

# 保健胶囊中磷脂酰胆碱的 UPLC 检测 及质谱确证

王斌, 陈意光, 温少楷, 吴楚森, 陈伟力, 李洪燕, 吴玉銮, 罗海英

(广州质量监督检测研究院, 国家加工食品质量监督检验中心(广州), 广州市食品安全检测技术重点实验室, 广州市食品安全风险动态监测与预警研究中心, 广东广州 510110)

**摘要:** 建立了保健胶囊中磷脂酰胆碱的超高效液相色谱(UPLC)测定和超高效液相色谱-质谱/质谱(UPLC-MS/MS)确证方法。样品经直接稀释或液液分配除杂, 采用 BEH HILIC 色谱柱分离, 以甲醇和异丙醇为流动相进行等度洗脱, 二极管阵列(PDA)检测器进行定量分析, 采用 UPLC-MS/MS 电喷雾离子源正离子(ESI<sup>+</sup>)-多反应监测(MRM)模式进一步确证。仪器检出限为 0.001 mg/mL, 线性范围在 0.005 mg/mL 到 0.100 mg/mL 之间。采用阴性大豆油进行添加回收实验, 6 个浓度水平的平均添加回收率为 83.3%, 平均相对标准偏差为 4.5%。用该方法测定标示值为 11.4 g/100 g 的保健胶囊样品, 平行测定检测结果分别为 8.93 g/100 g 和 8.76 g/100 g, 相对标准偏差 3.02% 和 0.60%。结果表明, 该方法准确, 快速, 适用于保健胶囊中磷脂酰胆碱的检测和确证。

**关键词:** 保健胶囊; 磷脂酰胆碱; 超高效液相色谱; 超高效液相色谱-质谱/质谱

文章编号: 1673-9078(2015)7-336-341

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.052

## Phosphatidylcholine in Health Supplement Capsules Detected by Ultra-performance Liquid Chromatography and Verified by Mass Spectrometry

WANG Bin, CHEN Yi-guang, WEN Shao-kai, WU Chu-sen, CHEN Wei-li, LI Hong-yan, WU Yu-luan, LUO Hai-ying

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Guangzhou), Guangzhou Key Laboratory of Testing Technology for Food Safety, Guangzhou Research Center for Food Safety Risk Monitoring and Rapid Alert, Guangzhou 510110, China)

**Abstract:** A new method was established to detect phosphatidylcholine in health supplement capsules, using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and the result was further verified using UPLC-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The capsule contents were diluted before being tested or went through liquid-liquid-partitionedepuration. The analytes were separated using a BEH HILIC column and isocratic elution with methanol and isopropanol as the mobile phase. The analyte quantities were detected by a photodiode array (PDA) detector and further verified by UPLC-MS/MS operated using electrospray ionization cation (ESI<sup>+</sup>)-multi-reaction monitoring (MRM). The detection limit was 0.001 mg/mL and linear range was between 0.005 and 0.100 mg/mL. The mean addition recovery rate of 6 concentrations was 83.3%, with a mean, relative standard deviation of 4.5%. Health supplement capsule marked 11.4 g/100 g was tested using this method with parallel determination results of 8.93 g/100 g and 8.76 g/100 g and the relative standard deviation of 3.02% and 0.60%, respectively. The results showed that the method is accurate, fast, and suitable for the determination and verification of phosphatidylcholine in health supplement capsules.

**Key words:** health supplement capsule; phosphatidylcholine; ultra-performance liquid chromatography; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)是一类具有磷

收稿日期: 2015-03-13

基金项目: 港澳台科技合作专项(2013DFH30070)

作者简介: 王斌(1987-), 男, 助理工程师, 研究方向: 食品质量安全检测

通讯作者: 陈意光(1981-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品及化工产品质量安全检测

脂酰胆碱基团的磷脂类化合物, 其化学结构如图 1 所示, 具有亲水的酰基和疏水的高级脂肪酸链, 是一种两性分子。它是细胞膜的重要组成部分, 对维持生物膜正常功能有重要作用。磷脂酰胆碱也叫卵磷脂, 大脑通过卵磷脂传递信息, 胎儿在生长发育中对磷脂酰胆碱的需求很大。磷脂酰胆碱因具有促进神经传导、



流动相: 甲醇+异丙醇=3+2, 并用氨水调节 pH=8; 流速: 0.3 mL/min, 等度洗脱; 进样体积: 2  $\mu$ L; 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 检测器: PDA 检测器, 扫描波长 190~250 nm, 定量波长 205 nm。

### 1.2.4 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源, 正离子模式 (ESI+), 毛细管电压: 1.5 kV; 离子源温度: 150  $^{\circ}$ C; 脱溶剂气温度: 350  $^{\circ}$ C; 脱溶剂气流量: 650 L/h; 扫描方式: 多反应监测模式 (MRM); 锥孔电压: 40 V; 监测离子对 (m/z): 756.4/184, 86; 758.4/184, 86; 760.4/184, 86; 780.4/184, 84; 782.4/184, 86; 784.4/184, 86; 786.4/184, 86; 788.5/184, 86。离子碎片 m/z=184 的碰撞能均为 30 V, 离子碎片 m/z=86 的碰撞能均为 45 V。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的优化

#### 2.1.1 液相色谱柱的选择

GB/T 21493-2008 采用 Si-60 色谱柱对磷脂酰胆碱进行分离, 黄旋等<sup>[9]</sup>报道了一种采用 BEH C18 色谱柱进行分离的方法。因超高效液相色谱柱具有柱效高、节省时间、提高分辨率等优点, 本实验采用超高效液相色谱柱进行预实验, 考察了 HSS T3 和 BEH C18 两款色谱柱对大豆磷脂酰胆碱的分离效果, 如图 2a 和图 2b 所示, 两款色谱柱对磷脂酰胆碱都有较好的分离效果, 但不同的磷脂酰胆碱类化合物有不同的色谱保留时间, 难以定量。同时, 连续进样多针后, 化合物保留时间均往前漂移, 重现性较差。因此, 本方法未选择 BEH C18 和 HSS T3 色谱柱作为分离磷脂酰胆碱的色谱柱。

Grzegorz Kielbowicz<sup>[11]</sup>等采用 HILIC 色谱柱对磷脂酰胆碱进行分离, 获得良好的分离效果。BEH HILIC 色谱柱填料为无键合相的亚乙基桥联硅胶, 具有极低的柱流失, 因在不同的流动相下体现不同的特性而被广泛应用。在本方法的条件下, 亲水的磷酸胆碱基团与 BEH HILIC 柱填料键合相作用明显, 化合物呈现峰型尖锐对称的单峰 (如图 2c), 光谱图无明显杂质峰 (如图 3), 因此本方法选择 BEH HILIC 柱对磷脂酰胆碱进行分离。

#### 2.1.2 流动相的优化

典型 HILIC 柱对极性化合物的保留能力与流动相密切相关。低有机相比例 (高水相比例) 时在色谱柱上没有保留。当流动相的有机相比例足够高 (50% 或以上) 时, 极性化合物才会有保留。试验考察了乙腈

水和甲醇水两种流动相体系, 提高水相比例, 磷脂酰胆碱的色谱保留时间缩短, 峰型展宽; 提高有机相比例, 保留时间延长, 连续多次进样时, 柱压持续升高, 磷脂酰胆碱色谱保留时间漂移延后, 因此, 本文未采用有机相-水相体系作为流动相。

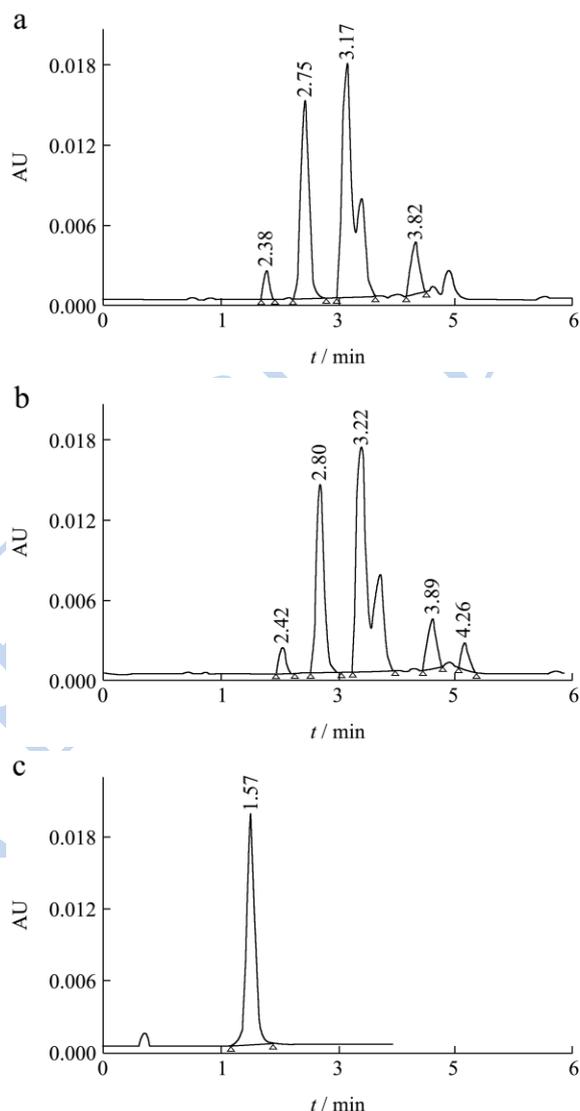


图 2 大豆磷脂酰胆碱标准溶液在不同色谱柱下的超高效液相色谱图

Fig2 UPLC of phosphatidylcholine from soybean using different columns

注: a: BEH C18 色谱柱, b: HSS T3 色谱柱, c: BEH HILIC 色谱柱。

异丙醇的洗脱能力比水弱, 将流动相中的水用异丙醇代替, 由于流动相极性降低, HILIC 柱对磷脂酰胆碱的保留能力增强。甲醇与异丙醇比例为 3:2 时, 磷脂酰胆碱与样品中的杂质可以实现有效分离。用氨水调节流动相 pH=8, 可以促进磷脂酰胆碱离子化, 改善色谱峰型。同时由于小分子量的甲醇和异丙醇的“润湿”作用, 使磷脂酰胆碱中高级脂肪酸基团有效

延展,连续进样多针,色谱柱压无显著变化,化合物保留时间未出现漂移,色谱分析周期仅为4.0 min,节省了溶剂,提高了分析效率。

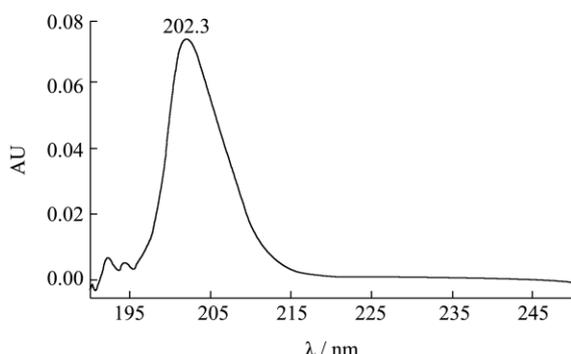


图3 大豆磷脂酰胆碱的光谱图

Fig.3 Spectrogram of phosphatidylcholine from soybean

## 2.2 质谱条件的优化

大豆磷脂酰胆碱是含有不同脂肪酸基团的磷脂酰胆碱化合物的混合物。采用电喷雾离子源正离子(ESI+)模式对大豆磷脂酰胆碱进行全扫描(全扫描质谱图见图4),得到质荷比(m/z)为610.3、684.2、756.6、758.6、760.6、780.6、782.6、784.6、786.6、804.6、806.6、832.3的分子离子峰,其中响应最高的m/z=758.6是典型的大豆磷脂酰胆碱化合物的分子离子峰。应用MS tune软件,对m/z=758.6进行轰击,可以得到相对丰度最高的子离子碎片m/z=184。m/z=184的基团在二级质谱中的裂解途径如图5所示,其中磷酸胆碱(m/z=184)是磷脂酰胆碱类化合物共有的结构基团。

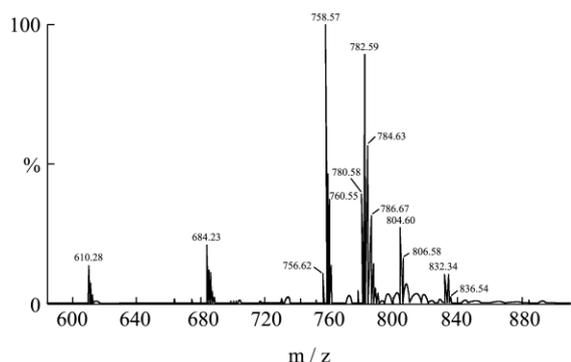


图4 大豆磷脂酰胆碱标准溶液全扫描质谱图

Fig. 4 Full scan mass spectrum of reference Phosphatidylcholine from soybean

通过对产生磷酸胆碱碎片m/z=184的所有母离子进行全扫描(parent scan),可以获得产生磷酸胆碱的磷脂酰胆碱类化合物母离子信息。m/z=184的母离子全扫描质谱图如图6所示,可见m/z=756.4、m/z=758.4、m/z=760.4、m/z=780.4、m/z=782.4、m/z=784.4、

m/z=786.4、m/z=788.5为大豆磷脂酰胆碱中产生碎片离子m/z=184的母离子。

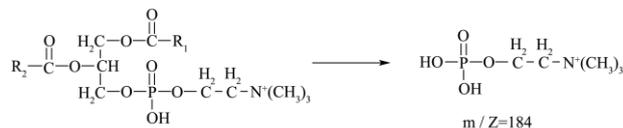


图5 磷脂酰胆碱在二级质谱中的裂解途径

Fig.5 Main fragmentation pathways of phosphatidylcholine in tandem mass spectrometry

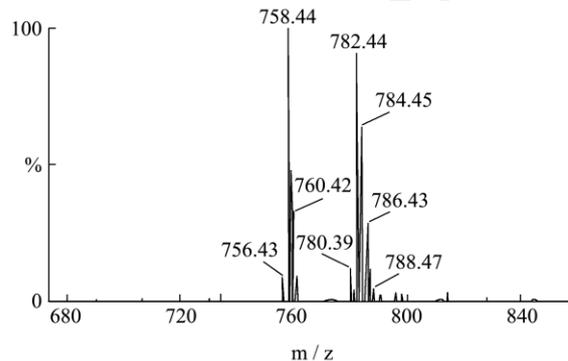


图6 碎片离子m/z=184的母离子扫描质谱图

Fig.6 Parent ion mass spectrometry scan of the fragment with 184 m/z

应用Masslynx软件对大豆磷脂酰胆碱离子对的多反应监测(MRM)条件进行优化。结果显示各磷脂酰胆碱类化合物中响应最强碎片的均为m/z=184和m/z=86。锥孔电压和碰撞能也较为接近。为了方便,本文将锥孔电压统一为40 V,m/z=184和m/z=86碰撞能均分别统一为30 V和45 V。

## 2.3 保健胶囊中磷脂酰胆碱的确证

保健胶囊中除含有大豆油和大豆磷脂外,还添加了帮助人体消化吸收的成分,在对磷脂酰胆碱进行定性时,容易对UPLC产生干扰,影响定性定量的准确性。串联质谱可提供磷脂酰胆碱结构信息,在定性确证方面更有针对性,因此,本方法将UPLC-MS/MS法作为胶囊中磷脂酰胆碱的确证方法。由于磷脂酰胆碱中高级脂肪酸含碳量和碳碳双键的不同导致质谱图中质荷比的差异,如m/z=758.4对应PC 34:2,m/z=760.4对应PC 34:1等<sup>[12]</sup>。因此,本文将“1.2.4 质谱条件”中的8对监测离子对作为大豆磷脂酰胆碱的定性离子,分析样品时与大豆磷脂酰胆碱标准物质进行比对,可实现对保健胶囊中大豆磷脂酰胆碱的确证。

## 2.4 前处理条件的选择和优化

Vilas V. Patil<sup>[13]</sup>采用丙酮萃取大豆磷脂中的磷脂酰胆碱,并通过冷冻干燥的方式对磷脂酰胆碱进行分

离和提纯,效果良好,但方法耗时长,实验条件要求高,不适宜推广使用。本文针对保健胶囊中磷脂酰胆碱含量的不同,采用乙醇逐级稀释和液液萃取方式进行提取。实验表明,磷脂酰胆碱含量大于或等于 5.0 g/100g 的样品,用乙醇稀释 5000 倍或以上,杂质对检测的干扰可以忽略不计。磷脂酰胆碱含量低于 5.0 g/100g 的样品则采用液液分配的方式除杂。液液萃取是精制磷脂酰胆碱常用的提取手段,其中乙醇和异丙醇等醇类是良好的萃取剂<sup>[14]</sup>。本文采用乙醇水混合溶液作为萃取剂,优化后的萃取剂对磷脂酰胆碱的平均回收率为 83.3%。保健胶囊内容物的主要成份为大豆油,采用油溶性的正己烷可以有效去除大部分的油脂。除去正己烷的时,保留处于提取液和正己烷溶液界面的正己烷残留可以避免实验结果偏低。

## 2.5 线性关系、检出限和定量限

分别移取适量标准储备液于 10 mL 容量瓶中,乙醇配制浓度为 0 mg/mL、0.005 mg/mL、0.010 mg/mL、0.020 mg/mL、0.050 mg/mL、0.100 mg/mL 的标准工作液。将上述标准工作溶液由低浓度到高浓度依次供 UPLC 测定,以峰面积-浓度作图,得到工作标准曲线,线性回归方程为  $y=2.423e^4x+0.8180$ , 相关系数  $r^2=0.9996$ 。以 3 倍和 10 倍性噪比 (S/N) 作为 UPLC 方法的检出限和定量限,得检出限为 0.001 mg/mL,定量限为 0.003 mg/mL。

## 2.6 方法回收率与相对标准偏差

表 1 阴性大豆油中磷脂酰胆碱的加标回收率及精密度 (n=7)

**Table 1 Recoveries and accuracy for phosphatidylcholine in negative soybean oil (n=7)**

Added (g/100g)	Recovery (%)	RSD (%)
0.1	88.9	3.9
0.5	87.4	4.3
1	82.1	3.5
2	84.9	6.3
5	79.6	3.4
10	76.7	5.8

市售大豆油为精炼大豆油,成分与保健胶囊内容物相似,经本实验方法进行处理,选取磷脂酰胆碱浓度低于检出限的阴性大豆油进行加标回收实验。采用标准加入法,加标浓度覆盖低、中、高 3 个不同磷脂酰胆碱含量范围。方法的平均加标回收率 (n=7),相对标准偏差如表 1 所示,实验结果表明,本方法满足定量检测的要求。

## 2.7 样品测定结果

测定了由保健品胶囊企业提供的二批次样品,样品标示含量为 11.4 g/100 g。同一批次样品平行测定三次,取平均值。二批次样品测定结果分别为 8.93 g/100 g, 8.76 g/100 g。相对标准偏差分别为 3.02%、0.60%,检测方法精密度满足要求。

## 3 结论

本文建立了保健胶囊中磷脂酰胆碱的 UPLC 测定和 UPLC-MS/MS 确证方法。保健胶囊中磷脂酰胆碱通过 BEH HILIC 柱进行分离,甲醇异丙醇混合溶液等度洗脱,峰型对称尖锐,便于定量。磷脂酰胆碱的超高效液相色谱-质谱/质谱方法,可对样品中的磷脂酰胆碱进行定性确证。该方法前处理简单,检测限低于现行国标,准确性和精密度满足测定要求,适用于保健胶囊中磷脂酰胆碱的检测和确证。

## 参考文献

- [1] 郑建仙.功能性食品学[M].北京:中国轻工业出版社,2009  
ZHENG Jian-xian. Functional foods: principles and technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009
- [2] Zhang W, He H, Feng Y. Separation and purification of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from soybean degummed oil residues by using solvent extraction and column chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2003(798): 323-331
- [3] 杜阳吉.大豆粗磷脂中磷脂酰胆碱的分离纯化研究[J].中国食品添加剂,2014,4:86-91  
DU Yangji. Study on the isolation and purification of phosphatidylcholines from crude soybean lecithin [J]. China Food Additives, 2014, 4:86-91
- [4] 王成涛,李桂华,代红丽,等.不同方法精制的磷脂酰胆碱纯度及脂肪酸组成分析[J].河南大工业大学学报,2009,30(6): 47-51  
WANG Cheng-tao, LI Gui-hua, DAI Hong-li, et al. Analysis of purity and fatty acid composition of phosphatidylcholine refined by different methods [J]. Journal of Henan University of Technology, 2009, 30(6): 47-51
- [5] GB/T 21493-2008,大豆磷脂中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇的测定[S]  
GB/T 21493-2008, Determination of phosphatidyl-ethanolamine, phosphatidylinositol and phosphatidylcholine of soybean phospholipids [S]
- [6] 关明,侯俊峰,古再丽努尔 阿尔肯,等.高效液相色谱分离与

- 分析胡麻卵磷脂中磷脂酰胆碱[J].食品科学,2013,34(18): 223-226
- GUAN Ming, HOU Jun-feng, GUZAILINUER Aerken, et al. Separation and analysis of phosphatidylcholine in flax lethin by HPLC [J]. Food Science.2013, 34 (18): 223-226
- [7] 莫建光,卢安根,徐慧,等.食品中磷脂酰胆碱检测技术的研究进展[J].食品工业科技.2010,31(1):409-41
- MO Jian-guang, LU An-gen, XU Hui, et al. Research of determination of phosphatidylcholine in food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(1): 409-411
- [8] 刘狄,刘明,冯宝民,等.高效液相色谱-蒸发光散射法测定甘油磷脂酰胆碱[J].分析科学学报,2014,30(3):377-380.
- LIU Di, LIU Ming, FENG Bao-ming, et al. Determination of L- $\alpha$ -Glycerol-phosphatidylcholine by High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Light Scattering Detection [J]. Journal of Analytical Science, 2014, 30 (3): 377-380
- [9] 黄旋,生庆海,张志国,等.超高压液相色谱质谱联用法检测磷脂酰胆碱[J].食品工业科技,2012,33(16): 96-98
- HUANG Xuan, SHENG Qing-hai, ZHANG Zhi-guo, et al. Method of UPLC-MSMS about phosphatidylcholine detection [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 22 (11): 35-37
- [10] V Verardo, A M Gómez-Caravaca, C Montealegre, et al. Optimization of a solid phase extraction method and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the determination of phospholipids in virgin olive oil [J]. Food Research International. 2013, 54: 2083-2090
- [11] Grzegorz Kielbowicz, Damian Smuga, Witold Gładkowski, et al. An LC method for the analysis of phosphatidylcholine hydrolysis products and its application to the monitoring of the acyl migration process [J]. Talanta, 2012, 94: 22-29
- [12] Olivier Berdeaux, Pierre Juaneda, Lucy Martine, et al. Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very-long-chain polyunsaturated fatty acid in bovine and human retina using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217: 7738-7748
- [13] Vilas V Patil, Revanappa V Galge, Bhaskar N Thorat. Extraction and purification of phosphatidylcholine from soyabean lecithin [J]. Separation and Purification Technology, 2010, 75: 138-144
- [14] Hui Guo, Zhongyu Zhang, Junqing Qian, et al. Optimization of the liquid-liquid extraction of phosphatidyl-choline from rapeseed oil gums by response surface methodology [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 42: 500-506