 2019, (9): 691–694.
Chen YT, Wu J. The research progress of microparticles [J]. *Chin J Clin Lab Sci*, 2019, (9): 691–694.
- [14] 张飞, 蔡大川, 冉文清, 等. 响应面优化-HPLC-ELSD 法测定明胶型凝胶糖果中的磷脂酰丝氨酸[J]. *分析实验室*, 2019, (11): 59–64.
Zhang F, Cai DC, Ran WQ, *et al.* Response surface optimization-HPLC-ELSD method for determination of phosphatidylserine in gelatin jelly candy [J]. *Chin J Anal Lab*, 2019, (11): 59–64.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



刘光兰, 主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: 1048005722@qq.com