

## 分光光度法测定鱿鱼生殖腺提取物中总磷脂

袁延强, 侯海荣, 王希敏, 何秋霞, 韩利文, 刘可春

山东省科学院 生物研究所, 山东 济南 250014

**摘要:** 目的 建立鱿鱼生殖腺提取物中总磷脂的测定方法。方法 采用乙醇提取、正己烷萃取法得到鱿鱼生殖腺提取物, 浓硫酸-高氯酸法消化样品, 抗坏血酸-钼蓝法测定无机磷的量, 再乘以系数 26.31 折算成鱿鱼生殖腺提取物中总磷脂的量。结果 磷在 0.2~1.0  $\mu\text{g/mL}$  线性关系良好 ( $r=0.999\ 9$ ), 平均回收率为 95.06%, RSD 为 1.09%。结论 该方法方便、快速、准确度较高, 可用于鱿鱼生殖腺提取物中总磷脂的测定。

**关键词:** 鱿鱼生殖腺; 总磷脂; 浓硫酸-高氯酸消化法; 抗坏血酸-钼蓝法; 分光光度法

中图分类号: R927.11 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)01-0063-03

## Determination of total phospholipids in *Ommastrephes bartrami* gonad extracts by spectrophotometry

YUAN Yan-qiang, HOU Hai-rong, WANG Xi-min, HE Qiu-xia, HAN Li-wen, LIU Ke-chun

Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

**Abstract: Objective** To establish a method for determining the content of total phospholipids in *Ommastrephes bartrami* gonad extracts. **Methods** Samples were extracted by ethanol and n-hexane, and the extracts were nitrified by oil of vitriol-perchloric acid method. The content of inorganic phosphorus was tested by ascorbic acid-molybdenum blue photometric method. The contents of total phospholipids were obtained by multiplying a coefficient 26.31. **Results** There was a good linear relationship of phosphonium in the range of 0.2—1.0  $\mu\text{g/mL}$  ( $r=0.999\ 9$ ). The average recovery was 95.06%, and RSD was 1.09%. **Conclusion** It shows that the improved method is convenient, rapid, and precise, and can be used as total phospholipids determination of *O. bartrami* gonad extracts.

**Key words:** *Ommastrephes bartrami* gonad extracts; total phospholipids; oil of vitriol-perchloric acid method; ascorbic acid-molybdenum blue photometric method; spectrophotometry

近几年我国鱿鱼年产量已达 20 万吨以上。一般来说, 鱿鱼有 30% 左右的头、足、内脏及表皮等废弃物产生。对于这些废弃物, 一般处理方法是就地掩埋, 这不但是对渔业资源的巨大浪费, 而且还存在着环境污染的隐患。磷脂是一类广泛存在于生物界中的含磷脂类, 在植物种子、动物血液、脏器、蛋黄及细菌中与油脂并存, 是生物细胞的构成物质, 也是生命的基础物质之一<sup>[1]</sup>。国内外的天然磷脂产品仍以大豆磷脂为主, 而蛋黄磷脂则在医药级的磷脂产品市场上占有一定份额。水产类中富含的二十二碳六烯酸/二十碳五烯酸 (DHA/EPA) 型磷脂在生理活性方面超越蛋黄磷脂、大豆磷脂的优异特性已经引起越来越多的关注。随着在分子水平上对

DHA/EPA 磷脂功能活性认识的不断深入, DHA/EPA 磷脂在有益于健康方面将会得到更多的开发利用, 特别是 DHA/EPA 磷脂所具有的优异功能特性, 将使其在营养、制药及医学领域都有良好的发展前景<sup>[2]</sup>。鱿鱼生殖腺中富含的卵磷脂类成分, 可作为提取磷脂的原料进行精深加工而大有潜力可挖<sup>[2]</sup>。磷脂的测定方法有薄层色谱扫描法<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法<sup>[4]</sup>、紫外分光光度法<sup>[5]</sup>等。本实验采用抗坏血酸-钼蓝法<sup>[6]</sup>测定了鱿鱼生殖腺提取物中总磷脂, 并对该方法的精密度、稳定性和准确性进行了研究。

### 1 材料

WFZ UV—2100 紫外可见分光光度计 (上海合

收稿日期: 2010-08-06

基金项目: 国际合作项目 (2007DFR30140)

作者简介: 袁延强 (1981—), 男, 硕士, 研究方向为天然化学成分的分离鉴定及活性筛选。E-mail: yuan\_yan\_qiang@hotmail.com

利仪器有限公司)、恒温水浴锅(金坛市文华仪器有限公司)、电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

鱿鱼生殖腺样品(荣成名兰水产有限公司,批号 20080910、20081001、20090105)。磷酸二氢钾、钼酸铵、氢氧化钠、乙二胺四乙酸二钠盐、抗坏血酸、98%浓硫酸、高氯酸、冰醋酸、95%乙醇、无水乙醇、酚酞指示剂均为分析纯,水为去离子水。

## 2 方法与结果

### 2.1 相关试剂的配制

**2.1.1 抗坏血酸溶液的制备<sup>[7]</sup>** 取抗坏血酸 15.00 g、乙二胺四乙酸二钠盐 0.15 g、冰醋酸 6.0 mL,加水溶解并定容于 150 mL 棕色量瓶中,放入冰箱中 4 °C 保存,作为抗坏血酸贮备液,备用。

**2.1.2 钼酸铵溶液的制备<sup>[8]</sup>** 称取钼酸铵 30.00 g,溶于 500 mL 去离子水中,置棕色密封塑料试剂瓶中,备用。

**2.1.3 硫酸溶液的制备** 取浓硫酸 260 mL,缓缓加入到 200 mL 水中,同时搅拌,冷却后加水至 500 mL,混匀,作为调节酸度的硫酸溶液,备用。

**2.1.4 氢氧化钠溶液的制备** 称取氢氧化钠 50 g,溶于 100 mL 去离子水中,即得。

### 2.2 磷标准溶液的制备

精密称取干燥至恒定质量的磷酸二氢钾 439.3 mg,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度;精密量取 1 mL 置 100 mL 量瓶中,加水稀释到刻度,即得质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的磷标准溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

称取冷冻干燥的鱿鱼生殖腺样品 100 g,粉碎,加入 1 000 mL 无水乙醇,30 °C 搅拌提取 3 h;滤过,滤液回收乙醇,再加入正己烷 200 mL 和 95%乙醇 40 mL 溶解,静置分层;取正己烷层,回收正己烷,提取物置 -20 °C 冰箱保存,备用。称取鱿鱼生殖腺提取物适量,制成质量浓度为 0.8 mg/mL 的无水乙醇溶液,即得。

### 2.4 检测波长的选择

精密量取 0.5 mL 磷标准溶液(空白以同体积蒸馏水代替)置于 10 mL 刻度试管中,补水至 5 mL,摇匀;依次加入 1.00 mL 硫酸溶液、1.00 mL 钼酸铵溶液、0.60 mL 抗坏血酸溶液,补水至 10 mL,加塞混匀,迅速放入 70 °C 水浴中显色 30 min;冷水中冷却 10 min。以蒸馏水为参比,在 500~900 nm 波长每隔 10 nm 测定吸光度值。结果在 820 nm 处

有最大吸收,故选择 820 nm 作为检测波长。

### 2.5 线性关系考察

分别精密量取磷标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置于 10 mL 刻度试管中,补水至 5 mL,摇匀;依次加入 1.00 mL 硫酸溶液、1.00 mL 钼酸铵溶液、0.60 mL 抗坏血酸溶液,补水至 10 mL,加塞混匀,迅速放入 70 °C 水浴中显色 30 min;冷水中冷却 10 min,制成质量浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  系列磷标准溶液。以 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  磷标准溶液为参比,在 820 nm 波长处测定吸光度值,以磷的质量浓度为横坐标( $X$ ),吸光值为纵坐标( $Y$ )进行线性回归,得回归方程  $Y=0.83 X+0.013 5$  ( $r=0.999 9$ ),结果表明磷在 0.2~1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  线性关系良好。

### 2.6 稳定性试验

分别精密量取 0.2、0.6、1.0 mL 磷标准溶液(空白以同体积蒸馏水代替)置于 10 mL 刻度试管中,补水至 5 mL,摇匀;依次加入 1.00 mL 硫酸溶液、1.00 mL 钼酸铵溶液、0.60 mL 抗坏血酸溶液,补水至 10 mL,加塞混匀,迅速放入 70 °C 水浴中显色 30 min;冷水中冷却 10 min。以蒸馏水为参比,分别于 0、1、2、3、4 h 在 820 nm 波长处测定吸光度值。结果 RSD 分别为 0.43%、0.30%、0.68%,表明显色物质在 4 h 内稳定。

### 2.7 重现性试验

取批号为 20080910 的样品,制备 6 份供试品溶液,分别精密量取 0.3 mL (空白以同体积无水乙醇代替)置于 10 mL 刻度试管中,置电炉上挥干溶剂;加入 4 滴浓硫酸后加热炭化,再滴入 3 滴高氯酸消化 40 min 至无色澄清<sup>[9]</sup>;冷却后补水至 2 mL,加入 1 滴酚酞,用氢氧化钠溶液中和至溶液显红色,缓慢滴加稀硫酸使红色消失,补水至 5 mL,摇匀;依次加入 1.00 mL 硫酸溶液、1.00 mL 钼酸铵溶液、0.60 mL 抗坏血酸溶液,补水至 10 mL,加塞混匀,迅速放入 70 °C 水浴中显色 30 min;冷水中冷却 10 min。以空白为参比,在 820 nm 波长处测定吸光度值,结果 RSD 为 1.85%。

### 2.8 加样回收率试验

精密量取批号 20080910 样品溶液 0.2 mL,加入 0.3 mL 磷标准溶液(空白以同体积无水乙醇代替),消化、显色并测定,共平行操作 6 次。结果平均回收率为 95.06%,RSD 为 1.09%。

### 2.9 样品的测定

取批号分别为 20080910、20081001、20090105 样品, 制备供试品溶液; 分别精密量取 0.3 mL (空白以同体积无水乙醇代替), 消化、显色并测定, 将测定结果代入回归方程计算总磷的量, 再乘以系数 26.31<sup>[10]</sup>, 得到总磷脂的量。结果 3 批鱿鱼生殖腺提取物中总磷脂的质量分数分别为 647.32、660.19、620.66 mg/g。

### 3 讨论

本实验采用浓硫酸-高氯酸法消化样品, 大大节约了时间。使用抗坏血酸作为还原剂, 消除了  $\text{Fe}^{3+}$  的干扰。在实验中要避免用含磷清洗剂清洗玻璃仪器, 以免引起误差。

实验结果表明, 本研究建立的测定方法所需设备简单, 测定快速、准确, 简便易行, 可满足不同场合下日常检验工作的需要, 为以鱿鱼生殖腺为原料开发的保健品及药品的质量控制提供了实用的检测方法。

### 参考文献

[1] 兰云军, 鲍利红, 聂会颖. 卵磷脂的存在方式、组成及

其研究状况 [J]. 西部皮革, 2002, 24(10): 32-35.

- [2] 王琦. 海产动物来源 n-3 PUFA 磷脂的提取及生物活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [3] 马辰, 段宏瑾. 大豆磷脂中磷脂类成分的含量分析 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(11): 671-672.
- [4] 王雅蕾, 黄建国, 马春建. 高效液相色谱法测定鸡蛋中的脑磷脂和卵磷脂 [J]. 分析仪器, 2010(3): 34-37.
- [5] 丁冠华, 李峰, 康廷国. 水蛭、地龙商品药材中总磷脂含量测定 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(4): 36-38.
- [6] 许冬瑾, 陶艳, 王三姓, 等. 高压炮制对何首乌中二苯乙烯苷和卵磷脂的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 78-80.
- [7] 陈迪军. 总磷测定中抗坏血酸溶液的保存 [J]. 环境检测管理与技术, 1998, 10(4): 38-39.
- [8] 葛秀涛. 几种化学试剂配制方法的改进 [J]. 大学化学, 1998, 13(3): 44-45.
- [9] 中国药典 [S]. 三部. 2010.
- [10] 粮油检验磷脂含量的测定 [S]. GB/T 5537—2008. 2009.

---

## 版权合作声明

中国药学会于 2009 年与中国学术期刊(光盘版)电子杂志社签订数字出版独家合作协议, 在协议期间, 中国药学会主办的科技期刊(包括天津中草药杂志社出版的 4 本期刊《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (中草药英文版)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》杂志)的网络版由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社(其出版和信息服务网站为“中国知网”)独家出版发行, 读者可登陆“中国知网”(www.cnki.net)查阅浏览全文。

天津中草药杂志社