

油脂深加工

磷脂酰丝氨酸的酶法制备与分离研究进展

周彦峰,张涛,江波,沐万孟,缪铭

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室,江苏无锡214122)

摘要:磷脂酰丝氨酸(PS)的制备有溶剂提取法、化学合成法和酶转化法。采用溶剂提取法从动物组织提取PS由于“疯牛病”原因而受质疑;化学合成法成本较高,工艺复杂,且纯度和收率有待提高;酶转化法具有反应条件温和、反应易控、高效简单的优势,越来越受到关注。主要对磷脂酰丝氨酸的酶法制备以及分离纯化方法进行了综述,对其生产制备过程提出了合理的建议和策略。

关键词:磷脂酰丝氨酸;磷脂酶D;制备;分离

中图分类号:Q545;TS201.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)10-0053-05

Advance in enzymatic preparation and separation of phosphatidylserine

ZHOU Yanfeng, ZHANG Tao, JIANG Bo, MU Wanmeng, MIAO Ming

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Phosphatidylserine (PS) can be prepared by solvent extraction, chemical synthesis and enzymatic synthesis. PS extracted from animal tissues by solvent extraction is questioned because of bovine spongiform encephalopathy. Chemical synthesis has the weakness of high cost and complex process, also the purity and yield need to be improved. Enzymatic synthesis has the advantages of mild conditions, easy to control and high efficiency, and it attracts a lot of attention. The preparation of PS by enzymatic synthesis and the separation and purification methods were reviewed, and some reasonable suggestions and strategies were put forward.

Key words: phosphatidylserine; phospholipase D; preparation; separation

磷脂酰丝氨酸(PS)是磷脂质的一种,其结构是以甘油为主要骨架,1、2号碳原子上分别连接不同的脂肪酸,3号碳原子上连接丝氨酸,分别构成了磷脂的疏水端和亲水端。

2006年韩国食药局(KFDA)允许宣传PS具有增强记忆力等功能,同年10月,PS被美国FDA通过GRAS认证,允许将其作为营养强化剂添加到食品中,2010年PS通过了日本的食物添加审查,同年10月我国卫生部将PS添加到新资源食品目录中。PS在制药和功能食品领域具有广泛的应用,能够改善老年人的阿尔茨海默病,具有保护神经和抗氧化

作用,PS还具有提高记忆力、缓解紧张、减轻抑郁等功效^[1]。PS在功能食品和制药领域有着广阔的应用前景。

PS的制备方法主要有溶剂提取法、化学合成法和酶转化法。溶剂提取法需要使用大量的溶剂,对环境有一定的污染,并且由于“疯牛病”的发生,该方法制得的PS受到了较多的质疑;化学合成法也需要使用有机溶剂而污染环境且转化效率不高。酶转化法具有反应条件温和、反应易控、高效简单等优势,并且由于近几年绿色生物溶剂的快速发展,在酶法中有替代传统溶剂的趋势,可以加以开发和利用。PS的分离纯化方法有薄板层析法、柱色谱法和高效液相色谱法。本文对PS的酶法制备和分离纯化方法进行了综述,同时对酶法制备方法提出了下一步的研究方向和建议,为PS的大规模制备提供参考。

1 磷脂酰丝氨酸的酶法制备

PS的酶法制备是利用磷脂酶D的催化功能,作用于磷酸二酯键,在丝氨酸的存在下,发生转磷脂酰

收稿日期:2018-01-16;修回日期:2018-06-21

基金项目:“十三五”国家重点研发计划(2017YFD0400600)

作者简介:周彦峰(1991),男,硕士研究生,研究方向为食品生物技术(E-mail)zhouyanfeng234@163.com。

通信作者:张涛,教授,博士(E-mail)zhangtao@jiangnan.edu.cn。

反应,生成 PS 的方法。相关的研究集中在酶法合成的工艺条件优化和新型溶剂的替代作用等,酶法合成 PS 具有广阔的市场前景。

1.1 普通有机相-水双相体系

酶反应过程需要底物磷脂酰胆碱(PC)、丝氨酸和磷脂酶 D(PLD)的参与,其中底物 PC 和产物 PS 具有疏水性,可溶于有机相,而丝氨酸和 PLD 存在于水相,并且 PLD 需要在水相条件下保持稳定的功能活性,进而参与反应,所以 PLD 催化的转磷脂酰反应多数是在两相体系中完成的。

双相体系引起的反应复杂性在于有机溶剂能够

与水、酶、底物和产物之间相互作用,造成酶活的改变以及转化率的下降。Hosokawa 等^[2]和张忆雪^[3]分别研究了不同有机溶剂对酶反应转化率的影响,其中乙酸乙酯和乙醚作为有机相反应时,PS 转化率最高,分别可以达到 36.2% 和 52.5%,而当四氯化碳和石油醚作有机相时,几乎没有 PS 生成。双相体系的酶反应优化研究集中在有机相种类选择、水相缓冲液选择、两相体积比、PC 与丝氨酸浓度比、反应温度、pH 等条件。表 1 总结了目前研究的优化条件结果。

表 1 普通两相体系不同反应条件

菌种来源	有机相	两相体积比 ^a	底物浓度比 ^b	加酶量/U	温度/℃	pH	转化率/%
链霉菌 CA-1	乙酸乙酯	2:1	1:3	160	40	4.5	67.8 ^[4]
李色链霉菌	乙醚	2:1	1:50	NA	35	5.5	58.7 ^[5]
链霉菌	乙醚	1.5:1	NA	NA	32	5.3	52.5 ^[3]
链霉菌	乙酸乙酯	5:6	1:32	40	40	4.5	30.9 ^[6]
链霉菌 LD0501	乙醚	2:1	1:25	NA	28	5.5	57 ^[5]
链霉菌 0606	乙醚	2:1	1:100	NA	28	5.5	58 ^[7]
穗色链霉菌	二氯甲烷	NA	NA	NA	35	5.5	94 ^[8]
色褐链霉菌	氯仿	NA	NA	39	28	7.5	31 ^[9]
<i>Streptomyces</i> sp. YU100	乙醚	1:4	1:400	1.7	25	4	80 ^[10]
<i>Streptomyces</i> sp. SC734	氯仿	NA	1:7	1.5	45	6	100 ^[11]
抗辐射不动杆菌	乙醚	NA	NA	NA	40	6.2	100 ^[12]

注:a 表示有机溶剂与水相的体积比;b 表示磷脂酰胆碱与丝氨酸的质量浓度比。

一些稀有天然磷脂本身具有特殊的饱和和脂肪酸链,如二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)等,具有较高的营养价值和一定的功能特性,以其为底物也可以进行转磷脂酰反应,进而合成特殊营养价值的磷脂酰丝氨酸,可以广泛应用于功能食品行业。Mao 等^[12]以 DHA-PC 为底物进行两相反应合成 DHA-PS,转化率可达 100%。张芹^[6]以南极磷虾磷脂为原料利用 PLD 酶法合成了富含 *n*-3 多不饱和脂肪酸的磷脂酰丝氨酸,利用乙酸乙酯-水双相体系进行了反应优化研究,制得了含量为 30.90% 的 *n*-3 PUFA-PS,其中 EPA 含量 25.38%, DHA 含量 11.08%。

由于磷脂酰丝氨酸作为功能性食品添加剂较多应用于食品和生物医药行业,而利用生物酶法合成通常会涉及到有毒的有机试剂,且有一定的残留量,造成环境污染,都不利于产品的广泛应用和生产,所以普通有机试剂-水相反应体系具有一定的局限性。

1.2 绿色有机溶剂-水双相体系

如今绿色环保的观念已经受到大众消费者和众

多企业的普遍认可,近几年生物质绿色溶剂学科发展迅速,越来越多的学者开发研究出了各种生物质绿色溶剂。例如 2-甲基四氢呋喃、 γ -戊内酯、柠檬烯、乳酸乙酯、脂肪酸甲酯、木质素衍生物等^[13],生物质绿色溶剂在化工和生物行业具有巨大的潜力和应用价值。

2-甲基四氢呋喃是一种新型的工业溶剂,可以作为两相反应的良好溶剂。 γ -戊内酯是一种天然的化学品,具有水果的香味,在化妆品和香精行业具有广泛的应用。Duan 等^[14]研究了以苍白杆菌作为 PLD 的来源,利用 2-甲基四氢呋喃和 γ -戊内酯(体积比 1:2)作为反应的有机体系。优化后的磷脂酰胆碱与丝氨酸浓度比为 1:3,加酶量为 106 U,反应温度为 40℃。此条件下的转化率为 81%,与乙酸乙酯体系相比可以达到同样的转化效果。

柠檬烯是一种单萜类化合物,有一定的柠檬香味,可以从柑橘皮中提取,在香精香料行业有重要的应用。Bi 等^[15]分别将柠檬烯和对异丙基甲苯应用到 PLD 催化的转磷脂酰反应中。在反应温度 40℃、底物浓度比 3:1 下,转化率分别可达到 88% 和 95%,

且反应中几乎没有副产物磷脂酸生成。

离子液体是由阳离子和阴离子组合而成的,在室温下呈液态。Bi等^[16]以胆碱和氨基酸为原料在低温下合成的生物离子液体为有机相。在温度40℃、加酶量60 U、底物浓度比1:3的条件下转化生成86.5%的磷脂酰丝氨酸,并且PLD在重复利用10次后,保留了75%的酶活。

低共熔溶剂是由季铵盐和氢键给体按一定的比例混合,在一定的温度下加热搅拌直至形成均一的无色液体,即可形成低共熔溶剂。因为低共熔溶剂具有制作成本低、对环境无污染、无毒、易于生物降解等优点,在工业生产中有望替代传统有机溶剂而大规模生产。Yang等^[17]利用氯化胆碱和乙二醇(体积比1:2)形成低共熔溶剂,在PLD催化磷脂酰丝氨酸的合成中得到了应用,将0.05 mmol的PC溶解于低共熔溶剂中,0.3 mmol丝氨酸溶于水中,在pH为6的条件下反应7 h,酶反应转化率为90%。

1.3 单一水相体系

均一水相体系反应是将底物卵磷脂利用均质设备均匀分散在水相中,然后加入丝氨酸和酶液在一定条件下反应,反应体系多为均质胶或悬浊液状态^[18]。虽然单一水相反应避免了有机溶剂的使用,但是大量水的存在,造成PLD对磷脂酰胆碱的水解反应比例增加,而使碱基交换反应比例下降,引起磷脂酰丝氨酸的转化率下降,因此相关的研究集中在磷脂酰胆碱与水的比例和丝氨酸的浓度等条件。磷脂酰胆碱的均质化过程需要高压均质机等设备的参与,但是其设备昂贵,成本较高。宋晚平等^[19]利用普通搅拌设备使底物与水混溶,并提高丝氨酸浓度,转化生成的PS含量达79%。

在单一水相反应中,利用硫酸钙或硅胶作为吸附载体吸附底物卵磷脂,也可以达到良好的酶转化效果。Birichevskaya等^[20]以硅胶来吸附大豆卵磷脂后,转化率达到75%。

1.4 脂质体系统

脂质体是一种人工膜,根据磷脂的双亲性在水中时,其亲水性头部深到外部水相中,疏水性尾部聚集伸向内部,避开水相,形成一种双层闭囊膜系统。天然的卵磷脂可以作为脂质体膜系统的材料,同时其又是酶反应的底物,所以利用脂质体在PLD催化条件下合成磷脂酰丝氨酸具有不可比拟的优势。Pinsolle等^[21]首次利用不同来源的卵磷脂和胆固醇与生育酚配制出不同种类的脂质体,在马杜拉链霉菌来源的PLD催化条件下,在水相中进行了PS的合成研究。结果表明构成脂质体的材料组成对PLD

的酶活有重要影响,与纯大豆卵磷脂相比,哺乳动物来源的、富含不饱和脂肪酸的磷脂作为脂质体原料时,具有更高的PS转化率;脂质体空间中的胆固醇和生育酚的存在改变了脂质体的动态结构,有助于其与蛋白质进行接触;反应中钙离子的添加和较高的丝氨酸浓度也有利于提高转化率。尽管其利用脂质体进行酶转化PS含量可以达70%以上,但是也阐明了只有一部分的脂质体能够与PLD进行装配接触,转化率有待提高。

1.5 亚临界流体反应

于刚等^[22]研究了在亚临界1,1,1,2-四氟乙烷体系中的磷脂酰丝氨酸合成反应,通过响应面优化分析,在温度40℃、体系压力6 MPa的亚临界体系、加酶量9.6 U、底物鲑鱼卵磷脂与丝氨酸浓度比1:13条件下,转化率为89%。利用亚临界体系反应可以实现溶剂的回收、产物底物分离以及酶的回收利用,但是亚临界流体设备复杂,成本较高,并且底物卵磷脂在亚临界体系中的溶解度有限,所以其有很大的局限性。

1.6 固定化酶反应体系

严明等^[23]发明了一种固定化PLD催化制备PS的方法。首先以甲壳素为载体,用戊二醛将PLD交联在载体上,固定化酶在醋酸丁酯为有机相,乙酸钠缓冲液为水相的反应体系中,转化率达78%。Liu等^[24]利用基因工程和分子技术手段将PLD成功展示在酵母表面,在进行酶转化实验中,可以将67.5%的磷脂酰胆碱转化为PS。表面展示系统无需像发酵需要对酶进行分离纯化,减少了大量工作,具有一定的优势。

无论是用物理化学手段和分子生物技术进行酶的固定化,在酶转化中,PLD都保持了大部分的酶活,有利于提高转化率,也方便PLD回收使用,但是无法避免该反应也会接触到有机溶剂,产生一定的毒性。综上所述,PS的酶法合成具有反应高效、条件简单、环境友好等特点,但不可回避也有部分问题亟待解决,对此提出以下研究建议:①由于PLD是该反应的重要工具,需要筛选出一种能够产高转磷脂活性酶的微生物,以及将PLD在工程菌中的高效表达,降低PLD的生产成本。②酶反应过程中有机溶剂的处理,需要一种新型的绿色环保的溶剂替代传统的有机溶剂,相关的研究开发已经较多,但是某些新型溶剂的毒理学评价还有待验证。③利用现代分子生物学和蛋白质技术手段,揭示酶的构效关系,提高PLD的转化效率,以便生产高效的PLD。④广泛结合其他学科,创造出新型的酶反应体系。

2 磷脂酰丝氨酸的分离纯化

2.1 薄板层析法

薄板层析(TLC)法是利用吸附剂和展开剂分别对不同磷脂组分具有不同的吸附作用和溶解作用而进行分离的。Rouser等^[25]以硅胶H为吸附剂,利用双向薄板层析氯仿-甲醇-水(65:25:4)和丁醇-醋酸-水(3:1:1),分离了磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)和PS,达到了较好的分离效果。Xu等^[26]以硅胶G为吸附剂,对十多种磷脂进行了分离,使用的展开剂为氯仿-甲醇-醋酸-丙酮-水。

贺杠^[27]研究了不同的展开剂对PS的分离效果。结果表明,氯仿-甲醇-水-乙酸体系和正己烷-异丙醇-乙酸体系都能将PS从其他组分中分离,体系中加入适当的酸可以提高分离度。TLC法简单快速,已经是很多科研工作者的研究方法。

2.2 柱色谱法

柱色谱法实现PS的分离关键在于流动相的选择,目前使用较多的是氯仿-甲醇体系和正己烷-异丙醇体系,其中体系中各组分比例对洗脱有很重要的影响。Pietsch等^[28]利用氨基键和硅胶色谱柱,以多种不同的洗脱液实现了PC、PE、PS、PI的分离。柱色谱法分离纯化PS操作简单、设备简单、处理量大,可以进行大规模的应用。韩山山等^[29]研究了树脂柱色谱纯化磷脂的可行性,确定了最佳树脂为大孔阳离子交换树脂,并对纯化工艺进行了优化。

2.3 高效液相色谱法

高效液相色谱法(HPLC)分离PS是在柱色谱的基础上建立起来的,具有高压、高效、高灵敏度的特点。使用较多的检测器有紫外检测器(UVD)、蒸发光散射检测器(ELSD)、示差折光检测器(RID)、火焰离子化检测器(FID)等,洗脱方法有等度洗脱和梯度洗脱。等度洗脱适合简单组分的分离,梯度洗脱可以对多种复杂的磷脂组分进行分离。

HPLC分离纯化PS的方法主要有正向色谱法和反向色谱法。正向色谱分离法使用最多的流动相为正己烷-异丙醇-水体系,正向分离是依据磷脂的极性部分与固定相之间的极性作用而实现分离的。正向色谱中流动相的弱紫外吸收适合与紫外检测器联合使用,研究表明流动相中添加适量的缓冲液有利于基线稳定和抑制拖尾。反向色谱是根据磷脂中二酰基与固定相之间的非极性作用,利用极性溶剂对磷脂洗脱而实现分离,流动相多使用甲醇-乙腈-水系列。卢学清等^[30]采用C18柱,反向色谱等度洗脱,使用紫外检测器分离了熊胆中的PC、

PA、PG和心磷脂(CL)。由于梯度洗脱可以改变流动相极性而对不同磷脂进行分离,较多配合蒸发光散射检测器使用。苏永恒等^[31]采用Diol色谱柱,分别使用正己烷-异丙醇-冰乙酸和异丙醇-水-冰乙酸为流动相A和B,梯度洗脱,实现了快速从奶粉中检测PS。

制备液相色谱技术的快速发展,为磷脂的工业纯化提供了方法,包括制备性高效液相色谱、超临界液相色谱和高速逆流色谱等制备色谱^[32]。曹栋等^[33]研究了超临界流体CO₂/乙醇分离磷脂酰胆碱的研究,最佳工艺条件为温度40℃、压力25MPa、乙醇体积分数15%,PC含量达89%。超临界流体技术可以应用在PS的纯化制备中。

3 展望

随着我国人口老龄化程度的加剧,老年人对相关保健食品的需求会越来越多,磷脂酰丝氨酸作为一种新型食品资源,在改善老年人记忆力、保护神经方面具有重要作用,高纯度的PS在保健食品领域有不可忽视的市场前景。本文分别从酶法制备PS的不同反应体系,以及PS的分离检测进行了综述,其中酶法制备PS具有一定的优势,但是相关的新型绿色溶剂的替代和粗产品的纯化还有待研究。建议磷脂酰丝氨酸的生产制备可以使用两步法策略:①首先以卵磷脂为原料使用磷脂酶D催化反应制得PS粗品;②将粗品通过硅胶柱层析分离制得纯品。

参考文献:

- [1] MOZZI R, BURATTA S, GORACCI G. Metabolism and functions of phosphatidylserine in mammalian brain [J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(2):195-214.
- [2] HOSOKAWA M, SHIMATANI T, KANADA T, et al. Conversion to docosahexaenoic acid-containing phosphatidylserine from squid skin lecithin by phospholipase D-mediated transphosphatidylation [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(10):4550-4554.
- [3] 张忆雪. 酶法制磷脂酰丝氨酸[D]. 北京:北京化工大学, 2013.
- [4] 韩海霞. 磷脂酶D的制备及其在磷脂酰丝氨酸合成中的应用[D]. 江苏无锡:江南大学, 2014.
- [5] 杨学利. 高产磷脂酶D菌株的筛选、鉴定及活性研究[D]. 成都:四川师范大学, 2016.
- [6] 张芹. 酶法合成富含n-3 PUFA的磷脂酰丝氨酸的研究[D]. 山东青岛:中国海洋大学, 2015.
- [7] 朱南南. 磷脂酶D催化磷脂酰基转移合成磷脂酰丝氨酸反应的研究[D]. 西安:西北大学, 2015.
- [8] 钱娟, 庞洋, 王昕. 磷脂酶D的制备及催化磷脂酰胆碱合成磷脂酰丝氨酸[J]. *中国油脂*, 2017, 42(9):66-71.

- [9] 路福平, 张业尼, 李玉. 双液相体系中磷脂酶 D 转酯合成磷脂酰丝氨酸的研究[C]. 济南: 全国发酵行业高峰论坛暨中国发酵工业协会 2007 年行业大会, 2007.
- [10] LIM S K, CHOI J W, CHUNG M H, et al. Production and characterization of extracellular phospholipase D from *Streptomyces* sp. YU100 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2002, 12(2):189-195.
- [11] CHOOJIT S, BORNSCHEUER U T, UPAICHT A, et al. Efficient phosphatidylserine synthesis by a phospholipase D from *Streptomyces* sp. SC734 isolated from soil - contaminated palm oil [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2016, 118(5):803-813.
- [12] MAO X, LIU Q, QIU Y, et al. Identification of a novel phospholipase D with high transphosphatidylase activity and its application in synthesis of phosphatidylserine and DHA - phosphatidylserine [J]. *J Biotechnol*, 2017, 249: 51-58.
- [13] 周炳华. 葡萄糖酸水溶液作为一种绿色可持续介质促进有机反应的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [14] DUAN Z Q, HU F. Efficient synthesis of phosphatidylserine in 2 - methyltetrahydrofuran [J]. *J Biotechnol*, 2013, 163(1):45-49.
- [15] BI Y H, DUAN Z Q, DU W Y, et al. Improved synthesis of phosphatidylserine using bio - based solvents, limonene and *p* - cymene [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(1): 115-119.
- [16] BI Y H, DUAN Z Q, LI X Q, et al. Introducing bio - based ionic liquids as the non - aqueous media for enzymatic synthesis of phosphatidylserine [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(5):1558-1561.
- [17] YANG S L, DUAN Z Q. Insight into enzymatic synthesis of phosphatidylserine in deep eutectic solvents [J]. *Catal Commun*, 2016, 82:16-19.
- [18] 胡飞, 段章群, 王淮, 等. 生物酶法制备磷脂酰丝氨酸的研究进展 [J]. *中国油脂*, 2012, 37(6):54-58.
- [19] 宋晚平, 任静, 王磊, 等. 一种粉末磷脂酰丝氨酸的制备方法: CN101230365 [P]. 2008-07-30.
- [20] BIRICHEVSKAYA L L, KISEL M A. Use of phospholipase D from *Streptomyces netropsis* for the biocatalytic synthesis of phosphatidylserine [J]. *Vestsi Natsyianalnaj Akadehmii Navuk Belarusi Seryya Biyalagichnykh Navuk*, 2008(4): 86-90.
- [21] PINSOLLE A, ROY P, CANSELL M. Modulation of enzymatic PS synthesis by liposome membrane composition [J]. *Colloids Surfaces B Biointerf*, 2014, 115(3): 157-163.
- [22] 于刚, 徐伟, 栾东磊, 等. 亚临界 R134a 流体中酶法制备富含多不饱和脂肪酸的磷脂酰丝氨酸 [J]. *高技术通讯*, 2008, 18(10):1075-1080.
- [23] 严明, 高璐, 魏森, 等. 一种固定化磷脂酶 D 催化制备磷脂酰丝氨酸的方法: CN103966277A [P]. 2014-08-06.
- [24] LIU Y, ZHANG T, QIAO J, et al. High - yield phosphatidylserine production via yeast surface display of phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* on *Pichia pastoris* [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(23):5354-5360.
- [25] ROUSER G, SIMON G, KRITCHEVSKY G. Species variations in phospholipid class distribution of organs: I. Kidney, liver and spleen [J]. *Lipids*, 1969, 4(6):599.
- [26] XU G, WAKI H, KON K, et al. Thin - layer chromatography of phospholipids and their lyso forms: application to determination of extracts from rat hippocampal CA1 region [J]. *Microchem J*, 1996, 53(1):29-33.
- [27] 贺杠. 磷脂酶 D 催化合成磷脂酰丝氨酸的色谱分离研究 [D]. 西安: 西北大学, 2011.
- [28] PIETSCH A, LORENZ R L. Rapid separation of the major phospholipid classes on a single aminopropyl cartridge [J]. *Lipids*, 1993, 28(10):945-947.
- [29] 韩山山, 张康逸, 黄健花, 等. 树脂柱色谱纯化甘油磷脂酰胆碱 [J]. *中国油脂*, 2012, 37(3):47-51.
- [30] 卢学清, 王智华, 洪筱坤. 等度反相高效液相色谱法测定熊胆中磷脂类化合物 [J]. *色谱*, 2000, 18(1): 57-60.
- [31] 苏永恒, 张伟, 马青青. 高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法测定保健食品中的磷脂酰丝氨酸 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2017(6):792-794.
- [32] 柳仁民, 王海兵, 周建民. 制备色谱技术及装备研究进展 [J]. *现代制造*, 2011(2):10-15.
- [33] 曹栋, 裘爱泳, 王兴国. 超临界流体分离大豆磷脂酰胆碱 [J]. *中国油脂*, 2002, 27(3):72-73.