



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110514776 A

(43)申请公布日 2019.11.29

(21)申请号 201910827733.5

(22)申请日 2019.09.03

(71)申请人 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址 266000 山东省青岛市市南区南京路  
106号

(72)发明人 彭吉星 王联珠 谭志军 郭莹莹  
吴海燕 翟毓秀 郭萌萌 郑关超

(74)专利代理机构 北京开林佰兴专利代理事务  
所(普通合伙) 11692

代理人 刘帅帅

(51)Int.Cl.

G01N 30/88(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 30/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种南极磷虾油中磷脂的检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种南极磷虾油中磷脂的检测方法,属于水产品检测技术领域。采用氨基固相萃取柱对南极磷虾油进行净化并富集磷脂,利用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD),选用正相硅整体胶柱,正己烷-异丙醇-乙酸溶液为流动相进行梯度洗脱,该方法操作简单、准确度高,可以对南极磷虾油中磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)三种主要磷脂的进行准确定性和定量分析。

1. 一种南极磷虾油中磷脂的检测方法,其特征在于它包括以下步骤:

(1) 样品溶解:准确称取50mg磷虾油,加入3ml色谱纯氯仿,涡旋混合。

(2) 样品净化:取氨基固相萃取柱(1000 mg/6 ml)先用5ml氯仿活化,然后将溶解后的磷虾油试样移入固相萃取柱中上样,依次用15ml的氯仿-异丙醇溶液(2:1),10ml乙醚-乙酸溶液(72:1),15ml甲醇溶液洗脱,收集甲醇洗脱液,洗脱液用旋转蒸发在35℃条件下浓缩近干,然后加入正己烷-异丙醇(2:3)溶解定容至10 mL,10000 r/min 离心5分钟后过0.45 μm有机滤膜用于色谱分析。

(3) 液相色谱-蒸发光检测器测定:在优化的色谱条件下,将三种磷脂的混合标准溶液和样品待测液进样依次测定,根据标准品的保留时间确定样品中的磷脂组分,以标准溶液中各组分色谱峰面积为横坐标,各组分的质量浓度为纵坐标进行回归分析,将样品溶液的峰面积代入乘幂回归方程,从而获得样品中目标物的含量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述步骤(2)取氨基固相萃取柱用氯仿活化上样后,依次用15ml的氯仿-异丙醇溶液(2:1),10ml乙醚-乙酸溶液(72:1),15ml甲醇溶液洗脱,收集甲醇洗脱液。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述步骤(2)中对洗脱液进行浓缩时旋转蒸发温度为35℃。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述步骤(3)中优化的色谱条件为:Chromolith Performance-Si正相整体硅胶色谱柱4.6 mm×100mm;柱温:25℃;流速:1.5 mL/min;载气压力:40 psi;漂移管温度:55 °C;进样量:10 μL;流动相:A为正己烷(含0.04%三乙胺),B为异丙醇C 为13%乙酸水溶液;洗脱梯度:0~0.5min,40% A, 57%B, 3%C;0.5~8.0 min,40% A, 50%B, 10%C;8.0~12.0 min,40% A, 50%B, 10%C。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述步骤(3)中各标准品的浓度范围分别为:PE(10~180 μg/mL)、PC(30~540 μg/mL)及LPC(20~360 μg/mL)。以磷脂浓度为横坐标,色谱峰峰面积为纵坐标,按 $y=ax^b$ 对标准曲线进行拟合,分别得到3种磷脂的乘幂曲线方程。

## 一种南极磷虾油中磷脂的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于水产品检测技术领域,具体涉及一种南极磷虾油中磷脂的定性及定量检测方法。

### 背景技术

[0002] 磷虾油是以优质磷虾粉为原料,经干燥、提取、过滤、分离、纯化、浓缩精制得到的产品。磷虾油富含磷脂、DHA、EPA等 $\omega$ -3必需脂肪酸,且 $\omega$ -3脂肪酸以磷脂形式存在,生物体利用率高达95%~98%,具有优异的健脑、抗炎症、增强免疫力等功能,对心血管、神经、骨骼和关节、视力、皮肤等有健康益处,2013年底,磷虾油被获批为国家新食品原料(国家卫生计生委2013年第16号文),可作为普通食品原料,为南极磷虾的综合开发利用创造了有利条件。

[0003] 磷脂为含有磷酸的脂类,根据结构可分为甘油磷脂和鞘磷脂。甘油磷脂与甘油三酯类似,其差异在于磷酸基取代了其中一种脂肪酸,甘油磷脂中含量较高有磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇,具有防治心血管疾病,改善学习能力,增强免疫力等功能特性。鱼类和甲壳类等海产动物是动物磷脂的主要来源,特别是从南极磷虾萃取的磷虾油中磷脂含量丰富,约为40%~45%。磷脂种类丰富,而国内常用的检测方法如比色法、分光光度法、电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-AES)法,只能测定其中总磷脂的含量,而且影响因素多,成分的准确性较差,无法对其关键成分进行定量分析检测,另外现有的食品国标中的磷脂液相色谱检测方法检测范围不包括水产品及其制品,导致不能准确全面反映产品的质量优劣。由于目前我国缺少对水产品中磷脂的测定方法标准,无法开展对水产品包含南极磷虾油等产品的营养评价,也阻碍了水产品高值化利用的步伐,因此急需建立水产品及其制品中磷脂含量的测定。已有研究证明HPLC是目前磷脂分离和定性定量分析中最常用的方法,紫外检测器(UV)和蒸发光散射检测器(ELSD)是常用检测器。由于ELSD的响应信号独立于分子中的不饱和双键数目,不仅比UV检测器更为灵敏而且ELSD在梯度洗脱程序中能提供稳定的基线,因此,适宜建立HPLC-ELSD法检测南极磷虾油中磷脂。

### 发明内容

[0004] 本发明解决的技术问题是提供一种南极磷虾油中磷脂的定性及定量检测方法。本发明以加工过的磷虾油原油或胶囊为研究对象,加入氯仿溶解稀释后,再用Sep-pak NH<sub>2</sub>固相萃取小柱去除脂质等干扰物,实现了多种磷脂的同步提取净化;同时,在优化色谱条件的基础上,利用HPLC-ELSD不仅改善了磷脂的分离效果,实现了同时分析磷虾油中三种主要磷脂即磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、溶血磷脂酰胆碱(LPC),并获得了高灵敏的定量结果。本发明方法提高了磷虾油中磷脂测定方法的准确性和可靠性,为准确评价磷虾油中磷脂含量提供了新技术手段。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0006] 一种南极磷虾油中磷脂的测定方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0007] (1) 样品溶解:准确称取50mg磷虾油样品,于10mL玻璃管中,加入3mL氯仿混匀溶解样品。

[0008] (2) 样品净化:取上述溶解的样品直接加载到预先用5mL氯仿活化的Sep-pak NH<sub>2</sub>固相萃取柱中,依次用15.0mL氯仿-异丙醇(2:1)溶液和10.0mL乙醚-乙酸混合溶液(72:1)淋洗小柱,再用15.0mL甲醇洗脱;洗脱液用旋转蒸发在35℃条件下浓缩近干,加入正己烷-异丙醇(2:3)混合溶液溶解定容至10mL,过0.45um滤膜然后上机检测分析;

[0009] (3) 液相色谱-蒸发光散射法测定:在优化的色谱条件下,将三种磷脂的混合标准溶液和样品待测液分别进样测定,以标准溶液中各组分的保留时间对样品中的磷脂种类进行定性分析,以标准溶液中各组分的的质量浓度为横坐标,各组分的峰面积为纵坐标制作标准曲线,将样品溶液的峰面积代入乘幂方程,采用外标法分析样品中磷脂的含量;

[0010] 进一步,所述步骤(1)中氯仿为色谱纯。

[0011] 进一步,所述步骤(2)中所用试剂均为色谱纯,固相小柱为氨基柱,洗脱试剂依次为15.0mL氯仿-异丙醇(2:1),10.0mL乙醚-乙酸混合溶液(72:1),15.0mL甲醇,收集甲醇相浓缩时旋转蒸发的温度为35℃。

[0012] 进一步,所述步骤(3)中优化的色谱条件为:Chromolith Performance-Si整体硅胶色谱柱4.6×100mm;柱温:25℃;流速:1.5mL/min;载气压力:40psi;漂移管温度:55℃;进样量:10μL;流动相:A为正己烷(含0.04%三乙胺),B为异丙醇,C为13%乙酸水溶液;洗脱梯度:0~0.5min,40%A,57%B,3%C;0.5~8.0min,40%A,50%B,10%C;8.0~12.0min,40%A,50%B,10%C。

[0013] 进一步,所述步骤(3)中标准曲线为:各标准品的浓度范围分别为:PE(10~180μg/mL)、PC(30~540μg/mL)及LPC(20~360μg/mL)。以磷脂浓度为横坐标,色谱峰峰面积为纵坐标,按 $y = ax^b$ 对标准曲线进行拟合,分别得到3种磷脂的标准曲线方程。

[0014] 本发明与现有技术相比的有益效果:

[0015] 1.用蒸发光测磷虾油中磷脂没有文献报道过,相对于报道的其他方法,本方法更除了能定量不同磷脂且结果准确些。本发明技术方案利用蒸发光散射检测器对磷虾油中的磷脂进行检测,相对于紫外检测器检测结果偏高和钼蓝比色法不能对磷脂种类进行分析,能更准确的对磷脂种类和含量进行分析。

[0016] 2.Sep-pak NH<sub>2</sub>固相萃取柱净化策略,相对于预填装的简易硅胶柱,不仅实现对PC/PE/LPC的有效富集保留,还能除去磷虾油中其它的脂质干扰,保证实验的稳定性;本方法采用氨基柱进行了净化,降低基质对结果干扰,基线更稳定。

[0017] 3.本发明技术方案选用硅胶整体柱,其高流速,高柱效的优点将流速提高为1.5mL/min分析时间缩短为12分钟;使用正己烷(含0.04%三乙胺),异丙醇,13%乙酸水溶液作为流动相,洗脱梯度实现了各组分的基线分离。本方法的取样量和标准曲线的范围经过优化后更适合磷虾油磷脂的含量测定。

## 附图说明

[0018] 图1为三种磷脂标准品混合液HPLC-ELSD谱图。

[0019] 图2为南极磷虾油实际样品中磷脂的HPLC-ELSD谱图。

[0020] 图3为3种磷脂的乘幂方程曲线。

## 具体实施方式

[0021] 下面通过实施例对本发明的技术方案做进一步解释,但本发明的保护范围不受实施例任何形式上的限制。

### [0022] 实施例

#### [0023] 1、本实施例选用的仪器和试材

[0024] (1) Waters 2695型高效液相色谱及2424蒸发光散射检测器(Waters公司);Vortex 2旋涡混合器(IKA公司);Himac CR 22G II高速离心机(Hitachi公司);R-215V旋转蒸发器(Buchi公司);Milli-Q超纯水仪(Millipore公司);固相萃取装置(Supelco公司)。

[0025] (2) 标准物质:3种磷脂标准品:磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)(纯度 $\geq 95\%$ ),Sigma公司。

[0026] (3) 甲醇、正己烷、异丙醇、氯仿、(HPLC级,Fisher公司);三乙胺、乙酸(HPLC级,Sigma公司);超纯水( $18.2M\Omega \cdot cm$ );Sep-pak NH<sub>2</sub>固相萃取柱(1000mg/6mL,Waters公司),其他未作特殊说明的试剂均为分析纯。

#### [0027] 2、样品预处理步骤:

[0028] (1) 样品溶解:准确称取50mg磷虾油样品,于10mL玻璃管中,加入3mL氯仿混匀溶解样品。

[0029] (2) 样品净化:取上述溶解的样品直接加载到预先用5mL氯仿活化的Sep-pak NH<sub>2</sub>固相萃取柱中,依次用15.0mL氯仿-异丙醇(2:1)溶液和10.0mL乙醚-乙酸混合溶液(72:1)淋洗小柱,再用15.0mL甲醇洗脱;洗脱液用旋转蒸发在35℃条件下浓缩近干,加入正己烷-异丙醇(2:3)混合溶液溶解定容至10mL,过0.45 $\mu m$ 滤膜然后上机检测分析;

[0030] 3、仪器分析条件:Chromolith Performance-Si整体硅胶色谱柱(4.6 $\times$ 100mm);柱温:25℃;流速:1.5mL/min;载气压力:40psi;漂移管温度:55℃;进样量:10 $\mu L$ ;流动相:A为正己烷(含0.04%三乙胺),B为异丙醇,C为13%乙酸水溶液;洗脱梯度:0~0.5min,40%A,57%B,3%C;0.5~8.0min,40%A,50%B,10%C;8.0~12.0min,40%A,50%B,10%C。

#### [0031] 4、仪器分析条件的优化

[0032] (1) 色谱条件的优化:为了获得更好的分离度,本发明比较Zorbax Rx-Sil(4.6mm $\times$ 250mm,5 $\mu m$ )柱和Chromolith Performance-Si(4.6 $\times$ 100mm)两款分析色谱柱,Waters BEH C<sub>18</sub>虽然柱压较高,但由于粒径更小,从而改善了分离效果、提高了柱效。Zorbax Rx-Sil柱能在30min内分析将PE、PC、LPC全部分离;Chromolith Performance-Si柱能在12min内将PE、PC、LPC三种磷脂分离,其中Zorbax Rx-Sil柱色谱图中,LPC分离为两个峰,可能是磷脂结构的多样性导致LPC出现分离;Chromolith Performance-Si柱的整体分离效果良好,柱压低基线平稳背景噪声少,能在较短时间内将PE、PC、LPC全部分离。综合考虑,选用Chromolith Performance-Si色谱柱,对南极磷虾油中磷脂进行分析。

[0033] 本发明最初选用A:甲醇-水-乙酸-三乙胺(85:15:0.45:0.05)B:正己烷-异丙醇-流动相A(20:48:32)进行梯度洗脱,但在重复性测定实验中发现,但PE色谱峰靠近溶剂峰,容易与溶剂峰重叠,影响检测结果。因此,选取正己烷(含0.04%三乙胺),异丙醇,13%乙酸水溶液,优化后的色谱条件确保色谱峰的峰形、分离度,实现了12分钟内对三种磷脂的同时分离和测定,见图1、图2。

#### [0034] 4、样品预处理方法的优化

[0035] 采用不同的净化方法处理南极磷虾油样品并比较磷脂的富集回收效果见表1,发现净化柱种类对磷脂的富集效果影响较大,其中NH<sub>2</sub>固相萃取柱和Si固相萃取柱对PE的富集效果无显著性差异 ( $p > 0.05$ ),对PC和LPC的富集效果有显著性差异 ( $p < 0.05$ ),可能是极性磷脂通过氢键和偶极相互作用吸附在Si柱上,导致极性较强的PC和LPC不易洗脱下来;从洗脱液的角度来看选用NH<sub>2</sub>固相萃取柱进行净化时,与含有丙酮的洗脱液相比,含有乙醚-乙酸(72:1)的洗脱液,能更好的将PE洗脱下来,可能是因为洗脱液中加入了乙酸,提供的酸性环境使PE与NH<sub>2</sub>柱的结合减弱,从而使PE更容易被洗脱下来。经过综合分析,选用NH<sub>2</sub>固相萃取柱作为净化柱,以氯仿-异丙醇(2:1)、乙醚-乙酸(72:1)、甲醇作为洗脱液,对南极磷虾油中的磷脂进行净化富集处理。

[0036] 表1.不同净化方法测定南极磷虾油中磷脂含量

[0037]

净化柱	洗脱液			磷脂含量 (g/100g)			
	1	2	3	PE	PC	LPC	总含量
NH <sub>2</sub> 柱	氯仿-异丙醇	乙醚-乙酸	甲醇	1.34±0.0 1	41.30±0.9 1	2.39±0.63	46.28±1.0 3
NH <sub>2</sub> 柱	氯仿-异丙醇	丙酮	甲醇	0.31±0.3 0	40.94±0.9 0	2.27±0.07	43.51±1.2 7
NH <sub>2</sub> 柱	氯仿	乙醚-乙酸	甲醇	1.15±0.1 1	40.85±0.8 9	2.45±0.09	45.35±0.8 8
NH <sub>2</sub> 柱	氯仿	丙酮	甲醇	0.00±0.0 0	40.32±0.3 3	2.37±0.08	42.70±0.2 5
Si柱	氯仿-异丙醇	乙醚-乙酸	甲醇	1.82±0.2 7	20.69±1.6 6	0.80±0.05	24.41±2.1 7
Si柱	氯仿-异丙醇	丙酮	甲醇	1.96±0.1 5	23.96±2.2 8	0.51±0.50	27.73±2.6 0
Si柱	氯仿	乙醚-乙酸	甲醇	1.96±0.0 7	25.51±0.9 3	0.95±0.10	29.55±0.8 2
Si柱	氯仿	丙酮	甲醇	1.21±0.6 0	17.97±1.0 1	1.54±0.80	22.24±0.5 5

[0038] 5、灵敏度、准确度和精密度

[0039] 本实施例根据测定的样品中磷脂的含量以信噪比 ( $S/N \geq 3$ ) 确定检出限,取三种磷脂的混合标准溶液,配制一系列浓度梯度的标准溶液进行依次测定,以磷脂含量为横坐标,色谱峰峰面积为纵坐标按  $y = ax^b$  对曲线进行拟合,分别得到3种磷脂的标准曲线方程,曲线

范围和相关系数,见图3。

[0040] 采用空白加标法,以成品大豆油为空白基质样品,分别添加不同浓度的磷脂混合标准溶液,加标回收实验分为3个批次,每个批次设3个浓度,每个浓度设3组平行。其中PE添加量为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,PC添加量为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,LPC添加量为30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,按照确定的纯化方法处理样品,分析磷脂含量,计算各磷脂的加标回收率和精密度。结果表明(表2、3),三种磷脂的线性良好,检出限为1.5~5.0mg/g,加标回收率范围为85%~110%,RSD小于10%,相对于已报道的钼蓝比色法、薄层色谱,核磁共振法,本方法灵敏度、准确度及精密度较优,操作简单方便,更适用于磷虾油中三种磷脂的定量分析。

[0041] 表2. 磷脂标准曲线线性范围、乘幂方程、相关系数、检出限和定量限

[0042]

磷脂	曲线范围 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	乘幂方程 $y=ax^b$	相关系	检出限(mg/g)	定量限 (mg/g)
			数 ( $R^2$ )		
PE	10~180 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$y = 1102x^{1.475}$	0.999	1.5	3.0
PC	30~540 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$y = 3226x^{1.385}$	0.999	5.0	8.0
LPC	20~360 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$y = 1727x^{1.152}$	0.999	3.0	5.0

[0043] 注:按取样量50mg计算。

[0044] 表3. 三种磷脂的加标回收率和精密度

磷脂	添加浓度	回收率(%)	RSD
	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		(%,n=3)
PE	20.00	94.92	4.98
	60.00	93.24	3.72
	100.00	88.50	2.97
PC	50.00	89.77	0.69
	150.00	91.52	0.72
	250.00	90.69	3.18
LPC	30.00	109.49	7.05
	90.00	105.00	9.10
	150.00	100.00	2.43

[0046] 6、实际样品的检测

[0047] 应用本方法定性检测6种成品南极磷虾油中磷脂的含量,南极磷虾油中主要含有PE、PC、LPC三种磷脂,各磷脂组分含量差异明显,其含量为PC>LPC>PE,其中PC的含量最高,为28.73g/100g~38.52g/100g,占总磷脂含量的76.15%~92.22%;LPC含量次之,为2.27g/100g~7.29g/100g,占总磷脂含量的5.41%~18.55%;PE的含量较少,为0.30g/

100g~2.69g/100g,占总磷脂含量的0.74%~7.36%,见表4。

[0048] 表4.六种成品南极磷虾油中磷脂含量的检测结果

[0049]

样品	PE		PC		LPC	
	含量	占比	含量	占比	含量	占比
	(g/100g)	(%)	(g/100g)	(%)	(g/100g)	(%)
1#	0.30±	0.74	32.76±	81.19	7.29±0.78	18.07
[0050]	0.03		0.81			
2#	0.56±	1.41	32.40±	81.35	6.87±0.52	17.24
	0.07		2.03			
3#	1.35±	3.39	33.79±	85.29	4.49±0.21	11.32
	0.12		0.62			
4#	2.00±	5.30	28.73±	76.15	7.00±0.03	18.55
	0.04		0.13			
5#	2.69±	7.36	31.32±	85.80	2.50±0.37	6.85
	0.22		0.40			
6#	0.99±	2.37	38.52±	92.22	2.27±0.20	5.41
	0.16		0.81			

[0051] 以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案,并非对本发明作任何形式上的限制,在不超出权利要求所记载的技术方案的前提下还有其他的变体及改型。



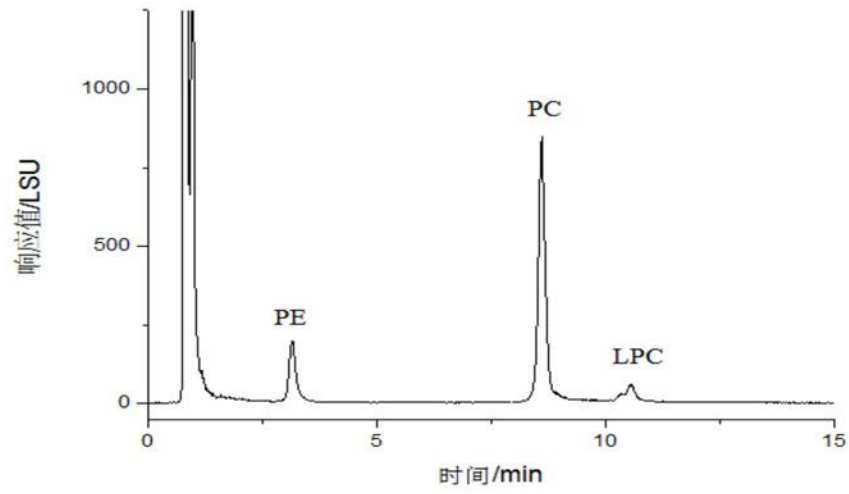


图1

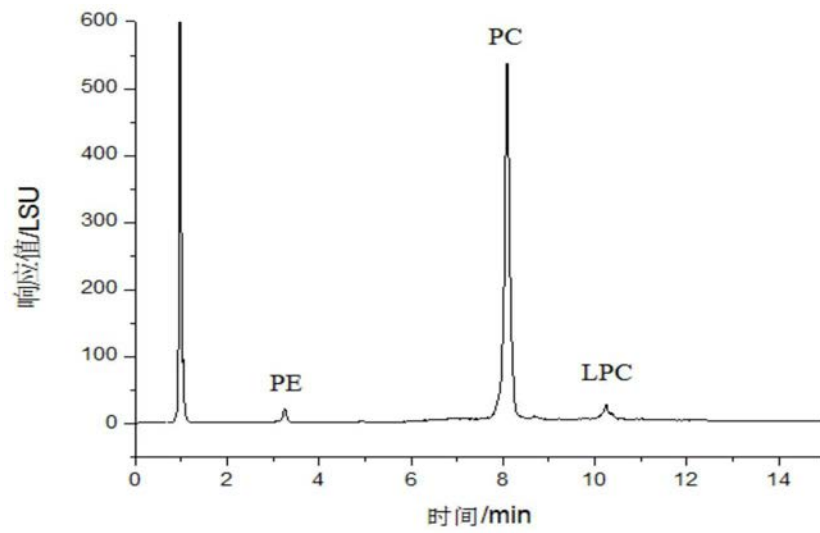


图2

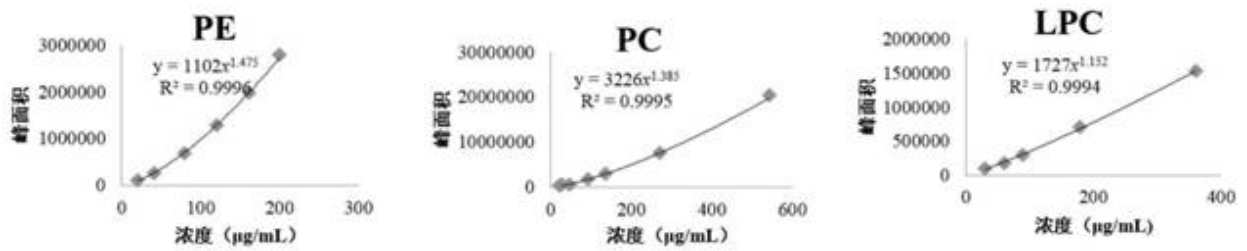


图3