

# 高效液相色谱法测定畜禽肉中磷脂酰胆碱的含量\*

## Determination of Phosphatidyl Choline in Meat by High Performance Liquid Chromatography

张云光<sup>1</sup>, 卢安根<sup>2</sup>, 莫建光<sup>2</sup>, 徐慧<sup>2</sup>

ZHANG Yun-guang<sup>1</sup>, LU An-gen<sup>2</sup>, MO Jian-guang<sup>2</sup>, XU Hui<sup>2</sup>

(1. 南宁邦尔克生物技术有限责任公司, 广西南宁 530003; 2. 广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

(1. Nanning Bioclone Biotechnology Co., Ltd., Nanning, Guangxi, 530003, China; 2. Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning, Guangxi, 530022, China)

**摘要:**应用高效液相色谱法(HPLC)测定畜禽肉中磷脂酰胆碱含量。以 Intertsil SIL 硅胶柱(4.6mm×250mm, 5 $\mu$ m)为分离柱, 甲醇:水(85:15, V:V)为流动相等度洗脱, 流速 1.5ml/min, 柱温为室温, 用紫外检测器在 206nm 处对磷脂酰胆碱进行测定。测得磷脂酰胆碱在 0.5~1.92 mg/ml 范围内线性关系良好( $r^2=0.9957$ ), 方法检测限为 4.14 $\mu$ g/g, 精密密度为 0.49% ( $n=5$ ), 回收率为 89%~102%。该方法灵敏度高, 重现性和稳定性比较好。

**关键词:**高效液相色谱法 畜禽肉 磷脂酰胆碱 含量测定

**中图分类号:** O657.72, R927.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2010)03-0242-03

**Abstract:** The phosphatidyl choline (PC) in meat is determined using high performance liquid chromatography (HPLC). Phosphatidyl choline was successfully separated on a Intertsil SIL column (4.6mm×250mm, 5 $\mu$ m) using methanol-water (85:15, V:V) as mobile phase at a flow rate of 1.5ml/min and the drift tube temperature is room-temperature. The linear detection range of PC was 0.5~1.92 mg/ml ( $r^2=0.9957$ ) and the limit of detection (LOD) was 4.14 $\mu$ g/g with excellent relative standard deviation (RSD) of 0.49% ( $n=6$ ). The recovery of PC was in the range of 89%~102%. These results indicated that this method was a simple and fast method with more accuracy and reproducibility to detect phosphatidyl choline.

**Key words:** HPLC, meat, phosphatidyl choline, quantity determination

磷脂酰胆碱 (phosphatidyl choline, PC) 是磷脂酸的衍生物, 由甘油与脂肪酸和磷酸胆碱结合而成。它是构成细胞生物膜、脑组织和神经组织的重要成分<sup>[1]</sup>, 对酶的活性起着重要作用, 并且是乙酰胆碱的重要供给源<sup>[2]</sup>。人体中的磷脂酰胆碱含量一般在 1.9~3.5 mmol/L, 具有预防和治疗动脉硬化、保护肝脏、改善记忆力、延缓衰老等功能, 是胎儿、婴儿神经发育的必需品、糖尿病患者的营养品。但是其含量

过高则可能引起毒性弥漫性甲状腺肿和坏血病。肉及肉制品中含有比较丰富的磷脂酰胆碱, 对其含量进行监控, 已经成为大众关注的焦点。

食品中磷脂酰胆碱含量的测定方法主要有紫外可见分光光度法 (UV-VIS)<sup>[3,4]</sup>、薄层色谱法 (TLC)<sup>[5~7]</sup> 和高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[8~10]</sup> 等。HPLC 法在畜禽肉的磷脂酰胆碱的测定少有报道。本文采用 Intertsil SIL 硅胶色谱柱和紫外检测器, 建立畜禽肉中磷脂酰胆碱检测方法。该方法为食品安全检测提供了技术支持。

收稿日期: 2010-05-12

作者简介: 张云光 (1976-), 男, 工程师, 主要从事发酵与酶工程研究。

\* 广西大型仪器协作共用网资助课题。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器

2695 高效液相色谱分析系统、2489 紫外检测器 (UVD)、2996 二极管阵列检测器 (DAD) (美国 Waters 公司生产); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂生产); LBM-1J 氮吹仪 (北京莱博科技有限公司生产)。

### 1.2 试剂

磷脂酰胆碱对照品 (美国 Sigma 公司提供, 纯度大于 99%); 2.74mg/ml 磷脂酰胆碱标准储备液: 准确称取 0.0274g 磷脂酰胆碱对照品, 用甲醇溶解并定容至 10ml, 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用, 工作液用甲醇稀释而成; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 蒸馏水; 其他试剂为分析纯。

### 1.3 实验方法

称取适量预先绞碎的肉样, 加适量丙酮浸提数分钟, 以 8000r/min 的速度离心 10min, 去掉上层丙酮初次浸提液, 用氮气吹干肉渣, 再用适量乙醇二次浸提肉渣, 取上层乙醇浸提液在旋转蒸发器中 (温度为  $70^{\circ}\text{C}$ ) 浓缩后, 再用氮气吹干, 用甲醇溶液溶解并定容, 过有机膜 ( $0.45\mu\text{m}$ )。用 HPLC 分析检测, 色谱条件为柱温: 室温; 流速: 1.5ml/min; 进样量: 5 $\mu\text{l}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件优化选择

#### 2.1.1 波长的选择

用 1.37mg/ml 对照品溶液, 在 190~400nm 范围内进行紫外光谱扫描, 结果表明在 206.3nm 处有最大吸收, 因此确定检测波长为 206nm。

#### 2.1.2 流动相选择 (各组分以体积比混合)

分别以甲醇: 乙腈: 水 (21: 65: 14)、乙腈: 水 (85: 15)、甲醇: 0.1% 磷酸 (85: 15)、甲醇: 水 (85: 15) 为流动相, 用 1.32mg/ml 对照品溶液进样 5 $\mu\text{l}$ , 观察色谱峰分离效果。结果表明, 使用甲醇: 水 (85: 15) 分离良好, 其它流动相均分离不彻底。

#### 2.1.3 分析柱的选择

以常用的 ODS  $\text{C}_{18}$  柱和 Intertsil SIL 作为分析柱, 甲醇: 水 (85: 15) 作为流动相, 分别测定空白溶液和 1.37mg/ml 对照品溶液, 结果 ODS  $\text{C}_{18}$  柱的磷脂酰胆碱无法洗脱或者无法分离; 而 Intertsil SIL 柱的分离效果较好, 对照品出峰时间为 6.5min 左右 (图 1), 故选择 Intertsil SIL 柱作为分析柱。

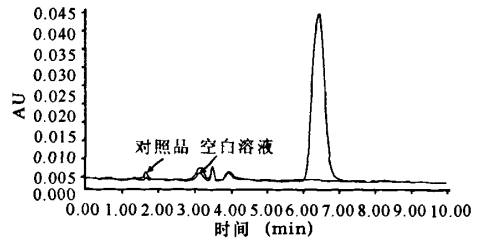


图 1 对照品和空白溶液色谱

### 2.2 试样预处理条件的选择

#### 2.2.1 丙酮初次浸提时间的选择

称取约 7g 的试样 4 份, 加入 100ml 丙酮, 分别浸提 10min、20min、30min 和 40min, 按照上述实验程序检测分析样品中的磷脂酰胆碱含量, 测得 PC 含量随着浸提时间的增加而降低, 由 0.56mg/g 降到 0.38 mg/g。故选择浸提时间选为 10min。

#### 2.2.2 丙酮初次浸提用量的选择

称取约 7g 的试样 5 份, 分别加入 50ml、75ml、100ml、125ml、150ml 丙酮浸提, 按上述实验程序测量。在加入 125ml 丙酮时检测的峰面积最大, 磷脂酰胆碱含量最高。故选择加入 125ml 丙酮来脱油。

#### 2.2.3 乙醇二次浸提浓度的选择

称取约 5g 的样品 4 份, 用 125ml 丙酮初次浸提离心后分别用 40%、60% 和 95% 乙醇进行二次浸提, 结果显示乙醇浓度越高效果越好, 测得磷脂酰胆碱含量范围 0.02~0.56 mg/g, 因此, 选用 95% 乙醇作为二次浸提液。

#### 2.2.4 乙醇二次浸提温度的选择

称取约 5g 样品 4 份, 按上述实验程序用乙醇分别在  $25^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$ 、 $60^{\circ}\text{C}$  和  $80^{\circ}\text{C}$  进行二次浸提, 测得磷脂酰胆碱含量分别为 0.79 mg/g、1.14 mg/g、1.03 mg/g、0.63 mg/g, 表明在  $60^{\circ}\text{C}$  PC 含量下降, 故选择  $50^{\circ}\text{C}$  为乙醇二次浸提温度。

#### 2.2.5 乙醇二次浸提用量的选择

称量约 5g 的样品 4 份, 丙酮脱油后分别加入 60ml、80ml、120ml 和 140ml 95% 乙醇二次浸提浓缩后检测, 结果显示, 磷脂酰胆碱含量随乙醇用量的增加而增加, 含量范围 0.63~1.10 mg/g。综合考虑, 选 150ml 作为乙醇二次浸提用量。

#### 2.2.6 乙醇二次浸取时间的选择

称取约 5g 的样品, 脱油后用 95% 乙醇分别提取 20min、40min 和 90min, 检测结果表明 20min 的磷脂酰胆碱含量最高。因此选择 20min 为乙醇二次浸提时间。

### 2.2.7 色谱条件和样品前处理条件的确定

综合上述因素,色谱条件选择:206nm,选择 Intertsil SIL (4.6mm×250mm,5 $\mu$ m) 硅胶柱,以甲醇:水(85:15,V:V)为流动相;试样预处理条件:先用125ml的丙酮初次浸提10min,去掉上层清液,再加入150ml 95%的乙醇在50℃下提取20min。

### 2.3 方法评价

#### 2.3.1 校正曲线的制作

精确吸取2.74mg/ml的储备液0.1ml、0.3ml、0.5ml、0.7ml加甲醇定容至1ml,在已选定的色谱条件下进行分析。以PC浓度作横坐标,PC峰面积为纵坐标,绘制校正曲线图。得回归直线方程为 $y = 1065.2x - 53.301$ ,相关系数 $r^2 = 0.9957$ 。

#### 2.3.2 检出限

检出限以2倍噪声水平所相当的待测物质的量计算,方法检测限为4.14 $\mu$ g/g。

#### 2.3.3 精密度

取已知磷脂酰胆碱含量的同一试样,按试验与处理方法平行制备6份,进行高效液相色谱分析,磷脂酰胆碱平均含量为0.4342mg/g, RSD为0.49%。

#### 2.3.4 重复性

取2.74mg/ml对照品液,按2.2.7中的色谱条件平行测定6次,进行分析,测得平均峰面积为1592, RSD为0.98%。这说明本方法重复性良好。

#### 2.3.5 回收率

精确吸取2.74mg/ml的储备液40 $\mu$ l、60 $\mu$ l、120 $\mu$ l、180 $\mu$ l分别加入已知PC含量的鲜猪肉试样中,在2.2.7选定的色谱条件下进样,得到磷脂酰胆碱的回收率在97.8%~101.1%之间, RSD为1.4% ( $n = 6$ )。

#### 2.3.6 样品测定

按上述所选取的样品提取条件和色谱条件,检测市售猪肉、鸡肉、鸡蛋中的磷脂酰胆碱含量(同一样品分别做5份平行),测定结果如表1所示。

表1 市售鲜肉、蛋中的磷脂酰胆碱含量

样品名称	PC含量(%)					PC平均含量(%)
	1	2	3	4	5	
猪肉1	0.076	0.077	0.072	0.071	0.072	0.074
猪肉2	0.115	0.110	0.097	0.106	0.103	0.106
鸡肉	0.083	0.089	0.090	0.085	0.084	0.086
鸡蛋	1.11	1.08	1.08	1.05	1.09	1.082

## 3 结束语

本实验用ODS C18柱无法洗脱磷脂酰胆碱,而用Intertsil SIL柱洗脱效果良好,与其他物质得到很好的分离。用甲醇:水(85:15,V:V)作为流动相时,无拖尾现象,而且保留时间短,分离效果好。样品预处理时先用125ml的丙酮初次浸提10min,去掉上层清液,再加入150ml 95%的乙醇在50℃下提取20min。

该方法应用于市售鲜猪肉加标回收实验,回收率在97.75%~101.08%之间, RSD为1.4%。实验结果说明该方法适用于畜禽肉中磷脂酰胆碱含量的测定,但是其它肉、蛋类产品的适用性应进一步研究确认。

#### 致谢:

广西大学化工学院黄秋燕同学参与了本文部分研究工作,作者在此表示感谢。

#### 参考文献:

- [1] Ansel G B, Hawthorne J N. Phospholipids: chemistry, metabolism, and function [M]. New York: Elsevier Publishing Company, 1964.
- [2] 凌关庭. 从卵磷脂商品看中国保健食品的市场培育和发展[J]. 粮食与油脂, 2000(3): 15-16.
- [3] 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, 28(10): 219-220.
- [4] 陈卫涛, 张德权, 张柏林, 等. 紫外分光光度法测定保健品中卵磷脂的含量[J]. 中国粮油学报, 2007, 21(3): 189-191.
- [5] 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.
- [6] 杨路平, 王维红, 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.
- [7] 王岩, 关明, 陈坚. 双波长薄层扫描法测定卵磷脂中磷脂酰胆碱的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(06): 546-547.
- [8] 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(10): 54-56.
- [9] 张德权, 陈卫涛, 张柏林. 高效液相色谱法测定大豆中卵磷脂的含量[J]. 核农学报, 2006, 20(5): 414-416.
- [10] 张茜, 朱立彬. 高效液相色谱法测定倍轻灵胶囊中磷脂酰胆碱的含量[J]. 医药导报, 2009, 28(3): 364-365.

(责任编辑:尹 闯)