

检测分析

直接进样 HPLC - ELSD 法测定花生中磷脂含量

赵琦琰¹, 杨瑞金^{1,2}, 刘军军³, 李鹏飞⁴, 刘媛媛⁴

(1. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122;

3. 江南大学 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心, 江苏 无锡 214122;

4. 江苏俊启生物科技股份有限公司, 江苏 南通 226600)

摘要:建立了直接进样高效液相色谱-蒸发光检测器(HPLC-ELSD)法测定花生中磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)和磷脂酸(PA)的方法。采用改良 Folch 方法提取样品总脂肪,然后将提取出的总脂肪直接溶于流动相进行液相色谱分析,以 L-Si 型正相硅胶色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为固定相,以正己烷-异丙醇(体积比 2:3)为流动相 A,正己烷-异丙醇-25 mmol/L 乙酸铵溶液(体积比 3.6:5.4:1)为流动相 B 进行二元梯度洗脱,蒸发光检测器检测。PC、PE、PI 和 PA 4 种磷脂色谱峰面积与其质量浓度的线性相关系数(R^2)大于 0.995,4 种磷脂的平均回收率在 93.59%~108.57% 之间, RSD 均小于 10%。该方法具有重现性好、稳定性高、前处理简单的特点,可应用于磷脂的分离检测。

关键词:花生;磷脂;HPLC-ELSD;定量分析

中图分类号:O657;TQ646

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)03-0131-05

Determination of phospholipids in peanut by direct - injection HPLC - ELSD

ZHAO Qiyang¹, YANG Ruijin^{1,2}, LIU Junjun³, LI Pengfei⁴, LIU Yuanyuan⁴

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122,

Jiangsu, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University,

Wuxi 214122, Jiangsu, China; 3. Collaborative Innovation Center of Food Safety and

Quality Control in Jiangsu Province, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;

4. Jiangsu Junqi Bio-technology Co., Ltd., Nantong 226600, Jiangsu, China)

Abstract: A method was established to determine phosphatidylcholine (PC), phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI) and phosphatidate (PA) in peanut by direct - injection HPLC - ELSD. A modified Folch method was used to extract the total fat and then the extract dissolved in the mobile phase was taken directly into HPLC. The HPLC method was performed on a column of L - Si (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by gradient elution using hexane - isopropanol (volume ratio 2:3) and hexane - isopropanol - 25 mmol/L ammonium acetate (volume ratio 3.6:5.4:1) as the mobile phases and detected by evaporative light - scattering detector. The correlation coefficient of standard curve for mass concentration and peak area of each phospholipid in linearity range was above 0.995, as well as the average recovery rates of the four phospholipids in peanut were in the ranges of 93.59% - 108.57% with the relative standard deviations ($RSDs$) less than 10%. The method had advantages of good reproducibility, high stability and simple pretreatment and it should be used for separation and determination of phospholipids.

Key words: peanut; phospholipids; HPLC - ELSD; quantitative analysis

收稿日期:2017-08-04;修回日期:2017-12-27

基金项目:863 基金项目(2013AA102104)

作者简介:赵琦琰(1993),女,硕士研究生,研究方向为食品加工与配料(E-mail)zhaociyan93108@sina.cn。

通信作者:杨瑞金,教授,博士(E-mail)yrj@jiangnan.edu.cn。

磷脂是一种重要的生物代谢活性物质,根据其来源,可分为动物磷脂以及植物磷脂,植物磷脂主要来源于油料作物中,大部分以结合态的形式存在^[1]。各种油料种子中的磷脂含量差异较大,其中主要存在的磷脂为磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺

(PE)、磷脂酰肌醇(PI)及磷脂酸(PA)4类^[2]。磷脂的常用分析方法有高效液相色谱(HPLC)^[3]、薄层色谱(TLC)^[4]、质谱(MS)^[5]、液质联用(LC-MS)^[6]及核磁共振(NMR)^[7]等,其中HPLC是目前最常用的方法,而紫外检测器(UV)和蒸发光检测器(ELSD)是常用的检测器。蒸发光检测器相对具有更高的灵敏度,并且适用于梯度洗脱,使其在磷脂检测上得到了更广泛的应用^[8]。在HPLC-ELSD测定磷脂含量的常规过程中,从物料中提取出总脂肪后,常常需要通过柱层析^[9]、固相微萃取^[6,10]等方法进一步富集磷脂,步骤烦琐复杂,不仅延长了样品处理的时间,还会造成磷脂的部分损失,影响测定的准确性。

花生(*Arachis hypogaea* L.)又称落花生、地果和香果,属蔷薇目,豆科一年生草本植物。花生除了富含丰富的油脂和蛋白质以外还含有功能性成分磷脂。目前,国内外的研究主要集中在大豆磷脂^[11],对花生磷脂的研究较少^[12]。此外,现有的报道大多集中研究毛油中的磷脂含量,对油料作物本身的磷脂研究甚少,这在一定程度上限制了油料作物磷脂的合理应用。本研究以花生作为研究对象,将物料中的总脂肪提取后直接溶于流动相进行液相色谱分析,使用正己烷-异丙醇-乙酸铵溶液体系作为流动相进行梯度洗脱,将杂质与目标物磷脂有效分离,旨在为磷脂测定提供一种简便、有效、准确的分析方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

脱皮花生购自山东,海花一号。压榨花生油为实验室自制。

PC、PE、PI、PA标准品购于美国Sigma公司;正己烷、异丙醇为色谱纯;氯仿、甲醇、乙酸铵、氯化钠、氯化钙等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

DFY-500 摇摆式高速中药粉碎机,浙江林大机械公司;TGL-16M 冷冻离心机,上海卢湘离心机仪器公司;RV 10 旋转蒸发仪,德国 IKA 公司;KQ5200DE 超声波清洗机,昆山市超声仪器公司;Waters 1525 二元高压液相色谱系统;L-Si 型正相硅胶色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),淮安月泽科技有限公司;Alltech 3300 蒸发光检测器。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备

1.2.1.1 总脂肪的提取

总脂肪的提取根据 Folch 等^[13]的方法稍作改进。将样品使用高速中药粉碎机进行粉碎。取适量

样品,以料液比 1:10 与氯仿-甲醇(体积比 2:1)溶液混合,300 r/min 搅拌 1 h,超声提取 30 min 后将混合液 5 000 r/min 离心 10 min,下层有机层通过中速定量滤纸过滤,收集滤液。向上层加入体积为氯仿-甲醇溶液一半的氯仿,300 r/min 搅拌 1 h,超声提取 30 min 后将混合液 5 000 r/min 离心 10 min,下层有机层通过中速定量滤纸过滤,收集滤液。将两次的滤液合并至分液漏斗中,加入 1/10 体积的氯化钠和氯化钙混合溶液(氯化钠 7.3 g/L,氯化钙 0.5 g/L),振荡 1 min 后静置过夜,收集下层氯仿层,于 45℃ 真空旋转蒸发至干,记录称重,即可得到物料总脂肪。

1.2.1.2 氨基固相萃取柱提取净化

氨基固相萃取柱提取净化过程依据 GB 5009.272—2016《食品安全国家标准 食品中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇的测定》。准确称取总脂肪约 5 g(精确至 1 mg)于 100 mL 具塞试管中,加入 50.0 mL 氯仿后旋涡混合。1.0 mL 氯仿活化氨基固相萃取柱(CNW,NH₂,6 mL)后,将 10.0 mL 的油脂氯仿溶液转移到氨基固相萃取柱中,用 2.0 mL 氯仿-异丙醇混合溶液(体积比 2:1)和 3.0 mL 的乙酸-乙醚混合溶液(体积比 2:144)洗脱小柱,然后用 3.0 mL 甲醇洗脱磷脂,再重复 4 次并收集洗脱液。氮气吹干后加入 5 mL 正己烷-异丙醇(体积比 2:3)溶剂,4 000 r/min 下离心 5 min 后取上清液备用。

1.2.1.3 硅胶固相萃取柱提取净化

硅胶固相萃取柱提取净化参照 Avalli 等^[10]的报道。准确称取总脂肪约 1 g(精确至 1 mg),向其中加入 5 mL 氯仿-甲醇(体积比 2:1),涡旋振动 3 min 使其充分溶解后上样于硅胶 SPE 小柱(CNW, Si,6 mL)。5 mL 正己烷淋洗后分别用 3 mL 正己烷-乙醚(体积比 8:2)以及 3 mL 正己烷-乙醚(体积比 1:1)洗脱杂质。随后先用 4 mL 的甲醇洗脱 4 次;再用 4 mL 甲醇和 2 mL 氯仿-甲醇-水(体积比 3:5:2)洗脱 4 次,将含有磷脂的洗脱液依次收集,在 40℃ 下旋转蒸发至干,再加入正己烷-异丙醇(体积比 2:3)5 mL,充分溶解后过 0.22 μm 滤膜备用。

1.2.1.4 直接进样测定

精确称取约 1 g 的总脂肪(精确至 1 mg)于 10 mL 容量瓶中,加入正己烷-异丙醇(体积比 2:3)充分混合溶解并定容,使用前用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤。

1.2.2 样品的检测

L-Si 正相硅胶色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),采用二元梯度洗脱,流动相 A 为正己烷-异丙醇(体积比 2:3),流动相 B 为正己烷-异丙

醇-25 mmol/L 乙酸铵溶液(体积比3.6:5.4:1),洗脱流速为1.0 mL/min,柱温30℃。梯度洗脱程序如表1所示。蒸发光检测器以空气作为雾化载气,空气载量2.1 L/min,漂移管温度55℃,增益4。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%	时间/min	A/%	B/%
0.0	100	0	45.00	0	100
10.00	100	0	60.00	0	100
20.00	40	60	65.00	100	0
35.00	30	70	75.00	100	0

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 流动相的选择

将磷脂混合标准品溶液作为供试品,采用直接进样 HPLC-ELSD 方法考察不同流动相体系(氯仿-甲醇-氨水、正己烷-异丙醇-水、正己烷-异丙醇-乙酸铵溶液)对4种磷脂分离度以及灵敏度的影响。结果表明:使用氯仿-甲醇-氨水体系会造成高效液相色谱仪当中的一些高分子聚合材料发生溶解腐蚀残留在流动相中,造成检测器响应值过高,无法进行测定;而使用正己烷-异丙醇-水体系能够对各组分进行有效的分离,但是会伴随有峰形拖尾的情况发生,影响准确定量。采用正己烷-异丙醇-乙酸铵溶液体系为流动相分离效果较好,4种磷脂之间达到基线分离。

2.1.2 检测器参数的选择

蒸发光检测器漂移管温度和气体载量也会对检测结果产生影响^[14]。将磷脂混合标准品溶液作为供试品,采用直接进样 HPLC-ELSD 方法分别考察

漂移管温度(45、55、65℃)和空气载量(1.8、2.1、2.4 L/min)对检测结果的影响。结果表明:当漂移管温度低于55℃时,流动相挥发不充分,基线水平高,当漂移管温度高于55℃时,噪音干扰比较严重;而当空气载量增大时,响应值也会随之减小。综合考虑,最终选择漂移管温度55℃、空气载量2.1 L/min,此时基线平稳,噪音较小,响应值适宜。

2.2 标准曲线验证结果

ELSD 的进样量与响应值之间的对应关系比较复杂,一般认为,样品浓度较低时,在较窄的浓度范围内,进样量与峰面积呈现线性关系^[9],而在多数情况下,进样量与输出信号不呈线性规律^[15],进样量与峰面积之间会呈现单对数或者双对数关系^[16]。

PC 在 0.048 ~ 1.54 mg/mL、PE 在 0.048 ~ 1.13 mg/mL、PI 在 0.036 ~ 1.16 mg/mL、PA 在 0.031 ~ 1.00 mg/mL 的质量浓度范围内进行梯度稀释,经 0.22 μm 孔径的有机相滤膜过滤后进行液相色谱分析,标准溶液液相色谱图见图1。以标准物质量浓度为 x ,峰面积为 y ,取 $y = ax + b$ 线性关系模型和 $\log y = a \log x + b$ 双对数关系模型分别进行拟合,磷脂标准曲线方程及相关系数见表2。

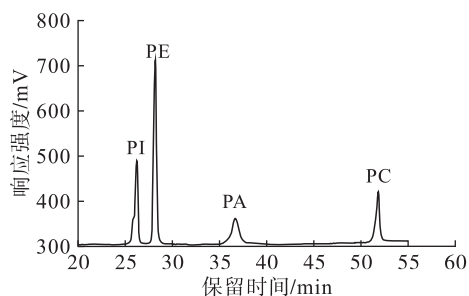


图1 标准溶液液相色谱图

表2 磷脂标准曲线方程及相关系数

磷脂	$y = ax + b$		$\log y = a \log x + b$	
	线性方程	R^2	线性方程	R^2
PC	$y = 20\ 946\ 394x - 2\ 692\ 214$	0.993 3	$\log y = 1.258 \log x + 16.52$	0.995 2
PE	$y = 37\ 809\ 869x - 5\ 320\ 734$	0.987 1	$\log y = 1.581 \log x + 17.14$	0.996 0
PI	$y = 861\ 781\ 7x - 197\ 446$	0.997 9	$\log y = 1.230 \log x + 16.01$	0.995 3
PA	$y = 8\ 146\ 789x - 369\ 013$	0.990 6	$\log y = 1.251 \log x + 15.88$	0.998 9

由图1可知,PI、PE、PA、PC 4种磷脂分离效果较好。由表2可知,双对数关系模型较线性关系模型能够更好地拟合进样质量浓度与峰面积之间的关系,4种磷脂的线性相关系数均大于0.995,由此选择双对数关系模型作为磷脂定量的标准曲线。

2.3 不同预处理方法的比较

为避免取样不均匀及样品制备过程所可能带来的误差,将压榨花生油作为研究对象比较不同预处

理方法对磷脂富集回收的效果,不同预处理方法测定压榨花生油磷脂含量见表3。

表3 不同预处理方法测定压榨花生油磷脂含量 mg/g

预处理方法	PI	PE	PA	PC
氨基固相萃取柱	0.05 ± 0.01	0.90 ± 0.21	ND.	1.26 ± 0.20
硅胶固相萃取柱	0.42 ± 0.11	0.34 ± 0.08	ND.	0.95 ± 0.14
直接进样	0.83 ± 0.04	1.01 ± 0.06	ND.	1.95 ± 0.07

由表3可知,氨基固相萃取柱对PE和PC的富

集效果较好,对 PI 的回收率极低,检测到的 PI 含量为 (0.05 ± 0.01) mg/g,仅为直接进样法的 6%,可能是由于 PI 作为酸性磷脂,其会带有一定的负电荷^[17],从而与氨基官能团产生一定的排斥作用,导致氨基固相萃取柱对 PI 的吸附不强,在洗脱杂质过程中容易脱附,进而富集效果不佳。硅胶固相萃取柱虽然对各种磷脂都能够进行富集,检测到的 PI、PE 及 PC 含量分别为 (0.42 ± 0.11) 、 (0.34 ± 0.08) mg/g 和 (0.95 ± 0.14) mg/g,但是回收率都不是很高,分别为直接进样法检出量的 50.6%、33.7% 和 48.7%,可能是由于磷脂通过氢键和偶极相互作用被固定相牢牢吸附^[10],难以洗脱下来。采用直接进样法检测得到的磷脂含量最高,PI、PE 及 PC 含量分别为 (0.83 ± 0.04) 、 (1.01 ± 0.06) mg/g 和 (1.95 ± 0.07) mg/g。由此可见,采用直接进样的方法不仅节省时间、方便操作,同时还能够减少磷脂的损失,便于准确定量。

2.4 方法学验证

2.4.1 重现性实验

取同一样品 6 份,按照 1.2.1.1 和 1.2.1.4 制备样品溶液,按照 1.2.2 条件进行测定,分别测得 4 种磷脂的峰面积,计算 PC、PE、PI 和 PA 峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 4.06%、4.78%、3.56%、1.93%,6 个样品的 RSD 均小于 10.0%,表明该方法有良好的重现性。

2.4.2 稳定性实验

精密吸取按照 1.2.1.1 和 1.2.1.4 制备的同一样品溶液,分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样检测样品中的磷脂含量,结果在测定的 12 h 内,PI 峰面积 RSD 为 2.84%,PE 峰面积 RSD 为 3.54%,PA 峰面积 RSD 为 3.41%,PC 峰面积 RSD 为 1.33%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.4.3 回收率实验

精确称取 2.0 g 左右已测定出磷脂含量的样品 9 份,分成 3 组,每组 3 份,于 3 组中分别精密加入质量浓度为 1.00 mg/mL 的 PI 标准溶液 2、5、10 mL,质量浓度为 1.25 mg/mL 的 PE 标准溶液 2、5、10 mL,质量浓度为 1.00 mg/mL 的 PA 标准溶液 2、5、10 mL,质量浓度为 1.00 mg/mL 的 PC 标准溶液 2、5、10 mL,按照 1.2.1.1 和 1.2.1.4 处理样品后,经 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤,作为供试品溶液测定磷脂含量,进样量为 20 μ L。PI、PE、PA、PC 在 3 个不同添加水平下的回收率结果见表 4~表 7。

表 4 PI 回收率实验测定结果

本底值/ (mg/mL)	加标量/ (mg/mL)	测定值/ (mg/mL)	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/%
0.718 1	0.2	0.899 1	90.50		
0.698 0	0.2	0.877 8	89.90		
0.725 5	0.2	0.914 4	94.45		
0.704 5	0.5	1.131 1	85.32		
0.723 7	0.5	1.162 0	87.66	93.59	6.08
0.717 2	0.5	1.179 5	92.46		
0.718 6	1	1.707 1	98.85		
0.724 2	1	1.716 5	99.23		
0.725 4	1	1.765 2	103.98		

表 5 PE 回收率实验测定结果

本底值/ (mg/mL)	加标量/ (mg/mL)	测定值/ (mg/mL)	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/%
0.334 2	0.25	0.626 6	116.96		
0.324 8	0.25	0.564 7	95.96		
0.337 6	0.25	0.638 9	120.52		
0.327 9	0.625	1.030 7	112.45		
0.336 8	0.625	1.028 3	110.64	108.57	8.06
0.333 8	0.625	1.033 5	111.95		
0.334 4	1.25	1.655 0	105.64		
0.337 0	1.25	1.579 8	99.42		
0.337 6	1.25	1.632 1	103.56		

表 6 PA 回收率实验测定结果

本底值/ (mg/mL)	加标量/ (mg/mL)	测定值/ (mg/mL)	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/%
0.079 6	0.2	0.265 9	93.15		
0.077 4	0.2	0.288 0	105.30		
0.080 5	0.2	0.272 4	95.95		
0.078 1	0.5	0.558 7	96.12		
0.080 3	0.5	0.579 1	99.76	98.66	3.67
0.079 5	0.5	0.566 3	97.36		
0.079 7	1	1.106 3	102.66		
0.080 3	1	1.063 0	98.27		
0.080 5	1	1.074 5	99.40		

表 7 PC 回收率实验测定结果

本底值/ (mg/mL)	加标量/ (mg/mL)	测定值/ (mg/mL)	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/%
1.681 9	0.2	1.875 6	96.85		
1.670 5	0.2	1.896 5	113.00		
1.699 2	0.2	1.928 3	114.55		
1.668 7	0.5	2.199 4	106.14		
1.654 9	0.5	2.151 2	99.26	104.10	7.10
1.679 8	0.5	2.156 8	95.40		
1.683 0	1	2.666 1	98.31		
1.696 1	1	2.787 0	109.09		
1.699 0	1	2.742 3	104.33		

由表 4~表 7 可知,3 个不同添加水平下样品中的 PI、PE、PA、PC 平均回收率分别为 93.59%、

108.57%、98.66%、104.10%，相对标准偏差(RSD)均小于10%。

2.5 样品测定

采用直接进样 HPLC - ELSD 法对海花一号花生样品中磷脂含量进行测定,结果见图 2。由图 2 可知,采用该方法可以分离出花生样品中的 PI、PE、PA、PC 4 种磷脂,分离效果良好,同时不会受杂质峰的干扰。

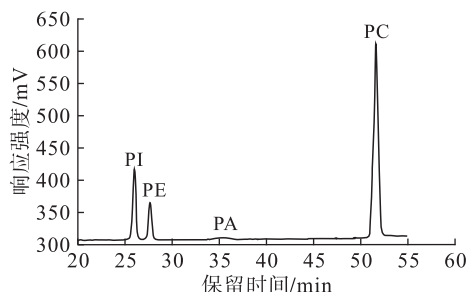


图 2 花生样品的液相色谱图

海花一号花生样品中的磷脂含量见表 8。由表 8 可知,海花一号花生样品中的磷脂含量根据其批次的不同略有差异。其中,PC 含量最高,两批样品分别为 3.93、4.26 mg/g;PA 含量最低,两批样品分别为 0.18、0.14 mg/g。

表 8 不同批次海花一号花生磷脂含量 mg/g

批次	PI	PE	PA	PC
2016.10	1.65 ± 0.11	0.75 ± 0.05	0.18 ± 0.00	3.93 ± 0.23
2016.12	1.99 ± 0.25	0.79 ± 0.05	0.14 ± 0.00	4.26 ± 0.35

3 结论

本文建立了一种对花生中的 PI、PE、PA、PC 4 种磷脂同时定量测定的 HPLC - ELSD 方法,该方法简便、灵敏、准确,采用改良的 Folch 方法提取出样品中的总脂肪后,将其溶解于流动相中,无需进一步对磷脂富集纯化处理,即可对磷脂含量进行测定,节省时间的同时也避免了额外操作给实验带来的误差。该方法线性关系良好,4 种磷脂色谱峰面积与其质量浓度的线性相关系数(R^2)大于 0.995,4 种磷脂的平均回收率在 93.59% ~ 108.57% 之间,RSD 在 10% 以下。该方法达到了定量分析相关要求,表明该方法适合于磷脂含量的分析测定,可将其推广至其他油料作物磷脂含量的测定。

参考文献:

[1] 曹栋,裴爱泳,王兴国. 磷脂结构、性质、功能及研究现状(1)[J]. 粮食与油脂,2004(5):3-6.
 [2] 蒋晓菲. 磷脂对食用油品质的影响及酶法脱胶技术的研究[D]. 江苏无锡:江南大学,2015.
 [3] CARELLI A A, MIV B, CRAPISTE G H. Quantitative de-

termination of phospholipids in sunflower oil[J]. J Am Oil Chem Soc,1997,74(5):511-514.

- [4] 古再丽努尔·阿尔肯,刘然,侯俊峰,等. 基于高效薄层色谱法的胡麻卵磷脂质量分析[J]. 食品科学,2014,35(16):160-164.
 [5] 王友谊,张虹,戴志远. 直接进样电喷雾串联质谱法测定草鱼肌肉组织中磷脂[J]. 分析化学,2012,40(6):893-898.
 [6] HERCHI W, SAKOUHI F, KHALED S, et al. Characterisation of the glycerophospholipid fraction in flaxseed oil using liquid chromatography - mass spectrometry [J]. Food Chem,2011,129(2):437-442.
 [7] 庞思勉,张明霞,姬红萍,等. ^{31}P 核磁共振光谱法测定坚果类食品中的 6 种磷脂[J]. 理化检验 - 化学分册,2016,52(1):44-47.
 [8] RODRÍGUEZALCALÁ L M, FONTECHA J. Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(18):3063-3066.
 [9] 朱瑶,陈慧民,卢航,等. 刺参性腺中 6 种磷脂含量的 HPLC - ELSD 分析[J]. 大连海洋大学学报,2015,30(4):422-425.
 [10] AVALLI A, CONTARINI G. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD[J]. J Chromatogr A,2005,1071(1/2):185-190.
 [11] 袁利鹏,刘波,熊波,等. 大豆磷脂的制备、功能特性及行业应用研究进展[J]. 中国酿造,2013,32(5):13-15.
 [12] 徐同成,李渐鹏,杜方岭,等. 响应曲面法优化花生磷脂提取工艺的研究[J]. 山东农业科学,2015(12):91-95.
 [13] FOLCH J, LEES M, STANLEY G H S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. J Biol Chem,1957,226:497-509.
 [14] 王巧娥,丁明玉. 蒸发光散射检测技术研究进展[J]. 分析测试学报,2006,25(6):126-132.
 [15] 田南卉,杨国红,方颖,等. 高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定黄芪和制剂中黄芪甲苷的含量[J]. 药物分析杂志,2000(3):199-200.
 [16] 蔡靳,惠伯棣. 蒸发光散射检测器在叶黄素 HPLC 定量分析中的应用[J]. 食品科学,2008,29(10):508-511.
 [17] SCHILLER J, SÜSS R, ARNHOLD J, et al. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research[J]. Prog Lipid Res,2004,43(5):449.