

气相色谱外标法测定蛋黄卵磷脂(供注射用)中 7种脂肪酸含量

温恺嘉, 梁北梅, 李咏华, 林元亨, 唐顺之, 许文东

(广州白云山汉方现代药业有限公司 中药提取分离过程现代化国家工程研究中心,
广东省药用脂质重点实验室, 广州 510240)

摘要:建立了适用于蛋黄卵磷脂(供注射用)中棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、二十二碳六烯酸含量测定的分析方法。样品在具塞试管直接水浴加热甲酯化,正庚烷常温振荡提取后进气相色谱仪在起始柱温210℃下进行分析,利用外标法计算7种脂肪酸的含量。方法的专属性、精密度、准确度、耐用性考察均符合规定,在一定的质量浓度范围内,7种脂肪酸甲酯质量浓度与峰面积具有良好的线性关系,相关系数均大于0.999。该方法适用于蛋黄卵磷脂(供注射用)中7种脂肪酸含量的测定。

关键词:蛋黄卵磷脂(供注射用);脂肪酸;气相色谱法;外标法

中图分类号:O657.7;TS207.3 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)01-0143-05

Determination of 7 kinds of fatty acids in egg yolk lecithin (for injection) by GC with external standard method

WEN Kaijia, LIANG Beimei, LI Yonghua, LIN Yuanheng,
TANG Shunzhi, XU Wendong

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Lipids, National Engineering Research Center for Modernization of Extraction and Separation Process of TCM, Guangzhou Hanfang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510240, China)

Abstract: The method for the determination of palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, arachidonic acid and docosahexaenoic acid in egg yolk lecithin (for injection) was established. The samples were methylated by direct water bath heating in stoppered tubes, extracted by shaking with *n*-heptane at room temperature and analyzed by gas chromatography with initial column temperature 210℃, then the contents of 7 kinds of fatty acids were calculated by external standard method. The specificity, precision, accuracy and durability of the method were in line with the requirements, and in a range of mass concentrations, there was a linear relationship between the mass concentration of 7 kinds of fatty acid methyl esters and peak areas with all correlation coefficients greater than 0.999. So the method was suitable for the determination of 7 kinds of fatty acids in egg yolk lecithin (for injection).

Key words: egg yolk lecithin (for injection); fatty acid; gas chromatography; external standard method

蛋黄卵磷脂是从蛋黄中提取并精制得到的天

然磷脂混合物,主要成分为磷脂酰胆碱^[1-3],具有较好的乳化、分散、消泡等特性,被广泛用于脂肪乳、脂质体等特殊注射剂种^[4-6]。当作为各类肠外营养剂、载药脂肪乳辅料或产品中的蛋黄卵磷脂用量达10%或以上时,需考察蛋黄卵磷脂脂肪酸含量。

收稿日期:2020-12-10;修回日期:2021-08-24

基金项目:广州市科技计划项目产学研协同创新专项项目(201802030002)

作者简介:温恺嘉(1989),女,工程师,主要从事药物与食品分析工作(E-mail)282619795@qq.com。

目前,国内暂无权威资料收录蛋黄卵磷脂脂肪酸测定方法,而脂质类脂肪酸测定方法在《中国药典》四部与 GB 5009.168—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》均有收录。但国标方法前处理复杂,气相运行时间需 90 min,测定效率低。《中国药典》四部涉及脂质脂肪酸测定方法在大豆油、橄榄油、山嵛酸甘油酯、月桂酰聚氧乙烯甘油酯、油酸山梨坦、氢化大豆油、氢化蓖麻油等品种中均有收录,其中大豆油脂脂肪酸测定方法与橄榄油、山嵛酸甘油酯、氢化蓖麻油脂肪酸测定方法完全一致,说明该法适用范围广,因此本文选择中国药典四部《大豆油》脂肪酸项(下称“大豆油中典方法”)为参考,通过适度优化,建立一种适用于蛋黄卵磷脂(供注射用)脂肪酸含量测定方法,该方法经过方法学验证,可应用到企业内控及小试研究中,为日后的分析工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蛋黄卵磷脂(供注射用)样品(批号 I30181201、I30181202、I30181203),广州白云山汉方现代药业有限公司。

棕榈酸甲酯(BCBV7285,99.0%)、硬脂酸甲酯(GCBV9730,99.5%)、油酸甲酯(BCBR9854V,99.0%)、亚油酸甲酯(BCBV3078,98.5%)、花生四烯酸甲酯(SLBV7453,100.0%)标准品,Sigma 公司;棕榈油酸甲酯(92720046,99.0%)、二十二碳六烯酸甲酯(Z9920150,99.0%)标准品,ANPEL 公司;正庚烷、甲醇、氢氧化钠、氯化钠、无水硫酸钠,均为分析纯,广州化学试剂厂;14% 三氟化硼甲醇溶液,分析纯,美国 Sigma 公司。

安捷伦 7890A 气相色谱仪(搭配 FID 检测器),赛默飞变色龙色谱工作站,岛津 AP225WD 电子天平,明澈-D 24UV 纯水/超纯水系统,SGH-500 型恒温水浴锅,HWS-26 氢气发生器,高纯氮气(纯度 $\geq 99.999\%$),干燥空气。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

Agilent DB-WAX 毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m);载气为高纯氮气(纯度 $\geq 99.999\%$),恒流流速 1.0 mL/min;柱升温程序为初始温度 210 $^{\circ}$ C,保持 10 min,以 8 $^{\circ}$ C/min 速率升至 250 $^{\circ}$ C,保持 35 min,共运行 50 min;进样口温度 260 $^{\circ}$ C;检测器温度 270 $^{\circ}$ C;进样量 1 μ L;分流进样,分流比 50:1;空气流速 300 mL/min;氢气流速 30 mL/min。

1.2.2 标准曲线的制作

1.2.2.1 单一标准品储备液的配制

分别精密称取棕榈酸甲酯标准品 200 mg、棕榈油酸甲酯标准品 10 mg、硬脂酸甲酯标准品 100 mg、油酸甲酯标准品 200 mg、亚油酸甲酯标准品 100 mg、花生四烯酸甲酯标准品 100 mg、二十二碳六烯酸甲酯标准品 10 mg,以正庚烷溶解并定容至 10 mL,得 7 种单一标准品储备液。

1.2.2.2 系列混合标准工作液的配制

取 1.2.2.1 单一标准品储备液,按表 1 以正庚烷依次稀释成 6 个级别含 7 种标准品的系列混合标准工作液。

表 1 6 个级别系列混合标准工作液质量浓度

组分	不同级别质量浓度/(mg/mL)					
	1	2	3	4	5	6
棕榈酸甲酯	1.0	2.0	4.0	10.0	16.0	20.0
棕榈油酸甲酯	0.05	0.1	0.2	0.5	0.8	1.0
硬脂酸甲酯	0.5	1.0	2.0	5.0	8.0	10.0
油酸甲酯	1.0	2.0	4.0	10.0	16.0	20.0
亚油酸甲酯	0.5	1.0	2.0	5.0	8.0	10.0
花生四烯酸甲酯	0.25	0.5	1.0	2.5	4.0	5.0
二十二碳六烯酸甲酯	0.05	0.1	0.2	0.5	0.8	1.0

1.2.2.3 标准曲线的绘制

取一定量表 1 中的系列混合标准工作液,按照 1.2.1 的色谱条件进行气相色谱分析,每个级别混合标准工作液连续进样 3 次,以各组分质量浓度(x)为横坐标,各组分峰面积均值(y)为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.3 样品的前处理

称取蛋黄卵磷脂(供注射用)样品 0.1 g,置于 20 mL 具塞试管中,加 0.5 mol/L 氢氧化钠甲醇溶液 2 mL,在 65 $^{\circ}$ C 水浴中加热 30 min,加入 14% 三氟化硼甲醇溶液 2 mL,在 65 $^{\circ}$ C 水浴中加热 30 min,取出放冷,精密加入正庚烷 4.0 mL,密塞振摇 2 min 后,将液体转移至分液漏斗中,加饱和氯化钠溶液 10 mL,摇匀,静置使分层,取上层液,纯水洗涤 3 次,每次 2 mL,经无水硫酸钠干燥后作为样品溶液,待测。

1.2.4 脂肪酸含量的测定

取空白溶剂(正庚烷)、系列混合标准工作液、样品溶液,按 1.2.1 色谱条件一次进样,记录色谱图,根据保留时间定性,由标准曲线求得试样中 7 种脂肪酸的质量浓度,外标法定量,7 种脂肪酸含量按下式计算。

$$X = \frac{\rho \times V \times f}{m \times 1\,000} \times 100\% \quad (1)$$

式中: X 为样品中各脂肪酸的含量; ρ 为样品溶液中各脂肪酸甲酯的质量浓度,mg/mL; V 为样品溶液加入正庚烷的体积,mL; m 为样品质量,g; f 为系数,7种脂肪酸对应的系数值参照GB 5009.168—2016。

2 结果与分析

2.1 样品定量方法的选择

依据GB 5009.168—2016,脂肪酸含量测定的定量方法有3种,分别为峰面积归一化法、外标法、内标法。峰面积归一化法多用于高纯度的植物油类(如大豆油、橄榄油等)定量,适用于相对定量^[7-9];其他成分较复杂的物质,样品中含有一定量的未甲

酯化成分,应进行绝对定量,外标法、内标法精准^[10-11],更适合采用。取批号I30181201的样品,按1.2.3方法制备样品溶液,分别按3种定量方法在1.2.1色谱条件下测定(内标物选择山嵛酸甲酯)脂肪酸含量,结果见表2。由表2可看出,3种定量方法所得测定值各不相同。考虑到需体现样品中其他杂质的含量,需进行绝对定量,因此选择外标法与内标法定量更合适,按上述条件对外标法和内标法的脂肪酸回收率进行测定,对比两种定量方法的准确度,结果见表3。由表3可看出,外标法的回收率更合理,因此选择外标法作为定量方法。

表2 3种定量方法得到的脂肪酸含量对比

定量方法	棕榈酸	棕榈油酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	花生四烯酸	二十二碳六烯酸
峰面积归一化法	30.8	1.4	14.1	25.6	15.8	5.8	1.7
外标法	20.8	0.92	9.4	17.1	11.0	3.6	1.2
内标法	17.9	0.79	8.1	14.7	9.4	3.1	1.0

表3 2种定量方法的回收率对比

定量方法	棕榈酸	棕榈油酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	花生四烯酸	二十二碳六烯酸
外标法	101.1	102.2	99.4	99.2	104.4	98.5	100.0
内标法	91.3	91.7	89.7	89.7	94.4	92.3	91.2

2.2 前处理方法考察

2.2.1 甲酯化加热方式考察

根据大豆油中典方法,甲酯化加热采用锥形瓶及回流管进行,容器内表面积较大。实验发现,样品甲酯化样液只有8 mL,容器内表面积大易造成目标成分附着瓶壁,不利于样液转移。因此,本实验采取具塞试管直接水浴加热法,减少样液接触的容器内表面积从而减少误差引入。

2.2.2 提取方式考察

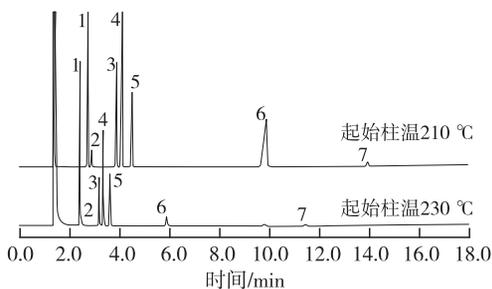
根据大豆油中典方法,甲酯化完成后,精密加入提取溶剂在65℃加热提取一定时间,取出冷却至室温后再振荡提取一定时间。本方法去除加热步骤,在加入正庚烷后室温振摇提取,通过对两种提取方式分别进行准确度验证发现,二者回收率相当。因此,本实验选择加入正庚烷室温下振摇提取,既简化实验过程,又节省了时间。

2.3 起始柱温考察

取1.2.2.2中的第3级别混合标准工作液分别在起始温度为210℃与230℃,其他条件不变的情况下进样,记录色谱图,不同起始柱温色谱图对比结果见图1。

由图1可知,色谱条件的起始柱温采用210℃,

该温度能使各组分峰达到基线分离。若以大豆油中典方法的230℃为起始柱温,则无法完全实现基线分离。



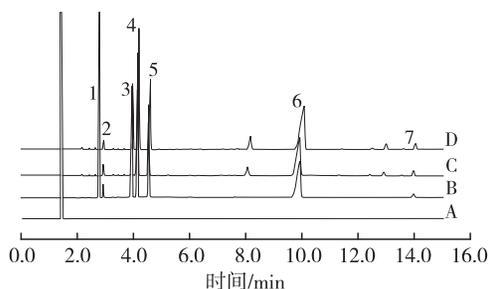
注:1.棕榈酸甲酯;2.棕榈油酸甲酯;3.硬脂酸甲酯;4.油酸甲酯;5.亚油酸甲酯;6.花生四烯酸甲酯;7.二十二碳六烯酸甲酯。下同

图1 不同起始柱温色谱图对比

2.4 样品专属性考察

按照1.2.3的方法,分别取纯水0.1 g以及批号I30181201的样品与1.2.2.2中的第3级别混合标准工作液,制备空白溶液、样品溶液、对照溶液,并将样品溶液与混合标准工作液按1:1混合,制备样品加标溶液。精密吸取上述溶液1 μL,按照1.2.1色谱条件进样检测,进行样品专属性考察,结果如图2所示。

由图2可看出,本方法的样品的专属性符合规定。



注:A.空白溶液;B.对照溶液;C.样品溶液;D.样品加标溶液。

图2 样品专属性实验色谱图

2.5 线性关系考察

按照1.2.2方法绘制标准曲线,得到7种脂肪酸甲酯的标准曲线方程、相关系数(R^2)及线性范围,结果见表4。由表4可看出,在相应质量浓度范

围内,7种脂肪酸甲酯质量浓度与对应的峰面积的线性关系良好,相关系数(R^2)大于0.999。

表4 线性关系考察结果

组分	标准曲线	R^2	线性范围/(mg/mL)
棕榈酸甲酯	$y = 379.67x - 68.38$	0.999 6	1.0 ~ 20.0
棕榈油酸甲酯	$y = 373.59x - 4.09$	0.999 7	0.05 ~ 1.0
硬脂酸甲酯	$y = 387.65x - 34.39$	0.999 6	0.5 ~ 10.0
油酸甲酯	$y = 391.95x - 67.17$	0.999 6	1.0 ~ 20.0
亚油酸甲酯	$y = 373.62x - 32.22$	0.999 6	0.5 ~ 10.0
花生四烯酸甲酯	$y = 344.36x + 0.41$	0.998 6	0.25 ~ 5.0
二十二碳六烯酸甲酯	$y = 351.81x - 2.56$	0.999 8	0.05 ~ 1.0

2.6 精密度实验

取批号I30181201的样品,按1.2.3方法处理,按1.2.1色谱条件进行分析,进行重复性与中间精密度实验,其均值与相对标准偏差(RSD)见表5。由表5可知,本方法精密度良好。

表5 精密度实验结果($n=6$)

实验	项目	棕榈酸	棕榈油酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	花生四烯酸	二十二碳六烯酸
重复性	含量/%	20.8	0.92	9.4	17.1	11.0	3.6	1.2
	RSD/%	1.2	1.1	0.5	0.2	0.4	1.3	0.5
中间精密度	含量/%	21.6	0.93	9.9	17.6	11.3	3.5	1.2
	RSD/%	0.4	0.8	1.1	0.5	1.2	1.0	0.8

2.7 准确度验证

取批号I30181201的样品,按照本文建立的方法对7种脂肪酸进行加标回收率实验,回收率均值见表3,7种脂肪酸回收率RSD依次为棕榈酸1.9%、棕榈油酸1.8%、硬脂酸0.6%、油酸1.2%、亚油酸0.6%、花生四烯酸0.7%、二十二碳六烯酸1.1%,符合准确度要求。

2.8 溶液稳定性实验

取批号I30181201的样品,按1.2.3方法制备样品溶液1份,分别在0、2、4、6、8、12、18、24、36 h内,将溶液在1.2.1色谱条件下反复进样,7种脂肪酸峰面积RSD均小于3%,说明溶液稳定性在36 h内保持良好。

2.9 系统耐用性考察

通过改变不同的氮气流速、不同的进样口/检测器温度、同一型号不同批号的色谱柱共4个单因素

条件,分别进行7种脂肪酸含量测定,比较4个因素及原始条件下7种脂肪酸含量的测定结果。结果发现,4个单因素条件下得到的7种脂肪酸含量的RSD均小于3%,表明条件微小变动对各组分含量测定结果影响不大。

2.10 样品测定

取蛋黄卵磷脂(供注射用)样品3批,按1.2.3方法进行处理,在1.2.1色谱条件下测定其中的7种脂肪酸含量,每批样品平行制备3份样品,结果见表6。由表6可知,蛋黄卵磷脂(供注射用)中棕榈酸、油酸、亚油酸、硬脂酸含量较高。计算每批次7种脂肪酸的RSD,结果发现,每批次7种脂肪酸的RSD均小于等于2%,数据符合精密度要求,表明该方法可用于蛋黄卵磷脂(供注射用)7种脂肪酸含量的测定。

表6 3批蛋黄卵磷脂(供注射用)脂肪酸含量测定结果($n=3$)

批号	棕榈酸	棕榈油酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	花生四烯酸	二十二碳六烯酸
I30181201	20.8	0.9	9.4	17.1	11.0	3.6	1.2
I30181202	21.2	1.0	9.5	17.3	11.3	3.5	1.2
I30181203	21.4	0.9	9.8	17.2	10.9	3.5	1.2

(下转第152页)

- 26(8): 29–32.
- [6] SHAHIDI F, DE CAMARGO A C. Tocopherols and tocotrienols in common and emerging dietary sources; occurrence, applications, and health benefits[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): 1745–1773.
- [7] SEPPANEN C M, SONG Q, CSALLANY A S. The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2010, 87(5): 469–481.
- [8] 刘云, 丁霄霖, 胡长鹰. 分光光度法测定天然维生素 E 总含量[J]. *粮油食品科技*, 2005, 13(4): 47–49.
- [9] MARCO M, SIMON H, WALTER V. Countercurrent chromatographic isolation and purification of 11'- α -tocotrienol from the vitamin E extract of palm oil[J]. *Food Chem*, 2018, 256: 327–332.
- [10] 李书国, 陈辉, 李雪梅, 等. 电化学分析法测定植物油中的 V_E [J]. *食品科学*, 2008, 29(3): 369–373.
- [11] 严婉盈, 洗燕萍, 林晓佳, 等. 固相萃取-气相色谱/质谱法同时测定植物油中胆固醇和维生素 E[J]. *中国酿造*, 2017, 36(8): 168–172.
- [12] 张艳海, 张大伟, 曹莹, 等. 在线二维反相色谱法快速测定 V_{AD} 制剂中 V_A 、 V_D 的含量[J]. *分析测试学报*, 2016, 35(1): 28–34.
- [13] 赵孔祥, 姜婷婷, 何佳, 等. 同位素稀释/液相色谱-串联质谱测定婴幼儿配方乳粉中脂溶性维生素[J]. *分析测试学报*, 2015, 34(12): 1372–1376.
- [14] 姜波, 胡文忠, 刘长建, 等. HPLC 法同时测定植物油中维生素 A 和不同构型维生素 E 含量[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(3): 320–323.
- [15] 乔坤云. HPLC 分析测定葡萄籽油中的维生素 A 和维生素 E[J]. *仪器仪表与分析监测*, 2002(3): 22–23.
- [16] 王晖, 刘红河, 尹江伟. HPLC 用于食品中维生素 A 和维生素 E 的测定[J]. *中国热带医学*, 2006(5): 856–857.
- [17] 陈春晓, 刘红河, 康莉, 等. 强化食品中维生素 A 和维生素 E 的反相高效液相色谱同时测定法[J]. *职业与健康*, 2005(8): 1130–1132.
- [18] 刘莹, 刘丽兰, 王艳超, 等. 固相萃取-在线二维快速同时测定食品中维生素 A、D 和 4 种维生素 E 异构体的含量[J]. *中国标准化*, 2019(18): 175–177.
- [19] 郑熠斌, 黄百芬, 任一平, 等. 正相高效液相色谱法测定食物中 8 种 V_E 异构体及 V_A [J]. *色谱*, 2016, 34(7): 692–696.
- [20] 王波, 周围, 刘小花, 等. 基于超高效合相色谱对黄芪中 5 种主要黄酮类化合物的快速检测[J]. *分析化学*, 2016, 44(5): 731–739.
- [21] 李武林, 李雪敏, 李根容, 等. 超高效合相色谱快速检测塑料制品中的 15 种邻苯二甲酸酯[J]. *色谱*, 2016, 34(8): 795–800.
- [22] GOURMEL C, PERRENOUD A G G, WALLER L, et al. Evaluation and comparison of various separation techniques for the analysis of closely-related compounds of pharmaceutical interest[J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1282(4): 172–177.
- [23] 李雪敏, 余文琴, 张焱, 等. Waters ACQUITY UPC² 的应用进展和方法建立[J]. *广东化工*, 2020, 47(6): 103–105.
- [24] 吴轲, 孙涵潇, 祝捷, 等. 常见食用植物油中维生素 E 异构体含量调查研究[J]. *中国油脂*, 2019, 44(10): 95–99.

(上接第 146 页)

3 结论

本研究以大豆油中典方法为参考依据, 分别对定量方法、前处理方法、色谱条件进行优化与考察, 以优化的条件进行线性、精密度、准确度、稳定性、耐用性的考察, 证实该方法适用于蛋黄卵磷脂(供注射用)中 7 种脂肪酸含量的测定。笔者也将本方法进行了拓展, 将其应用于蛋黄卵磷脂粗品、脱油蛋黄粉等样品的脂肪酸含量测定中, 均能达到较好的精密度与准确度, 为日后工艺研究及产品脂肪酸来源考察, 提供了可靠的分析与控制手段。

参考文献:

- [1] 朱帅, 黄梦玲, 吴倩倩, 等. 蛋黄卵磷脂的结构、提取、功能与脂质体研究进展[J]. *粮油食品科技*, 2020, 28(3): 18–25.
- [2] 刘颖, 肖静静, 李硕绵, 等. 蛋黄卵磷脂提取方法的研究[J]. *河北农业大学学报*, 2013, 36(6): 105–108.
- [3] 侯相林, 杜俊民, 齐永琴, 等. 高纯度蛋黄卵磷脂的分析研究[J]. *中国油脂*, 2004, 29(12): 54–55.
- [4] 孙静, 张巍, 张梦珂, 等. 鸭蛋黄中卵磷脂的提取工艺优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(21): 7311–7315.
- [5] 周勤兰, 葛红莉, 徐远清. 蛋黄卵磷脂细菌内毒素检查法研究[J]. *化工时刊*, 2019, 33(9): 11–14.
- [6] 孔凡华, 王轩, 于连洋, 等. 高效液相色谱-蒸发光检测器法测定鸡蛋中卵磷脂的含量[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(13): 299–303.
- [7] 杨水艳, 邵志凌, 聂绪恒. 10 种云南植物油脂肪酸组成比较分析与评价[J]. *中国油脂*, 2018, 43(1): 144–146.
- [8] 张丽, 杨志, 邹维, 等. 美藤果油和普洱茶籽油的主要脂肪酸组成及氧化动力学研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(7): 19–25.
- [9] 应美蓉, 杜文凯, 章程, 等. 气相色谱法测定脂肪酸含量判定山茶油纯度[J]. *中国油脂*, 2020, 45(1): 132–136.
- [10] 耿薇, 魏永生, 刘静. GC-MS 外标法分析核桃仁中的脂肪酸含量[J]. *化学工程师*, 2015, 29(6): 26–27, 25.
- [11] 汪胜福, 刘建君, 门敬菊, 等. 气相色谱外标法测定南极磷虾油中的 EPA 和 DHA 含量[J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(13): 96–99.