



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—202X
代替 GB/T 35867-2018

粮油检验 磷脂中磷脂类化合物含量的测定 高效液相色谱-蒸发光散射法

Inspection of grain and oils - Determination of phospholipids content in lecithins –
High performance liquid chromatography using a light-scattering detector

(ISO 11701:2009 Vegetable fats and oils -Determination of phospholipids content
in lecithins by HPLC using a light-scattering detector,MOD)

(征求意见稿)

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国 家 市 场 监 督 管 理 总 局
国 家 标 准 化 管 理 委 员 会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 试剂和材料 1

6 仪器和设备 2

7 扦样 3

8 测试样品的制备 3

9 分析步骤 3

10 结果计算和表述 4

11 方法精密度 4

12 试验报告 5

附录 A（资料性附录） 高效液相色谱图 6

附录 B（资料性附录） 联合实验室测试结果 7

参考文献 10

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替GB/T 35867-2018《粮油检验 卵磷脂中磷脂含量的测定 高效液相色谱蒸发光散射检测法》，与GB/T 35867-2018相比，主要技术变化如下：

- a) 文件名称修改为“粮油检验 磷脂中磷脂类化合物含量的测定 高效液相色谱-蒸发光散射法”；
- b) 将“1 范围”和“9.1.2 试样溶液”中“卵磷脂”改为“磷脂”；
- c) 将“8 测试样品制备”中“ISO 661”改为“GB/T 15687”。

本文件参考ISO 11701:2009《Vegetable fats and oils — Determination of phospholipids content in lecithins by HPLC using a light-scattering detector》起草，一致性程度为修改采用。

本文件与 ISO 11701:2009的技术差异及其原因如下：

——用规范性引用的GB/T 15687替换了ISO 661, 以适应我国国情。

本文件做了下列编辑性修改：

——更改了标准品和标准溶液制备的描述。

——删除了国际标准中不适用的参考文献

本文件由国家粮食和物资储备局提出。

本文件由全国粮油标准化技术委员会（SAC/TC 270）归口。

本文件起草单位：武汉食品化妆品检验所、武汉轻工大学、武汉市储备粮保障中心、武汉检验检测认证发展集团有限公司、南京财经大学、上海源本食品质量检验有限公司、中粮佳悦（天津）有限公司、武汉市计量标准质量研究院。

本文件主要起草人：江小明、毛燕妮、卢跃鹏、侯靖、聂懿、王澍、赵康宇、张欣、狄毅、杨永、李彭、陆轶明、方慧文、涂风琴、王伟、姚望、曾祥辉。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2018年首次发布为GB/T 35867-2018；

——本次为第一次修订。

粮油检验 磷脂中磷脂类化合物含量的测定 高效液相色谱-蒸发光散射法

1 范围

本文件规定了采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法定量测定N-酰基-磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酸、溶血磷脂酰胆碱含量的方法。

本文件适用于粗制含油磷脂、无油磷脂和从植物油脂中获得的分馏磷脂。

由于溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰肌醇、溶血磷脂酸分离不完全，本文件不适用于动物磷脂、反刍动物磷脂以及酶解磷脂。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 5524 动植物油脂 扦样（ISO 5555:2001，IDT）

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 15687 动植物油脂 试样的制备（ISO 661:2003，IDT）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 单组分磷脂含量 **content of an individual phospholipid**

按照本文件规定的方法测得的 N-酰基-磷脂酰乙醇胺(N-acyl-phosphatidylethanolamine, N-acyl-PE)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)、磷脂酸(phosphatidic acid, PA)、溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)的质量分数。

4 原理

各磷脂组分通过配备二醇柱的高效液相色谱仪分离，蒸发光散射检测器检测，与标准物质比较，保留时间定性，外标法定量。

5 试剂和材料

警告——应当严格遵循有毒物质的使用规程。采取有效措施保证组织和个人安全。

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：一级水。

5.2 正己烷：色谱纯。

5.3 异丙醇：色谱纯。

5.4 乙酸：质量分数 $\geq 99.8\%$ 。

5.5 三乙胺。

5.6 混合溶剂：混合溶剂由 80 mL 正己烷（5.2）和 20 mL 异丙醇（5.3）（体积比 V/V=80:20）组成，用于溶解标准品和样品。

5.7 标准品：

5.7.1 1,2-二酰基-*sn*-甘油-3-磷酸-*N*-酰基乙醇胺(*N*-酰基-磷脂酰乙醇胺)：来源于大豆，纯度 $\geq 98.0\%$ 或有证标准物质；

5.7.2 1,2-二酰基-*sn*-甘油-3-磷酸（磷脂酸）：来源于大豆，纯度 $\geq 98.0\%$ 或有证标准物质；

5.7.3 1,2-二酰基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺（磷脂酰乙醇胺）：来源于大豆，纯度 $\geq 98.0\%$ 或有证标准物质；

5.7.4 1,2-二酰基-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱（磷脂酰胆碱）：来源于大豆，纯度 $\geq 98.0\%$ 或有证标准物质；

5.7.5 1,2-二酰基-*sn*-甘油-3-磷酸肌醇（磷脂酰肌醇）：来源于大豆，纯度 $\geq 98.0\%$ 或有证标准物质；

5.7.6 1-酰基-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱（溶血磷脂酰胆碱）：来源于大豆，纯度 $\geq 98.0\%$ 或有证标准物质。

5.8 高效液相色谱流动相

5.8.1 A相：将 814.2 mL 正己烷（5.2）、170.0 mL 异丙醇（5.3）、15.0 mL 乙酸（5.4）和 0.8 mL 三乙胺（5.5）混合（体积比 V/V/V/V=81.42/17.00/1.50/0.08），现配现用。

为使流动相配制比例稳定，需考虑溶剂密度，建议将所有溶剂称重。若配制 2.5 L 流动相，则称取 1 341.4 g 正己烷、331.5 g 异丙醇、39.4 g 乙酸和 1.45 g（2.0 mL）三乙胺。

5.8.2 B相：将 844.2 mL 异丙醇（5.3）、140.0 mL 水（5.1）、15.0 mL 乙酸（5.4）和 0.8 mL 三乙胺（5.5）混合（体积比 V/V/V/V=84.42/14.00/1.50/0.08），现配现用。

为使流动相配制比例稳定，需考虑溶剂密度，建议将所有溶剂称重。若配置 2.5 L 流动相，则称取 1 646.2 g 异丙醇、350.0 g 水、39.4 g 乙酸和 1.45 g（2.0 mL）三乙胺。

6 仪器和设备

6.1 分析天平：感量为 0.1 mg。

6.2 高效液相色谱：配备梯度系统和蒸发光散射检测器。

6.3 高效液相色谱柱温箱：可调至 55℃。

6.4 脱气装置或类似设备：用于流动相脱气。

6.5 高效液相色谱柱（250 mm×4.0 mm）：配备预柱（20 mm×4.0 mm），填料为二醇键合的球形硅胶微粒（5 μm），例如：Lichrospher 100 diol（5 μm）¹⁾。色谱柱的新旧程度和使用情况、填料填装状态以及温度会影响各组分的分离。

6.6 容量瓶：容积为 1.0 mL、10 mL、50 mL，GB/T 12806 A 级。

6.7 微量注射器：量程为 25 μL，最小刻度为 1 μL。

6.8 过滤器：0.45 μm 有机滤膜，用于过滤外标和测试样品溶液。

6.9 数据处理系统。

7 扦样

实验室收到的样品应当有代表性，且在运输和储存过程中不应损坏或变质。

扦样不是本标准的内容。建议采用 GB/T 5524 所规定方法进行扦样。

8 测试样品的制备

按照 GB/T 15687 执行。

样品应在 60℃ 以下熔化，避免加热温度过高，然后剧烈搅拌均质。

9 分析步骤

9.1 标准溶液和试样溶液的制备

9.1.1 标准储备溶液：分别精确称取 100 mg 标准物质（5.7）于 6 个 10 mL 容量瓶中，用混合溶剂（5.6）溶解并定容，混匀，得浓度为 10.0 mg/mL 的标准储备溶液。

9.1.2 标准中间溶液：分别吸取 1.00 mL 标准储备溶液（9.1.1）于同一 10 mL 容量瓶中，用混合溶剂（5.6）定容，混匀，得浓度为 1.00 mg/mL 的标准中间溶液。

9.1.3 标准工作溶液：分别吸取 10.0 μL、20.0 μL、50.0 μL、100 μL、200 μL 和 500 μL 标准中间溶液（9.1.2）于 6 个 1 mL 容量瓶中，用混合溶剂（5.6）定容，混匀，得浓度为 10.0 mg/L、20.0 mg/L、50.0 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 和 500 mg/L 的标准工作溶液。

9.1.4 试样溶液：称取 425 mg 粗制含油磷脂、255 mg 无油磷脂、255 mg 分馏磷脂于 50 mL 容量瓶中，精确到 0.001 g，用混合溶剂（5.6）溶解并定容。过滤试样溶液，待上机测定。

9.2 高效液相色谱参考条件

优化仪器工作条件，使测试样品和标准品中各组分得到满意的色谱分离，如附录A中的图A.1。可参考以下条件（见表1）：

——柱温：55℃；

1) ¹LiChrospher 100 diol 是默克公司产品的商品名称。给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品有相同的效果，则可使用这些等效产品。

- 检测器增益：5 ～ 6；
- 检测器温度：50℃；
- 检测器压力：0.20 MPa（2.0 bar）；
- 流速：1.0 mL/min；
- 柱冲洗流速：2.0 mL/min。

表 1 高效液相色谱梯度洗脱表

时间/min	流动相 A /%	流动相 B /%	流速/（mL/min）
0.0	95	5	1.0
5.0	80	20	1.0
8.5	60	40	1.0
15.0	0	100	1.0
17.5	0	100	1.0
17.6	95	5	1.0
21.0	95	5	1.0
22.0	95	5	2.0
27.0	95	5	2.0
29.0	95	5	1.0

9.3 标准曲线

吸取20 μL标准溶液和试样溶液进行测定，以标准溶液浓度的幂函数为横坐标，以峰面积的幂函数为纵坐标绘制标准曲线。

注：蒸发光散射检测器响应值与浓度呈S形曲线，所选取的标准溶液的浓度应在检测器线性范围内。

9.4 测定

吸取20 μL试样溶液进样测定，记录峰面积。通过比较测试样品和标准溶液中各物质的保留时间进行定性（参见图 A.1）。

10 结果计算和表述

用标准曲线计算单组分磷脂的含量（参见 9.3）。当试样中组分响应值在标准曲线范围外时，应使用混合溶剂（5.6）将试样溶液适当稀释后进行测定。

按公式（1）计算：

$$w_i = \frac{m_{pi}}{m} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

w_i —— 测试样品中单组分磷脂的质量分数，单位为克每百克（g/100 g）；

m_{pi} —— 测试样品中单组分磷脂的质量，单位为毫克（mg）；

m —— 测试样品的质量（9.1.4），单位为毫克（mg）。

计算结果保留一位小数。

11 检出限与定量限

11.1 检出限

当粗制含油磷脂取样量为425 mg，无油磷脂和分馏磷脂取样量为255 mg，定容体积为50 mL时，6种化合物的检出限均为0.1 g/100g）。

11.2 定量限

当粗制含油磷脂取样量为425 mg，无油磷脂和分馏磷脂取样量为255 mg，定容体积为50 mL时，6种化合物的定量限均为0.3 g/100g）。

12 方法精密度

12.1 联合实验室测试

关于方法精密度的联合实验室试验数据参见附录B。由此次联合实验室测试得出的数据可能不适用于其它的含量范围和测试对象。

12.2 重复性限

在重复性条件下进行一系列测定所得两个最终测试结果的绝对差值小于或等于重复性限 r 的可能性为95%。

重复性条件是指同一实验室，由同一操作者使用相同的设备、按相同的测试方法，在短时间内对同一被测对象相互独立进行的测试条件。

12.3 再现性限

在再现性条件下进行一系列测定所得两个最终测试结果的绝对差值小于或等于再现性限 R 的可能性为95%。

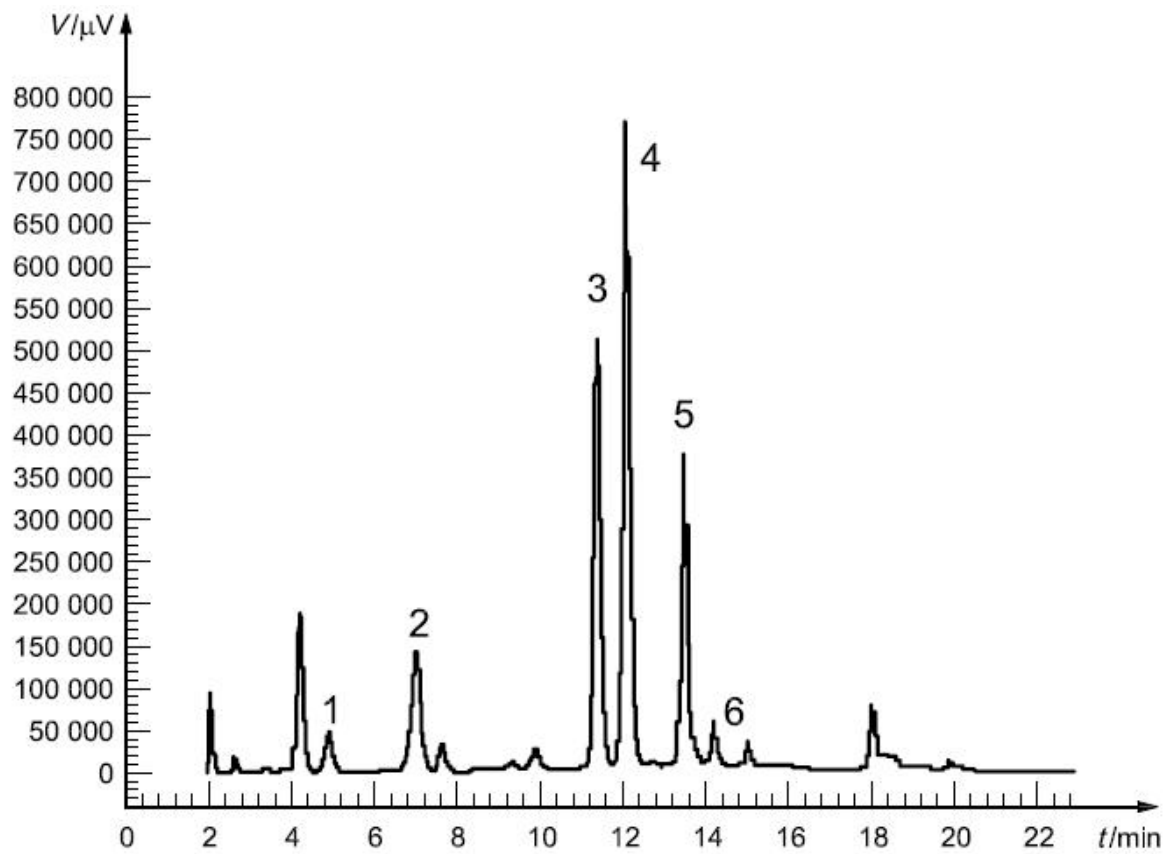
再现性条件指在不同的实验室，由不同的操作者使用不同的设备、按相同的测试方法，对同一被测对象相互独立进行的测试条件。

13 试验报告

试验报告应说明：

- a) 完整识别样品所必需的所有信息；
- b) 取样方法；
- c) 依据本文件所采用的检验方法；
- d) 本标准未规定或列为可选的所有操作细节，以及可能影响测试结果的其它因素；
- e) 测试结果，如果检验了重复性，列出最终结果。

附录 A
(资料性)
高效液相色谱图



说明:

- 1. ——*N*-酰基-磷脂酰乙醇胺;
- 2. ——磷脂酸;
- 3. ——磷脂酰乙醇胺;
- 4. ——磷脂酰胆碱;
- 5. ——磷脂酰肌醇;
- 6. ——溶血磷脂酰胆碱;
- t* ——时间;
- V* ——响应。

图 A. 1 粗制大豆磷脂高效液相色谱图

附录 B

(资料性)

联合实验室测试结果

本方法的精密度是1996年国际卵磷脂和磷脂协会(ILPS)在全世界范围内组织的联合实验室研究的结果。这次研究共有三个样品,其测定的结果依据ISO 5725-1^[1]和ISO 5725-2^[2]进行统计分析,得到的精密度数据见表B.1~B.6。

表 B.1 N-酰基-磷脂酰乙醇胺(N-acyl-PE)统计结果表

参数	样品	
	A: 粗制大豆磷脂	B: 粗制大豆磷脂
参加实验室数量, N	10	11
排除离群值后的实验室数量, n	8	8
所有实验室对每个样品的测定次数, z	4	4
平均值, $\bar{w}$ (质量分数) / %	1.52	1.59
重复性标准偏差, s_r	0.04	0.05
重复性变异系数, CV_r / %	2.3	3.2
重复性限, r ($=s_r \times 2.8$)	0.10	0.14
再现性标准偏差, s_R	0.11	0.20
再现性变异系数, CV_R / %	7.2	12.6
再现性限, R ($=s_R \times 2.8$)	0.30	0.55

表 B.2 磷脂酸(PA)统计结果表

参数	样品	
	A: 粗制大豆磷脂	B: 粗制大豆磷脂
参加实验室数量, N	12	12
排除离群值后的实验室数量, n	11	10
所有实验室对每个样品的测定次数, z	4	4
平均值, $\bar{w}$ (质量分数) / %	4.67	6.23
重复性标准偏差, s_r	0.17	0.20
重复性变异系数, CV_r / %	3.6	3.4
重复性限, r ($=s_r \times 2.8$)	0.46	0.57
再现性标准偏差, s_R	0.24	1.17
再现性变异系数, CV_R / %	4.6	18.8
再现性限, R ($=s_R \times 2.8$)	0.67	3.28

表 B.3 磷脂酰乙醇胺(PE)统计结果表

参数	样品	
	A: 粗制大豆磷脂	B: 粗制大豆磷脂
参加实验室数量, N	12	12
排除离群值后的实验室数量, n	9	10
所有实验室对每个样品的测定次数, z	4	4
平均值, $\bar{w}$ (质量分数) / %	11.74	12.14
重复性标准偏差, s_r	0.17	0.21
重复性变异系数, CV_r / %	1.5	1.7
重复性限, r ($=s_r \times 2.8$)	0.47	0.59
再现性标准偏差, s_R	0.34	0.37
再现性变异系数, CV_R / %	2.9	3.0
再现性限, R ($=s_R \times 2.8$)	0.94	1.03

表 B.4 磷脂酰胆碱(PC)统计结果表

参数	样品		
	A: 粗制大豆磷脂	B: 粗制大豆磷脂	C: 大豆磷脂中 PC 馏分
参加实验室数量, N	12	12	13
排除离群值后的实验室数量, n	11	11	12
所有实验室对每个样品的测定次数, z	4	4	4
平均值, $\bar{w}$ (质量分数) / %	14.70	13.45	94.70
重复性标准偏差, s_r	0.25	0.27	1.01
重复性变异系数, CV_r / %	1.7	2.0	1.1
重复性限, r ($=s_r \times 2.8$)	0.69	0.76	2.28
再现性标准偏差, s_R	0.46	0.46	2.14
再现性变异系数, CV_R / %	3.1	3.4	2.3
再现性限, R ($=s_R \times 2.8$)	1.28	1.28	6.00

表 B.5 磷脂酰肌醇(PI)统计结果表

参数	样品	
	A: 粗制大豆磷脂	B: 粗制大豆磷脂
参加实验室数量, N	12	12
排除离群值后的实验室数量, n	11	11
所有实验室对每个样品的测定次数, z	4	4
平均值, $\bar{w}$ (质量分数) / %	9.36	9.87
重复性标准偏差, s_r	0.17	0.20

重复性变异系数, $CV_r / \%$	1.8	2.0
重复性限, $r (=s_r \times 2.8)$	0.48	0.56
再现性标准偏差, s_R	0.30	0.33
再现性变异系数, $CV_R / \%$	3.2	3.4
再现性限, $R (=s_R \times 2.8)$	0.83	0.93

表 B.6 溶血磷脂酰胆碱(LPC)统计结果表

参数	样品	
	A: 粗制大豆磷脂	B: 粗制大豆磷脂
参加实验室数量, N	11	12
排除离群值后的实验室数量, n	10	7
所有实验室对每个样品的测定次数, z	4	4
平均值, $\bar{w}$ (质量分数) / %	0.71	0.46
重复性标准偏差, s_r	0.06	0.03
重复性变异系数, $CV_r / \%$	8.5	7.0
重复性限, $r (=s_r \times 2.8)$	0.17	0.09
再现性标准偏差, s_R	0.15	0.11
再现性变异系数, $CV_R / \%$	20.9	23.9
再现性限, $R (=s_R \times 2.8)$	0.41	0.32

参 考 文 献

- [1] ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 1: General principles and definitions
- [2] ISO 5725-2 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
-