

反相离子对高效液相色谱法分离不同种类的磷脂酰胆碱

王智华, 卢学清, 洪筱坤

(上海中医药大学, 上海 200032)

摘要 采用反相离子对高效液相色谱(RP-IP-HPLC)法分离分析了不同种类的磷脂酰胆碱(PC), 色谱柱为 PERKIN-ELMER/HS-5 C₁₈ 柱, 流动相为甲醇-乙腈-水(70:22:8, 体积比) 内含 15 mmol/L 四甲基磷酸铵离子对试剂, pH 7), 流速 2 mL/min, 在 208 nm 波长处检测, 该法成功地分离了 7 种 PC。

关键词 反相离子对高效液相色谱, 磷脂酰胆碱, 分子种类

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2002)03-0249-04

Separation of Different Phosphatidyl Cholines by Reversed-Phase Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography

WANG Zhi-hua, LU Xue-qing, HONG Xiao-kun

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, Shanghai 200032, China)

Abstract : A reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatographic (RP-IP-HPLC) method for the separation of different phosphatidyl cholines (PC) was established. The optimized conditions were a PERKIN-ELMER/HS-5 C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm), isocratic elution with mobile phase of methanol-acetonitrile-water (70:22:8, volume ratio) containing 15 mmol/L tetramethyl ammonium phosphate (TMAP) at pH 7.0, flow rate of 2.0 mL/min and UV detection at 208 nm. Seven kinds of PC could be separated with this method.

Key words : reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography; phosphatidyl choline; molecular species

磷脂是重要的生物活性物质, 对生命活动有着重要的影响^[1]。磷脂是构成生物膜(细胞膜、核膜、线粒体膜等)结构的基本原料之一。它对膜的结构完整、膜的离子传输和分子识别等功能的正常发挥以及依赖于磷脂的蛋白质系统的活性起着决定性作用。细胞膜上的磷脂又是众多信息分子前体的存储形式, 这些信息分子中, 有些还是许多疾病形成过程中的重要化学介质。因此, 磷脂有“动物和植物原生动物的化学灵魂”之称。

磷脂主要为甘油的磷酸酯, 也可看作磷脂酸(phosphatidic acid, PA)的衍生物, 其中磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline, PC, 俗称卵磷脂)是 PA 的主要衍生物之一。

从 PC 的基本结构可知, 其分子中酰基上两个烃基链的长短和双键数目及位置的不同, 导致 PC 可以有多种分子种类(molecular species), 而不同分子种类的生理活性可能有很大的差别。有报道^[2]表明, 某些结构的 PC 可成为理想的高活性低毒性、可防治抗药性的新一代抗癌剂、抗 AIDS(获得性免

疫缺陷综合症)剂和抗生素等有效药物。因此, 对磷脂类化合物的分析, 除了对磷脂主组分(major classes)的分离分析外, 对磷脂分子种类的分离分析也是极其重要的。国内目前尚未见关于不同种类 PC 的 HPLC 分离分析的报道, 国外在 80 年代就有报道, Postle^[3]采用反相色谱柱, 以甲醇-水(92.5:7.5, 体积比)含 40 mmol/L 盐酸胆碱)为流动相, 在柱后用 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯作荧光剂, 将组衍生化后用荧光检测分析不同种类的 PC, 该法虽能分离, 但操作较为复杂。Abidi 等^[4]采用反相离子对高效液相色谱(RP-IP-HPLC)法以乙腈-甲醇-水(70:22:8, 体积比)含 5 mmol/L 庚基三己基磷酸铵)为流动相, 流速 2 mL/min, 检测波长 208 nm, 共分离出 6 种 PC。本文在 Abidi 研究的基础上对流动相的组成进行了改进, 以甲醇为主体, 适当配以乙腈和水, 以及合适的添加剂四烷基磷酸铵(TAAP), 采用 RP-IP-HPLC 法对不同种类的 PC 进行分离分析, 考察了多种因素对 PC 分离的影响。在优化的实验条件下 PC 获得了良好的效果。

1 材料和仪器

1.1 材料

对照品:PC 购自美国 Sigma 公司(自牛脑中提取得到)纯度 99%。PC 的 7 种分子种类(1.18:2-16:0 PC 2.22:6-18:0 PC 3.16:1-16:0 PC 4.18:2-18:2 PC 5.16:1-16:1 PC 6.18:1-14:0 PC 7.18:1-18:1 PC)购自美国 Sigma 公司,纯度 99%。

离子对试剂:四甲基磷酸铵(TMAP)、四乙基磷酸铵(TEAP)和四丁基磷酸铵(TBAP)购自上海第一试剂厂,分析纯。

乙腈、甲醇为 HPLC 级,购自美国 Fisher 公司;水为 Sparkling 纯蒸馏水。

1.2 样品制备

磷脂酰胆碱的对照品分别用甲醇配制成 5 g/L

~10 g/L 质量浓度的样品溶液。

1.3 色谱条件

色谱仪:PERKIN-ELMER 300;色谱柱:PERKIN-ELMER/HS-5 C₁₈(150 mm × 4.6 mm i.d. 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-水(70:22:8,体积比)(内含 15 mmol/L TMAP, pH 7);流速:2.0 mL/min;检测器:DAD 检测器,检测波长 208 nm,检测器谱带宽 5 nm。

2 方法与结果

2.1 流动相中加入 TAAP 试剂对分离的影响

流动相中无离子对试剂时,不同种类 PC 的 RP-HPLC 色谱图见图 1-a,其中色谱峰形不规则,分析时间长;当流动相中加入 TMAP 后,色谱峰形得到了明显的改善(见图 1-b),分析时间适中。

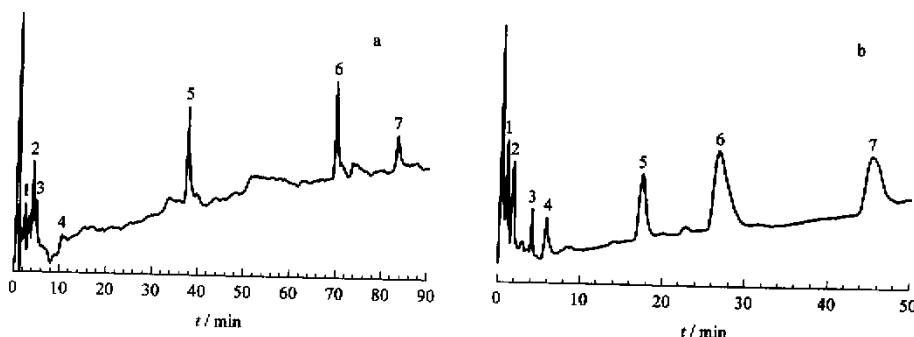


图 1 不同流动相条件下磷脂酰胆碱(PC)的 HPLC 分离色谱图

Fig.1 HPLC separation of phosphatidyl cholines in different mobile phases

a. methanol-acetonitrile-water (70:22:8, volume ratio); b. methanol-acetonitrile-water (70:22:8, volume ratio) containing 15 mmol/L tetramethyl ammonium phosphate (TMAP).

Column: PERKIN-ELMER/HS-5 C₁₈, 150 mm × 4.6 mm i.d.; flow rate: 2.0 mL/min; detection at 280 nm.

Peak identifications: 1.18:2-16:0 PC; 2.22:6-18:0 PC; 3.16:1-16:0 PC; 4.18:2-18:2 PC; 5.16:1-16:1 PC; 6.18:1-14:0 PC; 7.18:1-18:1 PC.

2.2 流动相中 TAAP 烷基的大小对不同种类 PC 容量因子(k')的影响

表 1 列出流动相中 TAAP 种类对不同种类 PC k' 值的影响,表明不同种类 PC 的 k' 值随 TAAP 烷基增大而增大。为获得适宜的分析时间,在流动相中添加 TMAP 效果最好。

2.3 离子对浓度对 PC 分离的影响

本研究重点考察了 TMAP 的浓度对不同种类 PC k' 的影响。当 TMAP 的浓度由 0 → 15 mmol/L 时, k' 逐渐减小,而当其再变化到 20 mmol/L 时, k' 值变化很小(见表 2); TMAP 浓度接近 15 mmol/L 时,分析时间最为恰当。

表 1 不同四烷基磷酸铵(TAAP)对不同种类 PC 的容量因子(k')的影响¹⁾

Table 1 Effect of different tetraalkyl ammonium phosphates (TAAP) on the capacity factors (k') of different phosphatidyl cholines (PC)¹⁾

Ion-pair reagent ²⁾	k' of different PC ³⁾						
	1	2	3	4	5	6	7
TMAP	1.376	2.608	5.667	9.247	28.220	43.575	73.522
TEAP	2.091	3.129	6.258	11.210	32.016	50.903	89.753
TBAP	2.243	3.290	6.489	11.441	35.194	57.828	101.075

1) Mobile phase: methanol-acetonitrile-water (70:22:8, volume ratio) containing 15 mmol/L of tetraalkyl ammonium phosphate. Other conditions are the same as in Fig.1. 2) TMAP, tetramethyl ammonium phosphate; TEAP, tetraethyl ammonium phosphate; TBAP, tetrabutyl ammonium phosphate. 3) For component codes, see Fig.1.

表 2 四甲基磷酸铵的浓度对不同种类 PC 容量因子(k')的影响¹⁾

Table 2 Effect of TMAP concentration on the capacity factors(k') of different PC¹⁾

C(TMAP) (mmol/L)	k' of different PC ²⁾						
	1	2	3	4	5	6	7
0	2.909	5.651	6.876	16.145	59.581	111.387	134.290
1.25	1.919	3.172	6.906	11.849	36.704	62.489	105.117
2.50	1.903	3.075	6.667	11.435	35.360	60.038	101.457
5	1.882	3.038	6.575	10.855	33.704	53.382	91.102
10	1.301	2.925	6.527	10.306	32.156	50.758	85.586
15	1.376	2.608	5.667	9.247	28.220	43.575	73.522
20	1.586	2.543	6.183	9.172	28.473	44.753	73.269

1) Mobile phase : methanol-acetonitrile-water (70:22:8, volume ratio) containing TMAP with different concentrations. Other conditions are the same as in Fig. 1. 2) For component codes, see Fig. 1.

2.4 流动相组成对分离的影响

流动相组成对不同种类 PC 保留值的影响,当增加流动相中水的比例时, k' 值增大;当水的比例恒

定时, k' 值对乙腈、甲醇之间相对组成的依赖不大(见表 3)。考虑到离子对试剂在流动相中的溶解度以及价格因素,本研究中选用以甲醇为主的流动相。

表 3 流动相组成对不同种类 PC 容量因子(k')的影响¹⁾

Table 3 Effect of mobile phase compositions on the capacity factor(k') values of different PC¹⁾

V(methanol):V(acetonitrile):V(water)	k' of different PC ²⁾						
	1	2	3	4	5	6	7
65:22:13	1.468	2.925	6.075	10.505	31.839	52.505	87.925
70:22:8	1.376	2.608	5.667	9.247	28.220	43.575	73.522
62:30:8	1.710	2.694	6.398	9.559	29.651	46.909	80.317

1) Mobile phase : methanol-acetonitrile-water at different ratios, and containing 15 mmol/L TMAP. Other conditions are the same as in Fig. 1. 2) For component codes, see Fig. 1.

2.5 流动相 pH 值对分离的影响

本实验考察了三种不同 pH 的流动相对不同种类 PC 的 k' 的影响。结果(见表 4)表明,在考察范

围内,随流动相 pH 值的改变, k' 值没有明显的变化,考虑到分析时间和峰形的对称性,采用流动相的 pH 值为 7。

表 4 流动相的 pH 对不同种类 PC 容量因子(k')的影响¹⁾

Table 4 Effect of mobile phase pH on the capacity factors(k') of different PC¹⁾

pH	k' of different PC ²⁾						
	1	2	3	4	5	6	7
7.00	1.376	2.608	6.258	9.247	28.220	43.575	73.522
5.00	1.720	2.548	5.624	8.930	27.263	44.973	75.081
2.50	2.314	2.661	5.747	9.269	29.011	48.538	78.280

1) Mobile phase : methanol-acetonitrile-water (70:22:8, volume ratio) containing 15 mmol/L TMAP at different pH. Other conditions are the same as in Fig. 1. 2) For component codes, see Fig. 1.

2.6 精密度试验

取不同分子种类 PC 的混合对照品溶液,以优化后的流动相组成进行分离分析,每 60 min 进样一次,进样量 10 μ L,共测 5 次,计算各峰的面积和保留时间的相对标准偏差。结果见表 5。

2.7 对照品 PC 的分子种类分离分析

实验对 Sigma 公司提供的对照品 PC 在优化后的实验条件下进行分析。色谱图见图 2。经与不同种类 PC 对照品的混合标准液的色谱图对照,其中 5 个峰为已知峰,其余 5 个为未知峰。表明 Sigma 公司提供的 PC 也不是单一组分,而是由不同种类 PC 组成的混合物。这可作为本文作者在用正相 HPLC 和反相 HPLC 分析磷脂主组分时,出现 PC 标准品

的谱峰有一定的拖尾、甚至出现 2~3 个以上峰这一现象的佐证^[5,6]。

表 5 精密度试验 ($n=5$)

Table 5 Precision of the method ($n=5$)

PC	Retention time		Peak area	
	$\bar{X} \pm SD$ (min)	RSD (%)	$\bar{X} \pm SD$ ($\times 10^6$)	RSD (%)
1	1.480 \pm 0.010	0.68	25.629 \pm 0.820	3.20
2	2.250 \pm 0.018	0.80	20.248 \pm 0.304	1.50
3	4.527 \pm 0.037	0.82	8.472 \pm 0.161	1.90
4	6.392 \pm 0.054	0.84	10.371 \pm 0.259	2.50
5	17.995 \pm 0.173	0.96	37.461 \pm 1.217	3.25
6	27.232 \pm 0.573	2.10	88.283 \pm 4.326	4.90
7	45.638 \pm 0.799	1.75	61.626 \pm 4.437	7.20

HPLC conditions are the same as in Fig. 1-b. For component codes see Fig. 1.

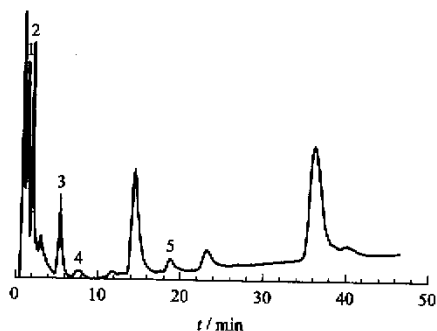


图 2 PC 对照品的分离色谱图

Fig. 2 Chromatogram of phosphatidyl choline standard

For HPLC conditions and peak identifications, see Fig. 1-b.

The standard was purchased from Sigma.

3 讨论

本研究改进了 RP-IP-HPLC 分离分析不同种类磷脂酰胆碱的方法,省去了将 PC 用强的紫外发光团衍生化的步骤,操作较为简单。

同文献 [4] 相比,本文采用了不同组成与比例的流动相及合适的添加剂,能分离出更多不同种类的 PC,且色谱峰形尖锐,分离度好,因此,该法优于文献报道方法。

在分离磷脂类化合物(主组分)时,最可能遇到的问题的是峰的纯度问题,也就是说在一个色谱峰中可能会含有两个甚至两个以上的不同组分,而且,有些组分在给定的色谱条件下无法洗脱。因此,优化色谱条件如采用梯度洗脱,使那些未分离的组分获得分离以及使保留在柱上很难洗脱的组分洗脱下来,这是十分必要的。

参考文献:

- [1] LONG Ya-qiu, JI Guo-zhen. *Organic Chemistry*, 1998, 18(4): 293
龙亚秋, 计国桢. *有机化学*, 1998, 18(4): 293
- [2] Bierer D E, Dubenko L G, Litvak J, *et al.* *J Org Chem*, 1995, 60: 7 646
- [3] Postle A D. *J Chromatogr*, 1987, 415: 241
- [4] Abidi S L, Mounts T L. *J Chromatogr*, 1992, 598: 209
- [5] LU Xue-qing, WANG Zhi-hua, HONG Xiao-kun, *et al.* *Chinese Journal of Chromatography*, 1999, 17(6): 559
卢学清, 王智华, 洪筱坤, 等. *色谱*, 1999, 17(6): 559
- [6] LU Xue-qing, WANG Zhi-hua, HONG Xiao-kun. *Chinese Journal of Chromatography*, 2000, 18(1): 57
卢学清, 王智华, 洪筱坤. *色谱*, 2000, 18(1): 57

北京明尼克分析仪器设备中心

北京明尼克分析仪器设备中心是从事实验室色谱仪器及配件、化学标准品销售的专业公司。

本中心主要供应销售的产品有气相色谱仪、液相色谱仪、原子吸收分光光度计、紫外分光光度计、数据处理机及工作站、仪器配件及消耗品。另有气源、稳压电源、国产和进口水质仪表、环保仪器、可燃气体报警器、红外线分析器、氢分析器、氧分析器、微量氧分析仪、溶解氧测量仪、露点仪、试剂标样、气相色谱毛细管柱、填充柱、液相色谱柱、梅特勒电子天平、水分仪、注射器、阀门、纯气、标准气、炼厂用高温炉传感器、石油产品烃类测定仪、进口硅胶(100~200目)和 FIA 荧光指示剂(适合于 GB/T11132-89)。可提供汽油中的苯含量测定、汽油中的氧化物含量测定专用色谱仪及有关配置的咨询,同时提供对不同型号气相色谱仪器进行技术改造的服务。常年提供汽油分析用标样及软件。欢迎惠顾垂询。

一次合作 终生朋友

本公司常年招聘业务员

地址:北京市海淀区学院路 20 号 911 信箱(北京石油化工科学研究院内)

新址:北京市海淀区学清路 16 号学知轩 1117 室

电话:(010) 62318809 62341274

邮编:100083

手机:13601000228 13901109086

传真:(010) 62318809

E-mail: hailing@public3.bta.net.cn