



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 35867—2018/ISO 11701:2009

## 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

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, IDT)

2018-02-06 发布

2018-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布  
中国国家标准化管理委员会

## 目 次

前言 .....	III
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 .....	2
8 测试样品的制备 .....	2
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 .....	4
附录 A (资料性附录) 高效液相色谱图 .....	5
附录 B (资料性附录) 联合实验室测试结果 .....	6
参考文献 .....	9

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准使用翻译法等同采用 ISO 11701:2009《植物油脂 高效液相色谱蒸发光散射检测法测定卵磷脂中磷脂的含量》。

与本标准中规范性引用的国际文件有一致性对应关系的我国文件如下：

——GB/T 15687—2008 动植物油脂 试样的制备(ISO 661:2003, IDT)。

为便于使用,本标准做了以下编辑性修改：

——改变了标准名称(以便于与现有标准系列一致)。

本标准由国家粮食局提出。

本标准由全国粮油标准化技术委员会(SAC/TC 270)归口。

本标准起草单位：武汉食品化妆品检验所、武汉产品质量监督检验所、武汉轻工大学。

本标准主要起草人：李珺、江小明、杨永、卢跃鹏、段建坤、胡筱静、方慧文、何东平、张世宏、周玉娟、汪芳芳、王澍。

# 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

### 1 范围

本标准规定了采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法定量测定磷脂含量的方法。

本标准适用于粗制含油卵磷脂、无油卵磷脂和从植物油脂中提取的卵磷脂。

由于溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰肌醇、溶血磷脂酸分离效果不好,本标准不适用于动物卵磷脂、反刍动物卵磷脂以及酶解卵磷脂。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

ISO 661 动植物油脂 试样的制备(Animal and vegetable fats and oils—Preparation of test sample)

### 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

按照本标准规定的方法测得的 *N*-酰基-磷脂酰乙醇胺(*N*-acyl-PE)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酸(PA)、溶血磷脂酰胆碱(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,与标准物质比较进行定量。

### 5 试剂和材料

**警示**——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)(正己烷体积分数

$\varphi=80$  mL/100 mL, 异丙醇体积分数  $\varphi=20$  mL/100 mL) 组成, 用于溶解标准品和样品。

5.7 标准品(外标)ILPS-LE01<sup>1)</sup>: 混合大豆磷脂标准物质, 其中 N-acyl-PE、PA、PE、PC、PI、LPC 的准确含量已精确测定。

### 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。(其中正己烷体积分数  $\varphi=81.42$  mL/100 mL, 异丙醇体积分数  $\varphi=17.00$  mL/100 mL, 乙酸体积分数  $\varphi=1.50$  mL/100 mL, 三乙胺体积分数  $\varphi=0.08$  mL/100 mL)

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。(其中异丙醇体积分数  $\varphi=84.42$  mL/100 mL, 水体积分数  $\varphi=14.00$  mL/100 mL, 乙酸体积分数  $\varphi=1.50$  mL/100 mL, 三乙胺体积分数  $\varphi=0.08$  mL/100 mL)

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 °C。

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球形微粒(5 μm), 例如: Lichrospher 100 diol(5 μm)<sup>2)</sup>。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 50 mL、100 mL、2 500 mL, ISO 1042<sup>2)</sup> 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: 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 ISO 5555<sup>[2]</sup> 所规定方法进行扦样。

## 8 测试样品的制备

按照 ISO 661 执行。

样品应在 60 °C 以下融化, 避免加热温度过高, 然后剧烈搅拌均匀。

1) ILPS-LE01 是国际卵磷脂与磷脂协会(ILPS)提供产品的商品名, 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。如果其他等效产品具有相同的效果, 则可使用这些等效产品。

2) LiChrospher 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。

## 9 分析步骤

### 9.1 标准溶液和试样溶液的制备

9.1.1 标准溶液  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ : 制备 3 种不同浓度的标准溶液。分别精确称取 550 mg( $R_1$ )、850 mg( $R_2$ )、1 150 mg( $R_3$ ) 标准品(5.7)于 3 个 100 mL 容量瓶中,用混合溶剂(5.6)溶解并定容。过滤此标准溶液用于高效液相色谱分析。

9.1.2 试样溶液: 称取 425 mg 粗制卵磷脂、255 mg 脱油卵磷脂、255 mg 分馏卵磷脂于 50 mL 容量瓶中,精确到 0.001 g,用混合溶剂(5.6)溶解并定容。过滤试样溶液得到测试液  $S_{1a}$  和  $S_{1b}$ 。

### 9.2 高效液相色谱分析

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,如图 A.1。可参考以下条件(见表 1):

- 柱温: 55 ℃;
- 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  $\mu$ L 标准溶液和试样溶液进行测定,以测得的峰面积对浓度作图制作标准曲线。

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。

在进行磷脂的定量分析时,建议采用以下的分析顺序:  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  (每个标准溶液进样一次),  $S_{1a}$ 、 $S_{1b}$  (每个试样溶液进样两次),  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  (每个标准溶液进样一次)。

### 9.4 测定

吸取 20  $\mu$ L 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)。标准曲线中应包含 3 个比样品浓度低的校准点和 3 个比样品浓度高的校准点。根据测试样品浓度,可将  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ (9.1.1)稀释为合适的 6 个校准点。

按下式计算:

$$w_i = \frac{m_{pi}}{m} \times 100$$

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(9.1.2),单位为毫克(mg)。

计算结果保留一位小数。

## 11 方法精密度

### 11.1 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他的含量范围和测试对象。

### 11.2 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%。

重复性条件是指在同一实验室,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。

### 11.3 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%。

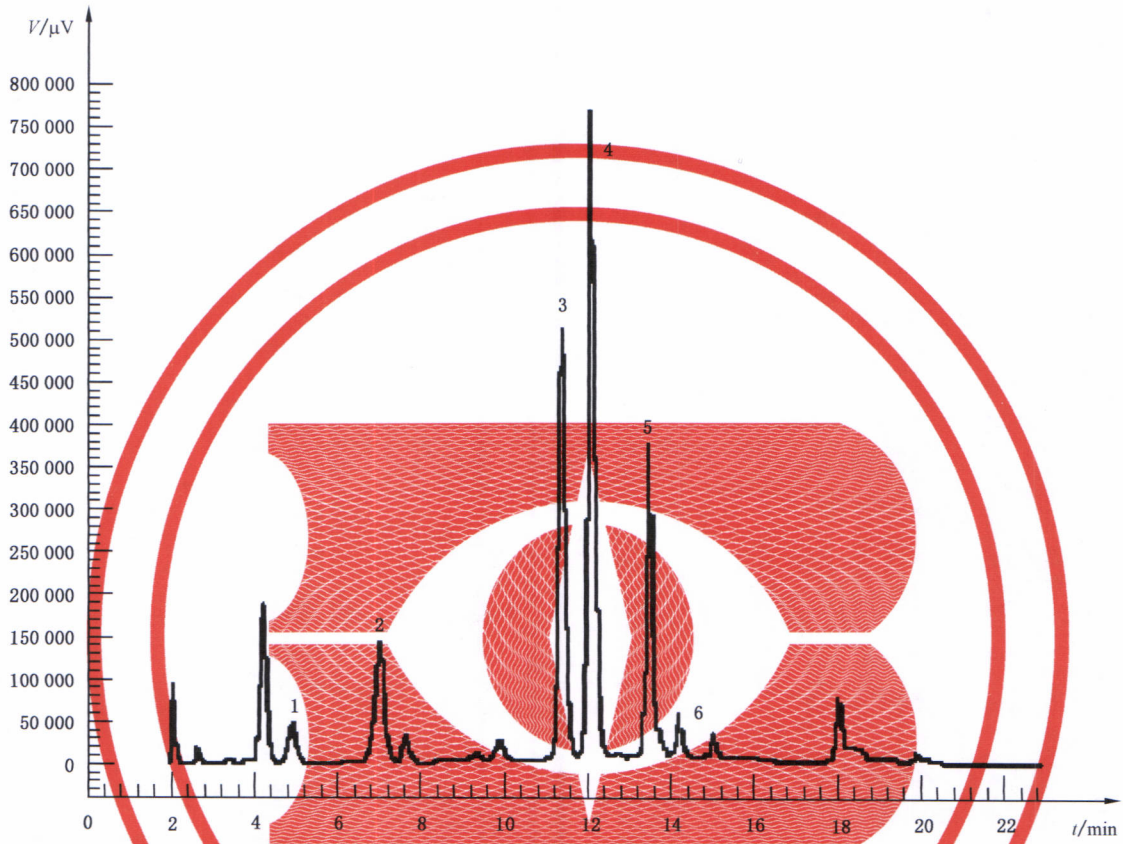
再现性条件指在不同的实验室,由不同的操作者使用不同的设备、按相同的测试方法,对同一被测对象相互独立进行的测试条件。

## 12 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) 依据本标准所采用的检验方法;
- 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他因素;
- e) 测试结果,如果检验了重复性,列出最终结果。

附录 A  
 (资料性附录)  
 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 粗制大豆卵磷脂高效液相色谱图



**附录 B**  
(资料性附录)  
**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<sup>[3]</sup>和 ISO 5725-2<sup>[4]</sup>进行统计分析,得到的精密度数据见表 B.1~表 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:粗制大豆卵磷脂	B:粗制大豆卵磷脂
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:粗制大豆卵磷脂	B:粗制大豆卵磷脂
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:粗制大豆卵磷脂	B:粗制大豆卵磷脂
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:粗制大豆卵磷脂	B:粗制大豆卵磷脂	C:大豆卵磷脂中 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:粗制大豆卵磷脂	B:粗制大豆卵磷脂
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

表 B.5 (续)

参数	样品	
	A:粗制大豆卵磷脂	B:粗制大豆卵磷脂
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:粗制大豆卵磷脂	B:粗制大豆卵磷脂
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 1042 Laboratory glassware—One-mark volumetric flasks
  - [2] ISO 5555 Animal and vegetable fats and oil—Sampling
  - [3] ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 1: General principles and definitions
  - [4] ISO 5725-2 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
-

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
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  
GB/T 35867—2018/ISO 11701:2009

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

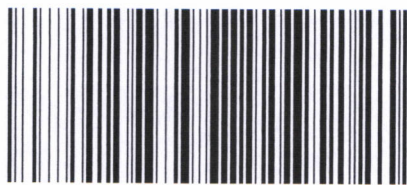
\*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字  
2018年2月第一版 2018年2月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-59077 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换  
版权专有 侵权必究  
举报电话:(010)68510107



GB/T 35867-2018