

# HPLC-ELSD 法测定蛋黄卵磷脂中的磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺

LC-403

**摘要：** 本文使用岛津高效液相色谱仪 Nexera LC-40 与蒸发光散射检测器 ELSD-LT III 连用，建立了蛋黄卵磷脂中的磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的定量分析方法。该方法中，磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺分别在 5 ~ 1000 mg/L, 2.5 ~ 500 mg/L 线性范围内线性良好，相关系数均大于 0.999，准确度为 89.3~108.7%；精密度实验中，重复分析 6 次，各目标化合物保留时间 RSD 为 0.14 ~ 0.22%，峰面积 RSD 为 2.85 ~ 2.95%，精密度良好。实际样品加标实验中，各目标化合物低、中、高浓度加标回收率为 82.0 ~ 99.5%，准确度较好。实验结果表明，该方法能准确地测定蛋黄卵磷脂中的磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺含量。

**关键词：** 液相色谱法 ELSD-LT III 蛋黄卵磷脂

## 技术特点：

- ❖ ELSD-LT III 蒸发光散射检测器 wide 增益模式灵敏度更高、动态线性范围更宽。
- ❖ 样品无需前处理，直接溶解，回收率高，精确度好。

蛋黄卵磷脂是以鸡蛋黄或蛋黄粉为原料，经适当溶剂提取精制而得的磷脂混合物，以磷脂酰胆碱，磷脂酰乙醇胺两种化合物为主。磷脂酰胆碱作为蛋黄卵磷脂中占比最多的主要组成成分，测定其含量，对控制提取出来的蛋黄卵磷脂质量有一定的积极意义。同时，磷脂酰乙醇胺的含量也应关注检测来把控蛋黄卵磷脂的提取来源。

目前的检测方式较多，主要有高效液相色谱法，液质联用法，定磷法等。高效液相色谱法相较于定磷法操作简单，效率高，人工误差小，蒸发光散射检测器 (ELSD) 作为一种通用型检测器，对大多数物质均有响应，对磷脂的分子种类无特殊要求，更适合磷脂类化合物的检测。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津液相色谱仪 Nexera LC-40D X3 与 ELSD-LT III 联用，配置信息如下：

系统控制器：	SCL-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D X3×2	进样器：	SIL-40C X3
柱温箱：	CTO-40C	检测器：	ELSD-LT III
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.106		

### 1.2 分析条件

色谱柱：	ShimNex HE Sil (250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm), 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 380-01244-79		
流动相：	A 相 - 甲醇 / 水 / 冰醋酸 / 三乙胺 =85/15/0.45/0.05 (v/v/v/v) B 相 - 正己烷 / 异丙醇 =20/48 (v/v)		
流速：	1.0 mL/min	运行时间：	20 min
进样量：	20 μL	漂移管温度：	80°C
柱温：	40°C	增益：	Wide
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相初始浓度为 70%，时间程序见表 1。		

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
4	泵	B.Conc	70
10	泵	B.Conc	15
15	泵	B.Conc	15
15.5	泵	B.Conc	70
20	控制器	Stop	

### 1.3 标准溶液配制

稀释剂：将三氯甲烷和甲醇以 2/1 (v/v) 的方式混合均匀，即得。

磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺标准储备液：称取标准品蛋黄磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺适量，用稀释剂进行溶解，稀释，得到蛋黄磷脂酰胆碱 4 mg/mL，磷脂酰乙醇胺 2 mg/mL 的混合溶液。

磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺标准溶液：分别取适量混合标准储备液，用乙醇逐级稀释成蛋黄磷脂酰胆碱浓度分别为 5、10、20、50、200、400、1000 mg/L 的混合标准溶液（磷脂酰乙醇胺浓度分别为 2.5、5、10、25、100、200、500 mg/L），记作线性溶液 1~7。

### 1.4 样品前处理

样品溶液：称取样品 4 mg，用稀释剂溶解后，再用乙醇稀释成浓度为 0.4 mg/mL 的溶液。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 标准溶液色谱图

按照 1.2 分析条件，分析线性 2 溶液（磷脂酰乙醇胺浓度为 5 mg/L，磷脂酰胆碱浓度为 10 mg/L），得到色谱图如图 1 所示，相关化合物信息见表 2。

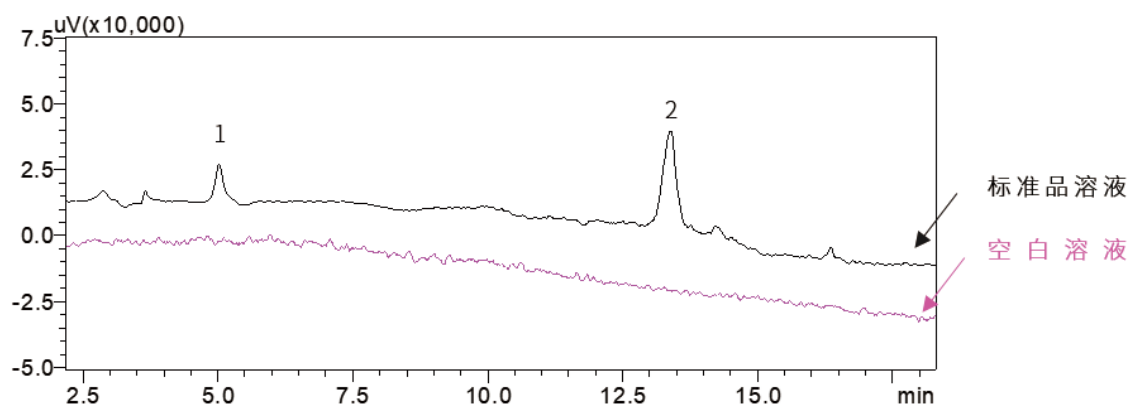


图 1 线性 2 溶液和空白色谱图（磷脂酰乙醇胺浓度为 5 mg/L，磷脂酰胆碱浓度为 10 mg/L）

表 2 混合标准溶液中化合物信息

编号	化合物	英文名称	CAS 号	保留时间 (min)
1	磷脂酰乙醇胺	Phosphatidylethanolamine	39382-08-6	5.014
2	蛋黄磷脂酰胆碱	Egg Phosphatidyl Choline	93685-90-6	13.372

## 2.2 校准曲线

按照 1.2 分析条件，将线性溶液 1~7 进行测定，以浓度对数为横坐标，峰面积对数为纵坐标，采用外标法建立校准曲线，结果如图 2 所示。蛋黄磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的仪器检出限和定量限，结果见表 3。

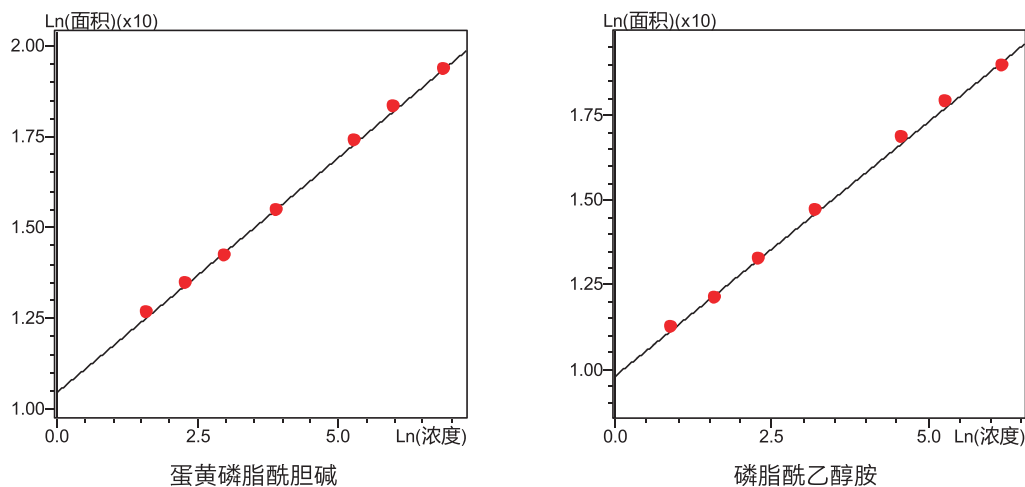


图 2 磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺校准曲线

表 3 磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺校准曲线信息

编号	化合物	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数	准确度 (%)	检出限 (mg/L)	定量限 (mg/L)
1	磷脂酰乙醇胺	2.5~500	$\text{Ln}Y=1.2607\text{Ln}X+10.6324$	0.9993	89.3~108.4	0.35	1.07
2	蛋黄磷脂酰胆碱	5~1000	$\text{Ln}Y=1.49929\text{Ln}X+9.80881$	0.9993	90.5~108.7	0.22	0.67

## 2.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件，将线性溶液 2 重复分析 6 次，各目标化合物保留时间 RSD 为 0.14 ~ 0.22%，峰面积 RSD 为 2.86 ~ 2.95%，精密度良好，结果详见表 4。

表 4 样品磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱精密度结果

编号	磷脂酰乙醇胺		蛋黄磷脂酰胆碱	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
精密度 -1	5.023	143,513	13.384	548,341
精密度 -2	4.996	139,432	13.350	530,709
精密度 -3	5.009	133,056	13.333	555,832
精密度 -4	4.997	144,063	13.344	574,923
精密度 -5	4.993	139,614	13.338	533,480
精密度 -6	4.999	141,878	13.347	544,185
RSD(N=6)(%)	0.22	2.86	0.14	2.95

## 2.4 样品含量及加标实验

按照 1.4 样品前处理方法对样品进行处理，上机分析，样品中磷脂酰乙醇胺未检出，磷脂酰胆碱含量为 881.69 mg/g。对上述样品进行加标实验，磷脂酰乙醇胺加标量分别为 12.5、250 和 500 mg/g，蛋黄磷脂酰胆碱加标量分别为 25、500 和 1000 mg/g，结果如表 5 所示。

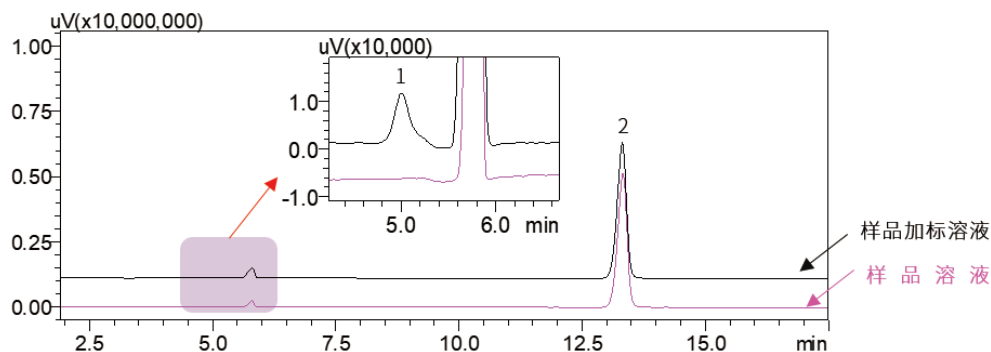


图 3 实际样品溶液和样品加标溶液色谱图  
(加标浓度：磷脂酰乙醇胺 12.5 mg/g，蛋黄磷脂酰胆碱：25 mg/g)

表 5 样品中磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱测定结果 (mg/g)

编号	化合物名	样品中浓度	加标量	加标后浓度	回收率 (%)
1	磷脂酰乙醇胺	N.D.	12.5	10.03	82.0
			250	226.78	90.7
			500	430.18	86.0
2	蛋黄磷脂酰胆碱	881.69	25	902.26	99.5
			500	1307.76	94.6
			1000	1792.66	95.3

备注：N.D. 表示未检出

## ■ 结论

本文建立了液相色谱法测定蛋黄卵磷脂中磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺含量的分析方法，分析结果表明：该方法准确度好，重复性佳，灵敏度高，适用于蛋黄卵磷脂中的两种物质同时检测。另外，本方法对于其他含有卵磷脂的各种食品，药物或是材料中的磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺含量检测也有一定的借鉴意义。

岛津应用云

