

超临界流体色谱法分析大豆磷脂

王学军, 赵锁奇, 王仁安

(石油大学重质油加工国家重点实验室, 北京 102200)

摘要 采用以 CO_2 为流动相的超临界流体色谱方法, 以含 0.05% (体积分数) 三乙胺的乙醇作为改性剂, 对具有重要生物功能的大豆磷脂组成进行分析, 获得了大豆磷脂提取物中 6 个重要组分的定性结果, 并讨论了流动相组成、操作温度和压力对分离的影响。对其中有代表意义的磷脂酰胆碱 (PC) 进行了外标法定量分析, 在 PC 质量浓度为 0.020 g/L ~ 0.075 g/L 时具有较好的线性关系, PC 加样回收率为 96.7% ($n = 5$), 重现性好。此方法可用于实际样品的分析。

关键词 超临界流体色谱 磷脂酰胆碱 大豆磷脂

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2001)04-0344-03

1 前言

磷脂是生物膜的基本组成成分, 又是脂质的载体, 具有重要的生物功能, 在医药、化妆品、食品和饲料工业等方面都是重要的研究对象。磷脂有许多种, 其中最重要的有以下 6 种: 磷脂酰胆碱 (phosphatidyl choline, PC), 磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PE), 磷脂酰丝氨酸 (phosphatidyl serine, PS), 磷脂酰肌醇 (phosphatidyl inositol, PI), 磷脂酸 (phosphatidic acid, PA), 溶血性磷脂酰胆碱 (lyso-phosphatidyl choline, Lyso-PC)。其中 PC 因为具有良好的乳化功能而被广泛地应用于食品、医药、轻工等方面。

从大豆中提取的磷脂粗品组分多而复杂, 且含有多种非有效成分——中性脂类, 从而增加了分离和纯化大豆磷脂的难度。目前分析大豆磷脂主要采用薄层色谱 (TLC) 和高效液相色谱 (HPLC) 法。TLC 法设备简单, 操作方便, 是定性分析磷脂的传统方法, 但定量费时费力^[1], 且难于定量分析单个的磷脂组分^[2]。HPLC 法具有快速、易于自动化等特点, 但所用的流动相组成复杂, 往往要采用梯度洗脱, 从而引起基线漂移^[3,4], 给定量分析带来困难。超临界流体色谱 (SFC) 因其测定过程高效快速, 温度条件温和, 非常适合于分析天然活性物质^[5], 并且易于放大到制备规模, 已成为越来越重要的制备分离手段, 但用超临界流体色谱分离磷脂的报道目前还较少^[6]。本文采用超临界流体色谱法对大豆磷脂进行分离和定量测定, 为进一步放大到制备规模探索条件。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

所用 SFC 装置由本实验室设计组装而成^[5]。Rheodyne 进样器配有 10 μL 的定量管, Spectra 100 可变波长紫外检测器为美国 TSP 公司产品, 色谱信号由色谱工作站记录。无水乙醇、三乙胺均为国产分析纯试剂。PC, PE, PI 标准品购自 Sigma 公司。大豆磷脂分别为本实验室超临界流体抽提萃取物和北京化学试剂公司产品。

2.2 色谱条件

参考文献 2, 7, 8 所报道的内容, 本实验所用色谱柱选择 Spherisorb C_{18} 10 μm (中科院大连化学物理研究所), 250 mm \times 4.6 mm i.d. 不锈钢柱; 流动相为超临界 CO_2 和改性剂 (体积比为 10:1), 其中改性剂为含 0.05% (体积分数) 三乙胺的乙醇溶液; 流动相流速为 1.1 mL/min ~ 1.3 mL/min; 柱温为 30 $^\circ\text{C}$ ~ 60 $^\circ\text{C}$; 压力为 20 MPa ~ 30 MPa; 进样体积为 10 μL , 经紫外扫描, 选择检测波长为 214 nm。

2.3 混合标准溶液和样品溶液的制备

称取各磷脂标准品适量, 加入同一容量瓶中, 加乙醇至刻度, 配成标准品的混合溶液, 其中每一标准品的质量浓度均在 0.2 g/L 到 10.0 g/L 之间; 分别称取两种大豆磷脂样品 1.0 g, 并各自配成质量浓度约为 50 g/L 的乙醇溶液。

3 结果与讨论

3.1 色谱峰归属

以 PE, PI 和 PC 标准品确定图 1 中的 2, 3, 7 号峰分别为 PE, PI 和 PC, 与文献图谱^[3,9,10]比较确定

4, 5, 8 号峰分别为 PS, PA 和 Lyso-PC。其中标准品的谱图(图 1-a)中峰 1 为溶剂峰,粗品的谱图(图 1-b)中峰 1 则为中性脂(包括胆固醇、甘油酯等)和溶剂的合峰。从图 1 可以看出各化合物按极性从小到大顺序洗脱。

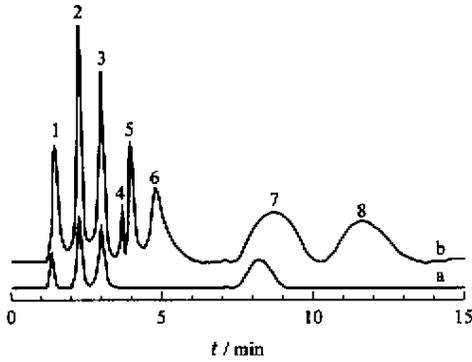


图 1 磷脂的超临界流体色谱图

Fig.1 Supercritical fluid chromatograms of phospholipids

a. standards ; b. soybean lecithin.

Column Spherisorb C₁₈, 10 μm, 250 mm × 4.6 mm i. d. ; mobile phase carbon dioxide-ethanol with 0.05% triethylamine(10:1, V/V); flow rate :1.1 mL/min ; temp :45 °C ; pressure :25 MPa ; detection wavelength 214 nm ; sample volume :10 μL.

1. solvent ; 2. phosphatidyl ethanolamine(PE) ; 3. phosphatidyl inositol(PI) ; 4. phosphatidyl serin(PS) ; 5. phosphatidic acid(PA) ; 6. unknown ; 7. phosphatidyl cholin(PC) ; 8. Lyso-PC.

3.2 流动相组成对分离的影响

由于超临界 CO₂ 对极性物质的溶解能力较差,在对极性化合物进行分析时往往需在其中加入极性有机溶剂(称改性剂或携带剂),以增加流动相的溶解能力,但只用乙醇作改性剂时,分离效果难以令人满意(见图 2)。当在乙醇中加入极少量的强极性物质时,分离能力有很大提高,并对峰形有较大改善^[5]。本实验采用加入 0.05% 三乙胺的乙醇作改性剂。

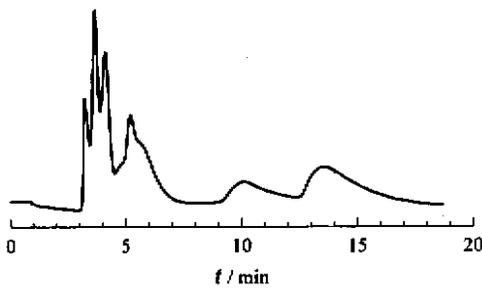


图 2 仅以乙醇作改性剂时大豆磷脂的色谱图

Fig.2 Chromatogram of soybean lecithin using only ethanol as the modifier

Other conditions as in Fig.1.

容量因子 k' 可以衡量化合物在固定相上保留值的大小。如图 3 所示,改性剂在流动相中的含量对分离的影响是非常明显的,即较高的改性剂浓度

可缩短分析时间,但降低了相邻组分的分离选择性。随着改性剂在流动相中的比例的提高,流动相的溶解能力加强,溶质的保留时间变短,在改性剂含量达到 30% 时已不能将 PE 与 PI 有效分离。

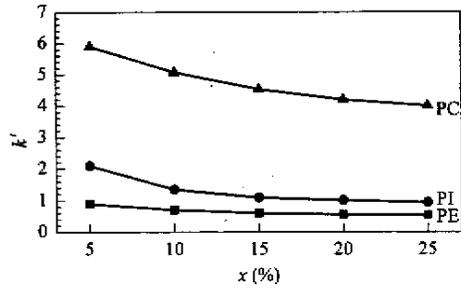


图 3 CO₂ 中改性剂的体积分数 x 对 k' 值的影响

Fig.3 Effect of the modifier volume proportion x on k'

Other conditions as in Fig.1.

3.3 温度对分离的影响

一般情况下,温度的升高一方面会使溶质在固定相上吸/脱附加快,从而使溶质保留时间缩短;另一方面会使流动相的密度减小,而使溶解能力减弱,溶质保留时间延长。保留时间的表观改变是两方面综合效果的体现。

如图 4 所示,在 25 MPa, 30 °C ~ 60 °C 时,升高温度会使各种磷脂的保留时间缩短。但随着温度的升高,这种影响越来越小,表明温度对流动相密度减小的影响在逐渐增大。值得指出的是,在 30 °C (低于流动相的临界温度)时也可以把各磷脂分开,表明在近临界状态下,超临界流体色谱也有良好的分离能力。

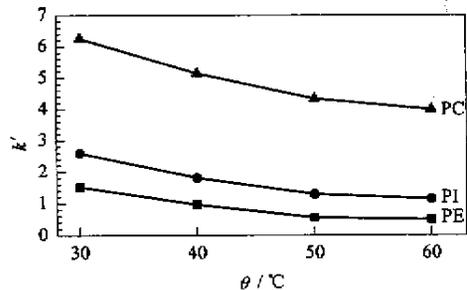


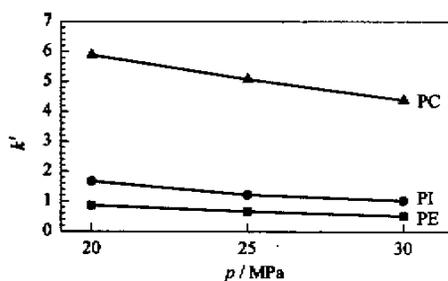
图 4 温度对 k' 值的影响

Fig.4 Effect of temperature on k'

Other conditions as in Fig.1.

3.4 压力的影响

在二氧化碳和乙醇的体积流量比一定的情况下,尽管系统压力的升高引起了流动相中乙醇含量的微量减少,但流动相组成的微弱变化没有掩盖压力对溶质保留值的影响趋势(见图 5),即升高压力减小了溶质的保留值,表明压力对溶质的保留时间的影响比较明显。

图 5 压力对 k' 值的影响Fig.5 Effect of pressure on k'

Other conditions as in Fig.1.

3.5 PC 标准曲线

准确称取 20 mg PC 标准品置于 10 mL 容量瓶中,用乙醇定容。再用乙醇稀释,得到浓度分别为 10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、75 mg/L 和 100 mg/L 的系列标准溶液。以上溶液均需新鲜配制。

外标峰面积定量法测定 PC 含量。结果表明当进样量为 10 μ L 时,在 PC 质量浓度在 0.020 g/L ~ 0.075 g/L 范围内,峰面积 Y 与 PC 的含量 X (μ g) 呈良好的线性关系: $Y = 1.1870X - 0.0046$, $r = 0.9994$ 。最低检出量为 0.2 μ g (信噪比为 3.5)。

3.6 PC 加样回收与重现性实验

取 0.1 g 大豆磷脂,精确称定,以乙醇定容为 10 mL,平分为两份,其中一份加入 2 mg PC 标准品。用超临界流体色谱测定两份样品中的 PC 含量,计算加样回收率为 96.7% ($n = 5$)。其相对标准偏差 (RSD) 为 2.8% ($n = 5$)。

3.7 应用

分别对本实验室的大豆磷脂超临界流体抽提萃取物和北京化学试剂公司的大豆磷脂产品进行了外标法测定。其中本实验室的萃取物中 PC 含量为

53% (质量分数),北京化学试剂公司的大豆磷脂中 PC 含量为 34% (质量分数)。

4 结论

采用超临界流体色谱法,在适当的色谱条件下,分离了 6 种极性不同的磷脂,并对其中有代表意义的 PC 进行了定量分析。本方法快速、简便、重现性好,可用于超临界流体萃取大豆磷脂过程中 PC 含量的监测以及磷脂产品的分析测定。

参考文献:

- [1] Picchioni G A, Watada A E, Whitaker B D. *Lipids*, 1996, 31(2):217-221
- [2] Eckard P R, Taylor L T, Slack G C. *J Chromatogr A*, 1998, 826(2):241-247
- [3] Melton S L. *J Am Oil Chem Soc*, 1992, 69(8):784-788
- [4] Sas B, Peys E, Helsen M. *J Chromatogr A*, 1999, 864(1):179-182
- [5] LIU Zhi-min, ZHAO Suo-qi, WANG Ren-an, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 1997, 15(4):288-291
刘志敏,赵锁奇,王仁安,等. *色谱*, 1997, 15(4):288-291
- [6] Lafosse M, Elfakir C, Moriti A L, et al. *J High Resolut Chromtogr*, 1992, 15:312-315
- [7] Tong W, Hammond E G, Cornette J L, et al. *J Am Oil Chem Soc*, 1999, 76(11):1313-1321
- [8] Abidi S L, Mounts T L, Rennick K A. *J Liquid Chromatogr*, 1991, 14(3):573-588
- [9] Abidi S L, Mounts T L, Finn T. *J Am Oil Chem Soc*, 1996, 73(4):535-536
- [10] List G R, Orthoefer F, Taylor N, et al. *J Am Oil Chem Soc*, 1999, 76(1):57-60

Analysis of Soybean Lecithin by Supercritical Fluid Chromatography

WANG Xue-jun, ZHAO Suo-qi, WANG Ren-an

(State Key Laboratory of Heavy Oil Research, Petroleum University, Beijing 102200, China)

Abstract: Separation of six phospholipids, phosphatidyl choline (PC), phosphatidyl-ethanolamine (PE), phosphatidyl-serin (PS), phosphatidyl-inositol (PI), phosphotidic acid (PA), lyso-phosphatidyl-choline (lyso-PC), in soybean lecithin with supercritical fluid chromatography was achieved within 15 min. C_{18} column was used and carbon dioxide modified by ethanol containing 0.05% (V/V) triethylamine was chosen as the mobile phase. Effects of the composition of mobile phase, temperature and pressure were studied. The quantitative analysis of PC has been achieved with external standard method. The calibration curve for PC was linear in the range between 0.020 g/L-0.075 g/L and the detection limit was 0.2 μ g. This method has been applied to the analysis of PC in soybean lecithin.

Key words: supercritical fluid chromatography; phosphatidylcholine; soybean lecithin