

中华人民共和国国家标准

GB/T 21493—2008

大豆磷脂中磷脂酰胆碱、 磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇的测定

Determination of phosphatidylethanolamine,
phosphatidylinositol and phosphatidycholine of soybean phospholipids

2008-03-06 发布

2008-08-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准是在参考国际卵磷脂与磷脂协会(ILPS)、美国油脂化学家协会(AOCS)等相关方法的基础上确定的适合我国国情的分析方法。

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归口。

本标准起草单位：国家粮食局科学研究院。

本标准主要起草人：王瑛瑶、马榕、薛雅琳。

大豆磷脂中磷脂酰胆碱、 磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇的测定

1 范围

本标准规定了一种采用高效液相色谱法同时测定大豆磷脂中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇三种组分含量的方法。

本标准适用于含油大豆磷脂、脱油大豆磷脂中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇的测定。本标准不适用于大豆溶血磷脂酰胆碱及大豆溶血磷脂酰乙醇胺的测定。

本标准中磷脂酰胆碱的检出限为 1.21×10^{-2} mg/mL, 磷脂酰乙醇胺的检出限为 4.66×10^{-2} mg/mL, 磷脂酰肌醇的检出限为 7.36×10^{-3} mg/mL。

2 原理

用多元流动相等度洗脱分配于色谱柱两相中的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇组分, 在固定相中滞留时间不同, 达到分离目的。紫外检测器在线检测流出组分, 与标准系列比较定量。

3 试剂

- 3.1 正己烷: 色谱纯。
- 3.2 异丙醇: 色谱纯。
- 3.3 水: 色谱纯。
- 3.4 冰醋酸: 色谱纯。
- 3.5 1%冰醋酸溶液: 1 mL 冰醋酸用色谱纯水定容到 100 mL。
- 3.6 磷脂酰胆碱: 标准物质, 纯度 $\geq 99\%$ 。
- 3.7 磷脂酰乙醇胺: 标准物质, 纯度 $\geq 99\%$ 。
- 3.8 磷脂酰肌醇: 标准物质, 纯度 $\geq 98\%$ 。
- 3.9 流动相: $V(\text{正己烷}) + V(\text{异丙醇}) + V(1\% \text{冰醋酸溶液}) = 8 + 8 + 1$ 。

注: 所用的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇标样来源应与所测定的样品一致, 如测定的样品为大豆磷脂时, 上述三种标样应来源于大豆。

4 仪器与设备

- 4.1 分析天平: 精度为 0.000 1 g。
- 4.2 刻度吸管: 0.5 mL, 1 mL, 5 mL。
- 4.3 容量瓶: 5 mL, 10 mL, 100 mL。
- 4.4 量筒: 100 mL, 500 mL, 1 000 mL。
- 4.5 氮气瓶。
- 4.6 液相色谱仪, 带进样系统、紫外检测器和数据处理器。
- 4.7 液相色谱柱: Si-60 柱子, 填料粒度为 $5 \mu\text{m}$ 。长度 250 mm, 内径 4.6 mm。

注: 柱子长度与直径可以依据实验条件做相应选择。

5 分析步骤

5.1 液相系统的平衡

进样分析前, 用流动相平衡液相系统, 控制流速为 0.5 mL/min, 保证基线平稳, 样品的保留时间稳定。

5.2 标准溶液的配制

精确称取约 20 mg 磷脂酰胆碱、20 mg 磷脂酰乙醇胺与 10 mg 磷脂酰肌醇,用 V(正己烷)+V(异丙醇)+V(1%冰醋酸溶液)=8+8+1 混合溶剂溶解并定容到 10 mL,配制磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇的混合标准溶液,使溶液中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇浓度分别为 2 mg/mL、2 mg/mL、1 mg/mL。准确吸取此溶液 0.25 mL、1.25 mL、2.50 mL、3.75 mL、5.00 mL,并用 V(正己烷)+V(异丙醇)+V(1%冰醋酸溶液)=8+8+1 混合溶剂定容到 5 mL,使溶液中磷脂酰胆碱的最终浓度为 0.1 mg/mL ~2.0 mg/mL,磷脂酰乙醇胺的最终浓度为 0.1 mg/mL ~2.0 mg/mL,磷脂酰肌醇的最终浓度为 0.05 mg/mL ~1.0 mg/mL。低于-16℃保存备用,保存时注意容器口的密封。

注:假如标样为三氯甲烷或甲醇的溶液,必须将其中的溶剂用氮气小心吹干,再用流动相溶解定容。

5.3 标准工作曲线的制作

分别取不同浓度的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇混合标准溶液 10 μL 注入液相色谱中。以样品各组分浓度为横坐标,各组分峰面积为纵坐标,分别绘制磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇三种组分的标准工作曲线。

5.4 样品前处理

测试样品应避光放在密闭和防潮的容器内。样品在使用前需充分混匀。

依据样品中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇含量,精确称取样品 15 mg ~50 mg。用 V(正己烷)+V(异丙醇)+V(1%冰醋酸溶液)=8+8+1 混合溶剂溶解并定容至 5 mL。低于-16℃保存备用,保存时注意容器口的密封。

5.5 测定

5.5.1 色谱条件:Si-60 柱子,长 250 mm,内径 4.6 mm,填充物粒度 5 μm。流动相流速 1 mL/min,柱温 30℃,紫外检测波长 205 nm。如果采用不同型号的 Si 柱,可通过调整流速,达到最佳工作状态。

5.5.2 进样:准确取经 0.45 μm 微孔膜过滤的待测液 10 μL,注入液相色谱仪,比较待测液与标准样品的高效液相色谱(HPLC)图谱,取与标准样品 HPLC 图谱中磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰胆碱相同时间的峰面积与标准工作曲线比较定量。对同一样品至少进行两次测定。

6 结果计算

试样中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇的含量以各组分的质量与试样原有质量的质量分数表示,其计算公式为:

$$X = \frac{c \times 5}{m} \times 100$$

式中:

X——样品中磷脂酰胆碱(或磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇)的含量,单位为克每一百克(g/100 g);

c——由磷脂酰胆碱(或磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇)标准工作曲线上查出的试样测定液中磷脂酰胆碱(或磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇)的浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

5——样品的定容体积,单位为毫升(mL);

m——样品的总质量,单位为毫克(mg)。

如果两次测定的结果符合第 7 章中给定的重复性要求,则取两次测定的算术平均值作为结果。如果不符合重复性要求,需对同一样品重新进行两次测定。

7 重复性要求

同一个分析者使用同样的方法在同一个实验室内使用同样仪器设备对同一试样连续进行两次测定的结果相对偏差不得大于 5%。

8 测试报告

测试报告应该详细说明：

——使用的方法；

——得到的实验结果；

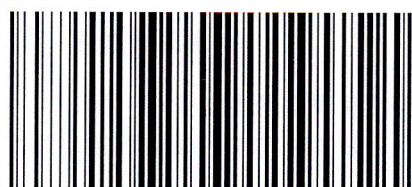
——如果检查了重复性，得到最终引用的结果。

还需要说明那些未在本标准中详细规定的或作为可选择的操作的细节，以及可能影响了测试结果的任何意外情况。

测试报告应该包括所有可用于完整鉴别样品所必需的信息。

参 考 文 献

1. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, AOCS Press, Champaign, 1993, Method Ja 7B-91.
2. Herslof B, U Olsson, and P Tingvall. Characterization of lecithins and phospholipids by HPLC with light-scattering detection//I Hanen and G Pepeu. Phospholipids, Plenum, New York, 1990,295-298.
3. Pirooska E B, L S Philip and F S Bernard. High-performance liquid chromatographic separations of soy phospholipids. JAOCS. 1996,73:193-197.
4. Chen, S-H and A Kou. Improved procedure for the separation of phospholipids by HPLC, J. Chromatogr. 1982,227:25-31.
5. Singleton J A. Separation and characterization of peanut phospholipid molecular species using high performance liquid chromatography and fast atom bombardment mass spectrometry. J. Am. Oil. Chem. Soc. 1999,76:49-56.



GB/T 21493—2008

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-31307

定价: 10.00 元