

# 蒸发光散射液相色谱法测定保健食品中磷脂酰胆碱的含量

张丹, 杨芳芳, 孙艳梅

洛阳市疾病预防控制中心, 河南 洛阳 471000

**摘要:** **目的** 采用蒸发光散射检测器, 建立高效液相色谱法测定保健食品中磷脂酰胆碱的含量。 **方法** 以正己烷-异丙醇水溶液 (0.1% 的三乙胺, 三氟乙酸调 pH 至 3.5) 为流动相, 采用正相硅胶色谱柱和蒸发光散射检测器, 高效液相色谱仪测定保健食品中磷脂酰胆碱的含量。 **结果** 在 0.05~2.0 mg/ml 范围内, 蒸发光散射检测器响应值的对数与磷脂酰胆碱质量浓度的对数线性相关, 检测限为 0.02 mg/ml。样品加标回收率为 93.7%~102.3%, 精密度 ( $n=7$ ) 在 1.3% 以下。 **结论** 液相色谱蒸发光散射法能够快速测定保健食品中磷脂酰胆碱的含量, 具有操作简便、准确度高和重现性好等优点, 适用于保健食品中磷脂酰胆碱含量的测定。

**关键词:** 高效液相色谱; 蒸发光散射检测器; 保健食品; 磷脂酰胆碱

**中图分类号:** R944.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2020)10-1271-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.10.032

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

ZHANG Dan, YANG Fang-fang, SUN Yan-mei

Luoyang Municipal Center for Disease Control and Prevention, Luoyang, Henan 471000, China

**Abstract:** **Objective** To establish a method for determination of phosphatidylcholine in health food by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD). **Methods** Using n-hexane-isopropanol aqueous solution (0.1% triethylamine and pH 3.5 adjusted by trifluoroacetic acid) as mobile phase, phosphatidylcholine in health food samples was determined by HPLC-ELSD equipped with a silica gel column. **Results** In the range of 0.05 mg/ml-2.0 mg/ml, the logarithm of the response value of ELSD was linearly related to the logarithm of the concentration of phosphatidylcholine, and the detection limits were 0.02 mg/L. The recovery rates were 93.7%-102.3%, and the precision ( $n=7$ ) was less than 1.3%.

**Conclusions** The developed HPLC-ELSD method can rapidly determine the content of phosphatidylcholine in health food with the advantages of simple operation, high accuracy and good reproducibility, and it is suitable for determination of phosphatidylcholine content in health food.

**Key words:** high performance liquid chromatography; evaporative light scattering detector; health food; phosphatidylcholine

磷脂酰胆碱是人体细胞的重要组成成分, 主要存在于心、肝、脑、肾等器官中。磷脂酰胆碱能够调节人体的脂肪吸收, 具有降血脂、降胆固醇, 辅助治疗动脉硬化的功能。同时还能增强大脑的活力, 修复受损脑细胞和预防老年痴呆症, 对脑卒中、心肌梗死、冠心病及肾功能障碍症有积极的预防作用<sup>[1]</sup>。人体自身不能合成磷脂, 需从食物中摄取, 由于特殊的保健功能, 磷脂酰胆碱类营养保健食品近些年风靡市场。人体中磷脂酰胆碱含量一般在 119~315 mmol/L, 过量摄入可能会引起毒性弥漫性甲状腺肿和坏血病<sup>[2]</sup>。因此, 在保健食品的研制与生产过程中, 需要准确控制磷脂酰

胆碱的添加水平。目前, 测定磷脂酰胆碱的主要检测方法有分光光度法<sup>[3]</sup>、薄层色谱法<sup>[4]</sup>和液相色谱法<sup>[5]</sup>等。与分光光度法相比, 色谱法具有操作简单、定性定量准确等优点, 本工作采用硅胶色谱柱和蒸发光散射检测器, 正相高效液相色谱法测定保健食品中磷脂酰胆碱的含量, 克服现有方法在测定过程中存在干扰因素多、专属性差, 费工耗时的缺点, 现报告如下。

### 1 材料与方法

**1.1 设备与试剂** 高效液相色谱仪 (Waters, 型号 2695, 配蒸发光散射检测器, 美国), 色谱柱 (Inertsil SIL-100A, 日本), 氮气发生器 (Peak, 型号 Genius XE, 英国); 电子天平 (Sartorius, 型号 BSA124S, 德国), 纯

**作者简介:** 张丹 (1972-), 女, 洛阳人, 本科, 副主任技师, 主要从事理化检验工作。

水仪(Millipore,型号 Milli-Q Direct,美国)。磷脂酰胆碱对照品(纯度>99%,Sigma,美国),正己烷(Merck,色谱纯),乙腈(Merck,色谱纯),异丙醇(Merck,色谱纯),三乙胺(优级纯),三氟乙酸(优级纯),试验用水为超纯水,电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ (25℃)。

**1.2 色谱条件** Inertsil SIL-100A 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm $\times$ 5  $\mu\text{m}$ );流动相为 A+B=60+40(体积比),其中流动相 A(800 ml 的异丙醇中加入 2.0 ml 的三乙胺,去离子水定容到 1 000 ml,三氟乙酸调 pH 至 3.5),流动相 B(正己烷);色谱柱温 40℃,流速为 1.0 ml/min,进样量 10  $\mu\text{l}$ 。蒸发光散射检测器条件:氮气压力为 45 psi,加热器级别 85%,漂移管温度为 80℃,蒸发光散射检测器的增益为 500。

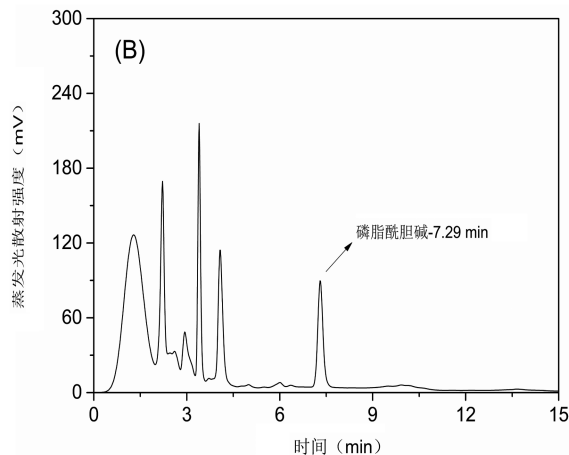
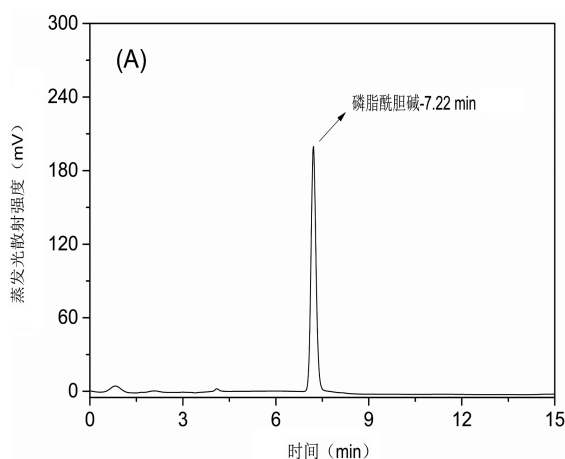
**1.3 样品前处理** 保健食品系厂家委托测定,样品性状多为胶囊和少许片剂,胶囊取内容物,片剂经充分研细后混合均匀,精密称量约 0.2 g 样品(具体称样重量视样品中保健食品成分的含量而定),置于锥形瓶中,加 15 ml 流动相溶液,超声提取 10 min,过滤上清液,重复提取三次,合并上清液并定容到 50 ml 容量瓶,上机前 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

## 2 结果

**2.1 色谱方法的建立** 本研究采用极性 Inertsil

SIL-100A 色谱柱,正己烷-异丙醇的水溶液为流动相,蒸发光散射检测器正相色谱法测定保健食品中的磷脂酰胆碱。现有文献<sup>[6]</sup>采用流动相中加入冰醋酸保持酸性环境,增加磷脂酰胆碱在色谱柱上的保留。但醋酸的沸点较高(118℃),在蒸发光检测过程中不易挥发,造成干扰。本研究在流动相中加入三氟乙酸调节流动相酸度,由于三氟乙酸的沸点低(72℃),易挥发的三氟乙酸在蒸发光检测器中不产生干扰测定的颗粒。另外,磷脂酰胆碱是两性分子,在色谱柱上分离时易产生拖尾现象,试验发现在流动相中加入 0.1% 的三乙胺可有效改善峰形。实验过程中改变气体压力和漂移管温度,记录色谱峰的变化,发现氮气的压力为 45 psi,加热器级别 85%,漂移管温度为 80℃ 时检测器具有较高的信噪比,结果重现性好。优化的色谱柱和检测器等色谱仪器参数列于 1.2 部分。

按照 1.2 设定的色谱分离条件进样磷脂酰胆碱标准(1.0 mg/ml),色谱流出曲线如图 1A 所示,磷脂酰胆碱的保留时间为 7.22 min。在相同的仪器条件下进样处理过的保健食品样品溶液,测定结果如图 1B 所示,在 15 min 分钟内,样品中的磷脂酰胆碱与杂质得到了基线分离,样品中磷脂酰胆碱的峰与前后峰分离度均大于 1.5,磷脂酰胆碱的保留时间为 7.29 min,与标准溶液的保留时间基本一致(相对偏差<1%)。



注:A:磷脂酰胆碱标准品(1.0 mg/ml),B:大豆卵磷脂胶囊。

图1 液相色谱图

精密称取磷脂酰胆碱标准品 200 mg,置于 10 ml 容量瓶中,加入流动相溶液溶解后定容,摇匀后制成 20.0 mg/ml 的磷脂酰胆碱中间液,临用前用色谱流动相稀释为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/ml 的标准系列使用液。按照 1.2 的色谱条件进样,根据色谱保留时间定性,waters 液相色谱数据处理工作站定量。

在工作站上将蒸发光散射检测器响应值与磷脂酰

胆碱质量浓度进行  $\lg \sim \lg$  拟合,以磷脂酰胆碱质量浓度的对数( $\lg C$ )为横坐标,相应峰面积的对数( $\lg A$ )为纵坐标进行线性回归,拟合过程要求相关系数  $r$  达到 0.995 以上。数据处理结果表明,在 0.05~2.0 mg/ml 范围内,磷脂酰胆碱峰面积的对数与相应质量浓度的对数呈良好的线性关系,回归方程见表 1,并根据信噪比为 3:1 时确定仪器检出限。

表 1 色谱方法的线性范围、回归方程、  
检出限和最低检出质量浓度

组分	线性范围 (mg/ml)	回归方程	最低检出浓度 (mg/ml)	检出限 (mg/ml)
磷脂酰胆碱	0.05~2.0	$L_gA=1.587\times L_gC+3.185$	0.05	0.02

2.2 样品检测 采用 1.3 所建立的方法处理保健食品,并按照优化的色谱条件测定样品中的磷脂酰胆碱,样品中磷脂酰胆碱含量过高时适当稀释,保证其响应值在仪器检测的线性范围内,将试样溶液注入液相色谱仪中,根据色谱峰的保留时间定性,由样品峰面积从工作曲线中计算待测液中磷脂酰胆碱的含量。由于蒸发光散射检测器的基线受溶剂组分和温度的影响不大,检测基质复杂的样品时可采用梯度洗脱程序,调节磷脂酰胆碱色谱峰的出峰时间,避免样品中杂质的干扰。5 家保健食品的检测结果见表 2,样品测定值在厂家标识的含量范围之内。

表 2 保健品中磷脂酰胆碱含量、精密度和回收率的测定

参数	1 号样	2 号样	3 号样	4 号样	5 号样
标识值 (mg/g)	70~90	≥120	100~120	≥150	180~220
测定值 (mg/g)	83.6	124.7	107.6	155.8	197.2
精密度 (%)	1.1	0.7	0.8	1.2	1.1
回收率 (%)	95.7	97.8	102.3	93.7	96.3

开展样品加标回收实验,分低、中、高含量分别加标,计算加标回收率的平均值,结果列于表 2,磷脂酰胆碱样品加标回收率的范围为 93.7%~102.3%,表明该方法在检测样品时的准确度较高。另外,每份样品平行测定 7 次,计算检测结果的相对标准偏差,从表中可以看出,蒸发光散射检测器的精密度<1.3%,检测结果的重现性较好。

3 讨论

目前,大豆、油菜和蛋黄等食品中磷脂酰胆碱的液相色谱检测报道较多,但功能保健食品中磷脂酰胆碱研究较少,缺乏相应的国家标准。磷脂酰胆碱的紫外-可见光吸收基团较弱,杨艳等<sup>[5]</sup>采用波长 204 nm 紫外检测器,建立保健食品中磷脂酰胆碱的高效液相色谱测定方法。2016 年国家卫生计生委员会颁布了植物油中磷脂酰胆碱的液相色谱检测方法<sup>[7]</sup>,该方法采用氨基固相萃取柱 205 nm 紫外波长检测器,工作曲线的最低点为 0.1 mg/ml。鉴于紫外波长在 205 nm 检测时样品基质的干扰较为严重,国家粮油标准化委员会采用了示差折光检测器检测粮油中的 2-溶血磷脂酰胆碱<sup>[8]</sup>,灵敏度优于紫外检测器。但是,示差折

光检测器存在流动相平衡慢,易受温度和溶剂极性变化影响,色谱图出现负峰,不适用于梯度洗脱等缺点<sup>[9]</sup>。磷脂酰胆碱的紫外吸收很弱,且为 205 nm 末端吸收,干扰较大,因此紫外检测器不适用于复杂样品的测定。蒸发光散射检测器属于通用型检测器,被测组分无需带有发色基团,灵敏度优于紫外低波长和示差折光检测法,是磷脂、聚合物、表面活性剂等没有发光基团有机物的理想检测器<sup>[10]</sup>。

磷脂酰胆碱是一种两性分子,在弱极性的 C18 色谱柱上不易保留,反相色谱法检测时会出现保留时间过短,色谱峰拖尾等现象。本研究采用硅胶色谱柱,以正己烷-异丙醇(0.1%的三乙胺,三氟乙酸调 pH 至 3.5)为流动相,在 15 min 内分离保健食品中的磷脂酰胆碱。在 0.05~2.0 mg/ml 范围内,蒸发光散射检测器的响应值的对数与保健食品中磷脂酰胆碱质量浓度的对数线性相关,磷脂酰胆碱的检出限依次为 0.02 mg/ml,测定的精密度小于 1.3%,加标回收率为 93.7%~102.3%。与紫外检测器和示差折光检测器相比,蒸发光散射液相色谱法具有标准曲线线性范围宽,准确度和重现性好等优点,适用于保健食品中磷脂酰胆碱的检测。

参考文献

[1] 胡小中. 磷脂酰胆碱的生理功能和作用机理[J]. 粮油食品科技, 2011, 19(4):42-44.

[2] 莫建光, 卢安根, 徐慧, 等. 食品中磷脂酰胆碱检测技术的研究进展[J]. 食品工业科技, 2010,31(1):409-411.

[3] 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):555-562.

[4] 古再丽努尔·阿尔肯, 刘然, 侯俊峰, 等. 基于高效薄层色谱法的胡麻卵磷脂质量分析[J]. 食品科学, 2014, 35(16):160-164.

[5] 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.

[6] 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, 2018,33(3):337-340.

[7] 中华人民共和国国家卫生和计生委员会. 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]. 北京:人民卫生出版社,2017:1-20.

[8] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 22506-2008 粮油检验酶改性磷脂中 1-和 2-溶血磷脂胆碱的测定高效液相色谱法[S]. 北京:中国质检出版社,2008:1-15.

[9] 熊亚群, 刘雁鸣. 高效液相色谱技术在药用辅料检测中的应用新进展[J]. 中南药学, 2015,13(1):61-64.

[10] 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.