

棒薄层色谱氢火焰法定量测定磷脂组成

王兴国 裘爱泳 陶文沂 沈蓓英

(食品资源科学与工程系)

摘要 采用棒薄层色谱氢火焰 TLC/FID 法测定了商品粉末磷脂的含量, TLC 的展开剂为氯仿: 甲醇: 乙酸: 水(65: 20: 10: 5), 各组分变异系数小于 12%, 在 0~30 μ g 范围响应值与点样量成良好线性关系, 相关系数大于 0.99.

主题词 磷脂; 薄层色谱; 火焰检测器; 测定

中图分类号 TQ646

0 前 言

磷脂的定量测定方法有多种, 但各种方法测得的结果差异较大。因此, 1986 年第四届国际磷脂会议将各种磷脂测定方法的统一列为今后有待于解决的工作重点之一^[1]。通常磷脂的分离方法是应用柱色谱和薄层色谱。对分离得到的单一磷脂进行定量, 是将磷脂中的磷转化为游离磷酸, 再比色测定磷含量^[2,3], 或直接对展开后薄层板进行光密度计扫描^[4,5], 这些方法即费时, 准确度又差。80 年代后, 高效液相色谱(HPLC)法也被用于分离和定量磷脂, 这种方法的特点是方便, 快速, 在短时间内可以很好分离 PC, PE, PI, PG, PA 等, 所用的检测器是紫外(UV)^[6~10], 荧光^[11,12], 折光指数^[13,14]和红外^[15]检测器, 缺点是这些检测器对磷脂的灵敏度偏低。高分辨、高磁场强度的核磁共振仪(NMR)的出现使得由³¹P-NMR 快速、准确定量测定混合磷脂中单一磷脂含量成为可能, 1986 年, Sotirhos 等^[16]使用了 EDTA 钾或铯盐等位移试剂在较低磁场强度实现了大豆磷脂的测定。并且不需对样品进行预处理, 也无需分离, 所以能在短时间完成测试。但由于高分辨 NMR 的价格昂贵, 此法不可能作为普遍使用的方法。最近, 也有报道^[17]用维多利亚染料显色后用分光光度法测定单一磷脂含量。但该方法缺点是不能测定带胆碱磷脂, 如 PC, lysoPC。为配合开发利用我国磷脂天然资源, 本文在总结前人工作基础上, 从生产性, 实用性出发, 采用棒薄层色谱氢火焰(TLC/FID)法测定了大豆磷脂含量。正确地使用 TLC/FID 方法可一步完成分离与定量, 除了快速外, 还可以做到精确与准确。

收稿日期: 1994-09-07

1 材料与方法

1.1 材料

大豆粉末磷脂 市售

磷脂酰胆碱(PC), 磷脂酸(PA), 磷脂酰胆胺(PE), 磷脂酰甘油(PG), 磷脂酰肌醇(PI), 购自 Sigma 公司

乙醇可溶磷脂, 乙醇不溶磷脂 实验室自制。

其它各种试剂均用分析纯。

1.2 仪器

TH-10 Iatroscan analyser 采用 Chromarod-S III 型号硅棒(孔隙直径 60Å, 颗粒大小 5 μ m) 日本 Iatron Laboratories 公司

Waters ALC/GPC244 液相色谱仪带二个 M-6000A 溶剂输送系统, 一个 M-6601 溶剂梯度装置和 M-450 紫外检测器。

1.3 方法

1.3.1 乙醇分离粉末磷脂 100g 粉末大豆磷脂, 加 300ml 95% 乙醇, 40~50 $^{\circ}$ C 下搅拌 30min. 混和物放置澄清后过滤, 上清液(乙醇溶液)在旋转蒸发器上浓缩, 即得到乙醇可溶馏分, 过滤残余物即为乙醇不溶馏分。

1.3.2 TLC/FID 分析步骤 称取一定量磷脂溶于氯仿中, 用 5 μ l 微量注射器, 吸取 2 μ l 氯仿溶液, 小心地点在通过氢焰检测器燃烧的涂有熔融石英硅胶的石英棒上, 将点好样品的石英棒装在专用框架上(每个框架可装 10 根石英棒), 装好石英棒的框架置于层析缸中展开, 展开剂为氯仿: 甲醇: 醋酸: 水(65: 20: 10: 5) 展开后置于红外快速水分干燥箱中去除溶剂, 然后装入仪器, 进行扫描。TLC/FID 测定条件是氢气流量 180ml/min, 空气流量 2100ml/min, 扫描速度 40s。

1.3.3 液相色谱测定方法 柱子为 Waters μ -Porasil Silica 柱, 洗脱剂为已烷/异丙醇/水(6: 8: 0.5 V/V), 流量为 0.8ml/min。

2 结果与讨论

2.1 TLC/FID 测定粉末大豆磷脂

不同的展开剂直接影响被测组分的分离程度, 进而影响定量结果。本实验中我们以磷脂中主要成分 PC, PE, PI, PA 相互分离为原则, 对不同的展开剂进行了优化选择, 最后确定的展开剂为氯仿: 甲醇: 乙酸: 水(65: 20: 10: 5)。图 1 为粉末大豆磷脂 TLC/FID 色谱图, 图中前面部分是中性脂质和甘油三酯, 后面部分是主要磷脂化合物, 化合物是由比较标准化合物的 R_f 值来鉴定, 个别由内标法鉴定。

通过计算可得 PC, PA, PI, PG, PE 和甘油三酯在以氯仿: 甲醇: 乙酸: 水(65: 20: 10: 5)为展开剂时 5 次测定的 R_f 平均值为 0.39, 0.45, 0.60, 0.65, 0.77 和 0.91。表 1 为 5 次测定的 R_f 值的标准偏差、变异系数和置信度为 95% 时的测量区间。

表 1 5 次测定的 R_f 值的重现性

	PC	PA	PI	PG	PE	甘三酯
1	0.40	0.46	0.60	0.66	0.78	0.90
2	0.32	0.43	0.56	0.63	0.73	0.92
3	0.38	0.48	0.54	0.60	0.75	0.89
4	0.42	0.49	0.65	0.69	0.80	0.89
5	0.43	0.40	0.63	0.68	0.79	0.93
平均值(\bar{X})	0.39	0.45	0.60	0.65	0.77	0.91
标准偏差(S)	0.044	0.037	0.046	0.055	0.029	0.018
变异系数($C.V\%$)	11.18	8.22	7.70	8.93	3.79	2.00
测量区间(D)	$\bar{X} \pm 0.054$	$\bar{X} \pm 0.046$	$\bar{X} \pm 0.057$	$\bar{X} \pm 0.068$	$\bar{X} \pm 0.036$	$\bar{X} \pm 0.022$

2.2 测定方法的精密度

以商品大豆粉末磷脂为测定对象,考查了 TLC/FID 测定方法的精密度。表 2 与表 3 分别为样品中各个单一磷脂的绝对含量及总磷脂中各单一磷脂的相对百分含量。对各次测定的结果进行了统计量检验,以剔除测定的异常值。由表 2 和表 3 可知, TLC/FID 法测定磷脂含量的标准偏差小于 1.50,变异系数小于 10%,由测量区间算得测量误差小于 $\pm 10\%$ 。我们将由 TLC/FID 法测得的结果与该样品的出厂指标进行了比较,其出厂指标含磷量为 2.7%,假定它们全为磷脂中的磷,如以磷脂平均分子量 800 计,可计算得到该样品含磷脂量为 67.5%,而 TLC/FID 法 9 次测定的平均结果为 56.3%,两者结果相差 11%,造成出厂指标计算的磷脂含量偏高的原因,我们认为目前通用的含磷量测定方法不足造成的,目前通用的方法^[18]是先将磷脂与氧化锌混合,在 550~600 C 灼烧成磷酸盐,再在一定条件下与钼酸铵生成钼蓝,用分光光度法测吸光度而得到含磷量。在这一过程中非磷脂磷也被氧化成磷酸盐被测定,这就造成通过含磷量计算得到的磷脂含量结果偏高。

表 2 TLC/FID 测定的大豆粉末磷脂的绝对含量

测定次数	PC	PA	PI	PE	TPL
1	21.5	2.6	8.2	20.2	52.5
2	22.2	3.1	11.1	20.8	57.2
3	21.7	3.1	9.4	20.0	54.2
4	20.4	3.7	10.2	20.4	54.7
5	22.1	3.3	10.2	21.1	56.7
6	22.9	3.4	12.0	21.1	59.4
7	21.9	3.2	10.3	20.6	56.0
8	22.4	3.4	10.4	21.7	57.9
9	23.0	3.7	9.3	22.0	58.0
平均值 \bar{X}	22.0	3.3	10.1	20.9	56.3
标准偏差(S)	0.78	0.34	1.09	0.67	2.17
变异系数($C.V\%$)	3.57	10.25	10.79	3.2	3.85
测量区间(D)	$\bar{X} \pm 0.60$	$\bar{X} \pm 0.26$	$\bar{X} \pm 0.84$	$\bar{X} \pm 0.51$	$\bar{X} \pm 1.66$

表3 TLC/FID 测定的大豆粉末磷脂的相对含量(%)

	PC	PA	PI	PE
1	40.2	10.7	17.8	31.2
2	40.4	8.9	17.4	33.4
3	37.6	10.2	19.4	32.8
4	40.4	10.2	17.4	32.0
5	41.7	9.5	17.1	31.6
6	32.3*	11.6	23.4	32.8
7	39.4	9.7	16.2	34.7
平均值	40.0	10.1	17.6	32.6
标准偏差	1.37	0.87	1.05	1.19
变异系数(%)	3.4	8.6	6.0	3.6
测量区间(D)	$\bar{X} \pm 1.27$	$\bar{X} \pm 0.81$	$\bar{X} \pm 0.97$	$\bar{X} \pm 1.10$

2.3 测定方法的线性范围

图2为PC,PA,PI,PE与FID响应值的关系。由图可知,在称样量为0~30 μg 范围内,

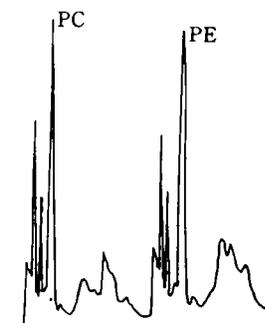


图1 粉末大豆磷脂 TLC/FID 色谱图

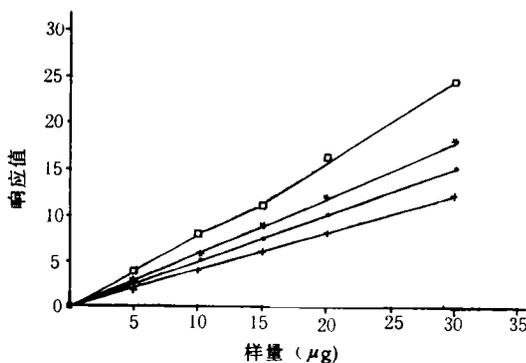


图2 各磷脂馏分的线性测量范围

—●— PC —+— PA —*— PI —□— PE

响应值与点样量成线性关系,各组分的相关线性方程和相关系数分别为:

$$\text{PC} \quad y = -2.43 \times 10^{-2} + 0.511x \quad r = 0.9999$$

$$\text{PA} \quad y = -5.71 \times 10^{-3} + 0.415x \quad r = 0.9998$$

$$\text{PI} \quad y = -7.00 \times 10^{-2} + 0.614x \quad r = 0.9999$$

$$\text{PE} \quad y = -0.18 + 0.816x \quad r = 0.9988$$

2.4 乙醇可溶和乙醇不溶磷脂馏分

图3为乙醇可溶磷脂馏分的 TLC/FID 色谱图,由图可知,在这一馏分中,PC和PE是主要化合物,PI和PA几乎完全去除。图4为乙醇不溶磷脂馏分的 TLC/FID 色谱图,在这一馏分中PA和PI被浓缩了。表4和表5为两个馏分中测定的PC,PE,PI和PA的含量。在乙醇可溶馏分中PC是主要化合物,相对含量可高达70%左右,PI几乎检测不出;在乙醇不溶馏分中PI是主要化合物,相对含量高达30%左右;PE在这两个馏分中几乎相同,相对含量为25%左右。

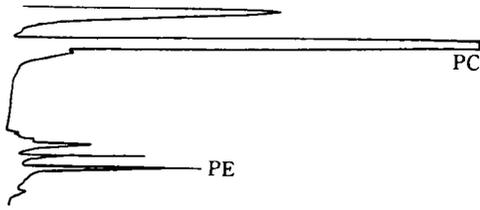


图3 乙醇可溶磷脂馏分的 TLC/FID 图

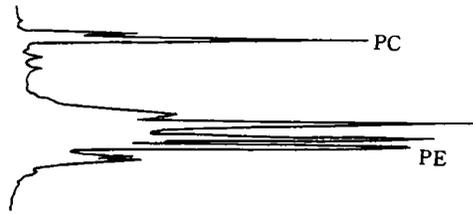


图4 乙醇不溶磷脂馏分的 TLC/FID 图

目前,我国油脂厂家生产的卵磷脂和脑磷脂产品,其基本工艺就是采用乙醇来提取,表4和表5数据清楚表明要得到高含PC的产品,必需用乙醇反复多次萃取,这样就使得生产成本大大提高;此外,要想得到高含PE的脑磷脂产品,用这种方法很难实现。

表4 乙醇可溶磷脂馏分的 TLC/FID 定量结果

化合物	绝对含量(%)	相对含量(%)
PC	49.2	70.7
PI	<1.0	<1.4
PA	<2.0	<2.9
PE	17.4	25.0

表5 乙醇不溶磷脂馏分的 TLC/FID 定量结果

化合物	绝对含量(%)	相对含量(%)
PC	7.0	13.6
PI	15.8	30.6
PA	14.7	28.5
PE	14.1	27.3

2.5 TLC/FID 与 HPLC 测定磷脂方法的比较

图5和图6是粉末大豆磷脂和乙醇可溶磷脂馏分的高效液相色谱(HPLC)图。由图可

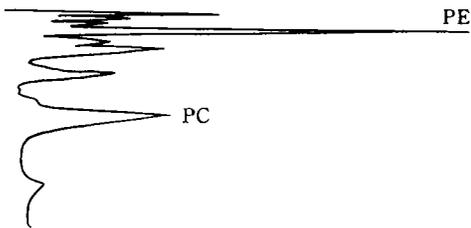


图5 大豆粉末磷脂的 HPLC 图

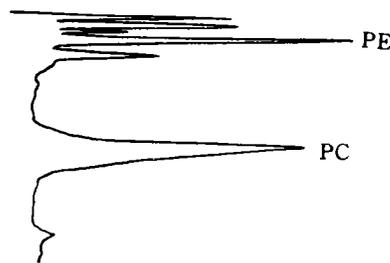


图6 乙醇可溶磷脂馏分的 HPLC 图

知,在测定条件下,磷脂中主要组分PC,PE,PI和PA都可以得到较好的分离,HPLC的两张图与TLC/FID的色谱图分布趋势相近。表6为两种方法测得的磷脂含量。

表6 HPLC和TLC/FID法测定磷脂含量的结果比较

	相对磷脂含量(%)		绝对磷脂含量(%)	
	HPLC法	TLC/FID法	HPLC法	TLC/FID法
PC	28.6	40.0	24.5	22.0
PI	19.1	17.6	16.4	10.1
PA	21.9	10.1	18.8	3.3
PE	30.3	32.6	28.0	20.9
TPL			87.7	56.3

由表可知,两种方法测得的相对含量中 PE 和 PI 非常接近,而 PC 和 PA 则相差 10% 之多,造成这种差别的原因可能是由于 PC 和 PA 在紫外吸收区的响应值不同所致。在两种方法测得的绝对含量中,HPLC 法明显高于 TLC/FID 法,并且比用含磷量换算的结果都高 10% 以上,造成这种原因是我们订购的单一磷脂标准,除 PC 是从大豆中提取之外,其余都是从动物中提取的,动物中的磷脂所连的脂肪酸以饱和脂肪酸为主,饱和脂肪酸在 215nm 紫外区基本不吸收,这样造成标准磷脂的响应值偏低,结果使样品的含量偏高。

3 影响 TLC/FID 测定的因素

3.1 氢焰检测器的流量

我们发现欲把滴加了 10~30 μg 磷脂在棒上定量地去除(烧)干净,氢气的流量必须超过 120ml/min. 图 7 表示的是磷脂组分的响应值与氢气流量的关系,随着氢气流量的降低,响应值降低。

3.2 扫描速度

当氢气与空气流量分别为 180ml/min 与 2100ml/min,检测器的燃烧头距离色谱棒 0.5mm 时,将棒的移动速度由 0.13 提高到 0.4cm/s(即扫描速度 60~25s),棒上温度由 585 $^{\circ}\text{C}$ 降到 375 $^{\circ}\text{C}$ ^[19]。图 8 是磷脂在相同浓度下扫描速度与响应值的变化关系。在高扫描速

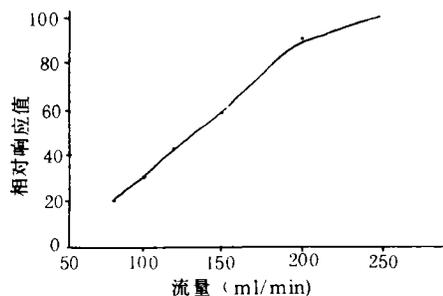


图 7 氢气流量与响应值关系

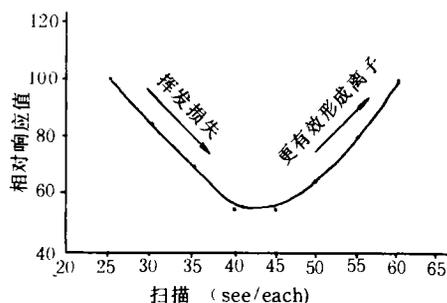


图 8 扫描速度与响应值关系

度区间响应值随扫描时间加长而减少是火焰活跃区外化合物的挥发逸失而造成,活跃区外但接近活跃区的地方,棒上温度可达 200 $^{\circ}\text{C}$ ^[20]。对于低的扫描速度响应值之所以增大是火焰区的高温加速了火焰中离子的形成,离子的形成量随温度的升高而逐渐增多。

4 结 论

首次采用 TLC/FID 法测定了大豆粉末磷脂的含量,通过优化选择确定展开剂为氯仿:甲醇:乙酸:水(65:20:10:5),在此展开剂下磷脂中主要成分 PC,PE,PI 和 PA 能得到较好分离,测量的重现性和精密度较好,各组分变异系数小于 12%;在 0~30 μg 范围内,响应值与点样量成良好线性关系,相关系数大于 0.99。

与常用的 HPLC 法和含磷量测定方法相比,TLC/FID 反映整个磷脂分子在氢火焰中响应,因此更能准确反映磷脂含量,并且可以一次同时测定多达 10 个样品,所以具有快速、准确和检测限低的特点。

参 考 文 献

- 1 Israel Hanin et al. Lecithin; Technological, Biological and Therapeutic Aspects, Plenum Press, New York, 1987
- 2 Barlett G R J. Biol. Chem. 1959, 234: 466~468
- 3 Dittmer J C, Wells M A. Methods Enzymol. 1969, 14: 482~530
- 4 Shellard E T. Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography. Academic Press, New York, 1968
- 5 Touchtone T, Sherma J. Densitometry in Thin-Layer Chromatography Practice and Applications. John Wiley & Sons, New York, 1979
- 6 Briand R L, Harold S, Blass K G. J. Chromatogr. 1981, 223: 277~284
- 7 Nasner A, Kraus L. Fett Seifen Anstrichm, 1981, 83: 70~73
- 8 Chen S S H, Kou A Y. J. Chromatogr. 1982, 227: 25~31
- 9 Nissen H P, Kreysel H W. Ibid 1983, 276: 29~35
- 10 Kaduce T L, Norton K G, Spector A A. J. Lipid Res. 1983, 24: 1398~1403
- 11 Chen S S H, Kou A Y, Chen H H Y. J. Chromatogr. 1982, 208: 339~346
- 12 Chen S S H, Kou A Y, Chen H H Y. Ibid, 1983, 276: 37~44
- 13 Rhee J S, Shin M G. J. Am. Oil Chem. Soc. 1982, 59: 98~99
- 14 Paton R D et al. Clin. Chim. Acta. 1983, 133: 97~110
- 15 Chen S S H, Kou A Y. J. Chromatogr. 1984, 307: 261~269
- 16 Sotirhos N, Herslof B, Kenne L J. Lipid Res. 1986, 27: 386~392
- 17 Vladimir A, Eryomin, Sergei P. Analytical Biochemistry, 1991, 180: 186~191
- 18 汤逢. 油脂化学. 江西工业出版社, 1982
- 19 Day A. Karlsen Organic Geochemistry, 1991, 17(5): 785~790
- 20 Ranny J C et al. Analytical Chemistry, 1987, 265(5): 1134

Quantitative Determination of Phospholipids with TLC/FID

Wang Xingguo Qiu Aiyong Tao Wenyi Shen Beiyong
(Dept. of Food Resource Sci. and Eng.)

Abstract The phospholipid contents of the commercial powdered soybean lecithin were determined with TLC/FID. The spread solvent of TLC used was chloroform : methanol : acetic acid : water (65 : 20 : 10 : 5). (Variation coefficient of individual components < 12%). The response value of FID within the range of 0~30 μ g was correlated to the amount of added sample. (correlation coefficient > 0.99)

Subject-words Phospholipid; Thin-Layer chromatography; Flame detectors; Determination