

UPLC-Triple-TOF-MS/MS 法分析中国东北地区人乳磷脂的组成

何扬波¹, 龙明秀¹, 刘宁², 李咏富¹

(1. 贵州省现代农业发展研究所, 贵州贵阳 550006) (2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 借助超高效液相色谱联用质谱(UPLC-Triple-TOF-MS/MS)分析法, 对不同泌乳期人乳中的磷脂进行定性和相对定量, 为中国乳脂组成的研究提供参考。本研究从哈尔滨(黑龙江省)、齐齐哈尔(黑龙江省)和吉林(吉林省)地区采集到汉族人初乳(1~5 d)、过渡乳(6~20 d)和成熟乳(21 d~)共计 73 份。LipidView 1.2 用于检索磷脂分子式, PeakView 2.2 及其插件 MasterView 1.1 用于磷脂定性分析, MultiQuant 用于磷脂相对定量分析(基于色谱峰面积)。结果显示, 人乳中检出磷脂共计 60 种。其中, 磷脂酰胆碱(PC)17 种, 磷脂酰乙醇胺(PE)25 种, 磷脂酰丝氨酸(PS)4 种, 磷脂酰肌醇(PI)5 种, 鞘磷脂(SM)9 种。磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、鞘磷脂(SM)、磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰肌醇(PI)在总磷脂中的相对含量分别为 38.12%、26.97%、29.54%、4.43%和 0.94%, 各种磷脂的相对含量随泌乳期变化表现出不同的变化趋势, 但大多数磷脂的相对含量差异并不显著。

关键词: 人乳; 磷脂; 液相色谱-质谱; 泌乳期

文章编号: 1673-9078(2017)7-270-279

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.038

UPLC-Triple-TOF-MS/MS Analysis of the Phospholipid Composition of Human Milk from the Northeast Regions of China

HE Yang-bo¹, LONG Ming-xiu¹, LIU Ning², LI Yong-fu¹

(1. Guizhou Research Institute of Modern Agricultural Development, Guiyang 550006, China)

(2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Ultra-performance liquid chromatography coupled with hybrid triple quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Triple-TOF-MS/MS) was used for the qualitative and relative quantitative analysis of phospholipids in human milk during different lactation periods, and to provide a reference for the analysis of phospholipid composition of milk from Chinese women. A total of 73 human milk samples including colostrum (1~5 d), transitional milk (6~20 d), and mature milk (after 21 d) were collected from Harbin (Heilongjiang province), Qiqihar (Heilongjiang province), and Jilin (Jilin province). LipidView 1.2, PeakView 2.2 with MasterView™ 1.1 plugin, and MultiQuant™ were used for the molecular formula search, qualitative analysis, and relative quantitative analysis of phospholipids, respectively. Sixty species of phospholipids were identified in the milk samples, and the numbers of phosphatidylcholines (PCs), phosphatidylethanolamines (PEs), phosphatidylserines (PSs), phosphatidylinositols (PIs), and sphingomyelins (SMs) were 17, 25, 4, 5, and 9, respectively. The relative contents of PCs, PEs, SMs, PSs, and PIs in the total phospholipids were 38.12%, 26.97%, 29.54%, 4.43%, and 0.94%, respectively. In addition, the relative contents of the various phospholipids varied with the lactation period, although the changes in the relative contents of most phospholipids were not significant.

Key words: human milk; phospholipid; liquid chromatography-mass spectrometry; lactation period

收稿日期: 2016-11-10

基金项目: 特色农产品辐照保鲜技术服务企业行动计划(黔科合平台人才[2016]5712 号); 贵州省特色农产品辐照保鲜与加工工程技术研究中心(2016GZ67305)

作者简介: 何扬波(1990-), 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 食品安全与乳制品加工

通讯作者: 李咏富(1985-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 农产品质量与食品安全

磷脂(Phospholipid, PL)是一类存在于生物界的含磷脂质, 其由甘油或鞘氨醇、脂肪酸、磷酸和含氮化合物等组成, 分为甘油磷脂(Glycerophospholipids)和鞘磷脂(Sphingophospholipid, 也称 Sphingomyelin, SM)两大类, 是构成细胞基本结构的必需物质。磷脂具有一定的生理功能, 诸如抗氧化、抗菌和抗病毒等^[1,2]; 在食品工业方面, 磷脂也可以和蛋白结合, 用作食品乳化剂和稳定剂^[3-6]。

乳中磷脂的含量约占总脂的 0.5~1.0%^[7]。大约 60~65%的磷脂都位于乳脂质球膜上,余下的 35~40%则在水相中与溶液中的蛋白或者膜片段相连^[8,9]。乳中主要的磷脂种类有磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholine, PC)、鞘磷脂(Sphingomyelin, SM)、磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol, PI)和磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS),它们在乳中所占的比例分别为:磷脂酰乙醇胺(PE)30%,磷脂酰胆碱(PC)35%,鞘磷脂(SM)25%,磷脂酰肌醇(PI)5%,磷脂酰丝氨酸(PS)3%^[10~13]。整体来说,磷脂酰乙醇胺(PE),磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂(SM)是乳汁中含量最多的磷脂种类,且每种磷脂约占磷脂总量 30%的结论已经得到了大家的验证和认可^[14,15]。磷脂结构纷繁复杂,磷脂分析的手段也经历从薄层色谱到高效液相色谱再到液相色谱联用质谱技术的过程。然而,由于技术水平和费用消耗等因素的制约,人乳中磷脂组成的研究多数还停留在借助液相色谱联用蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)的阶段^[16],用超高效液相色谱联用质谱的方法来分析人乳中磷脂组成还比较少见^[17]。

在本研究中,我们运用 UPLC-TripleTOF-MS/MS(ABSCIEX)液质联用技术对人乳中的磷脂进行定性和相对定量分析,从人乳中检出 60 种磷脂并系统地阐释了它们随泌乳期动态变化的趋势。本研究内容不仅对某区域人乳的磷脂组成特点进行了分析,还为后续人乳中磷脂组学的研究提供了方法学参考,也给我们婴幼儿配方奶粉的磷脂调配提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

甲醇(分析纯/色谱纯)、二氯甲烷(分析纯)、氯化钠、异丙醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、醋酸铵(色谱纯)、磷脂标品储备液(取磷脂酰胆碱(16:0 PC [DPPC])、磷脂酰乙醇胺(16:0 PE)、磷脂酰丝氨酸(18:2 PS)、磷脂酰肌醇(18:0-20:4 PI)、鞘磷脂[16:0 SM (d18:1/16:0)]适量,溶于氯仿/甲醇(2:1)混合溶剂中配制成浓度均为 1 mg/mL 的标准储备液)。

1.2 仪器与设备

漩涡混合器、旋转蒸发仪(ZFQ85B)、离心机(80-2)、超纯水系统(Milli Q Biocel)、液相色谱仪(Acquity, Ultra Performance LC)、液相色谱柱(ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μm, 2.1×100 mm)、质谱仪(Triple TOF TM 5600⁺)。

1.3 实验方法

1.3.1 脂质提取

脂质提取参考 Folch 法^[18]并做微调,具体如下:取人乳 0.2 mL,经离心富集乳脂质球后向其中加入 4.0 mL 的二氯甲烷/甲醇(2/1, V/V)混合溶剂,之后再加入 0.2 倍体积的质量分数为 0.9%的氯化钠溶液(氯化钠阻断了某些酸性脂质和变性脂质的结合),旋混数秒,4000 r/min 离心 10 min。静置分层后将有机相转移至螺口玻璃管中。之后再向水相中加入 4.0 mL 的二氯甲烷/甲醇(2/1, V/V)混合溶剂,重复上述操作 2 次,合并有机相并将其转移至旋转蒸发瓶。40 °C、100 r/min 条件下蒸发除去有机溶剂,余下的组分复溶于 1.0 mL 的色谱级氯仿/甲醇(2/1, V/V)混合溶剂中,经 0.22 μm 滤膜过滤后置于 1.0 mL 进样瓶中氮气保护存放(-20 °C),等待进样分析。

1.3.2 液相色谱条件

样品在超高效液相色谱仪(Waters, ACQUITY UPLC)上进行分离,色谱柱为 ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 μm; 美国 Waters 公司),进样量为 5 μL,流动相包括 A 相和 B 相,其中 A 相为水/甲醇/乙腈(1:1:1, V/V/V)混合溶剂(含有 2 mM 乙酸铵);B 相为异丙醇/乙腈(1:1, V/V)混合溶剂(含有 2 mM 乙酸铵)。流动相的流速为 0.3 mL/min,柱温为 50 °C。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 磷脂分析的梯度洗脱表

Table 1 Gradient conditions for phospholipid analysis

时间/min	A/%	B/%
0.0	80	20
1.0	80	20
6.0	20	80
10.0	5	95
12.0	5	95
12.1	80	20
15.0	80	20

1.3.3 质谱条件

正离子模式:离子源喷雾电压(IS)为 5500 V,离子源温度(TEM)为 400 °C,解簇电压(DP)为 100 V,离子源气体 1 和 2 的气压均为 55 psi,气帘气压强为 35 psi,扫描范围为 200~1000 u。

负离子模式:离子源喷雾电压(IS)为-4500 V,离子源温度(TEM)为 400 °C,解簇电压(DP)为-100 V,离子源气体 1 和 2 的气压均为 55 psi,气帘气压强为 35 psi,扫描范围为 50~1000 u。

1.3.4 磷脂实验方法考察

(1) 灵敏度实验: 混合各储备液, 得到除磷脂酰胆碱(PC)的浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 外, 其他标准品的浓度各为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准体系。10 倍稀释得到系列梯度 (PC 浓度范围为 0.000002~20 $\mu\text{g/mL}$, 其余标品的独立浓度范围为 0.000001~10 $\mu\text{g/mL}$)。将信噪比 $S/N \geq 3$ 时的标准品浓度作为待测化合物的最低检测浓度(LOD), 记录当时的 S/N 值。

(2) 仪器精密度: 取 5 种磷脂标准品混合溶液 (除磷脂酰胆碱(PC)的浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 外, 其他标准品的独立浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$), 连续进样 6 次, 记录各标品色谱峰保留时间并提取离子色谱峰峰面积, 计算各标品的 RSD (%) 值。

(3) 组内精密密度: 取人乳样品, 经过实验中所述的样本前处理方法进行制备, 平行 3 份, 分别于 4、8 和 12 h 进行超高效液相色谱质谱分析。

(4) 组间精密密度: 取人乳样品经前述预处理方法进行制备, 3 份平行, 连续测定 5 d。

(5) 回收率: 取 5 种标准品储备液, 混合后分别稀释得各磷脂标准品浓度至 0.01 mg/mL 、0.001 mg/mL 和 0.0001 mg/mL 的 3 个浓度梯度。分别设置实验组和空白组, 实验组在处理前加入指定浓度混合标准品, 经前处理提取脂质并进样分析。空白组中加入等量超纯水, 经前处理提取脂质并进样分析。每个样品重复 3 次, 记录各目标色谱峰保留时间并提取离子色谱峰峰面积。

1.3.5 统计分析

初乳期、过渡期和成熟期里人乳中各磷脂皆以占总磷脂百分比的形式表示, 结果表示为平均数(mean) $\pm$ 标准差(SD), 数据之间的差异显著性采用方差分析中的单因素方差分析, 在 95% 的置信度下检验测定结果间的差异性。

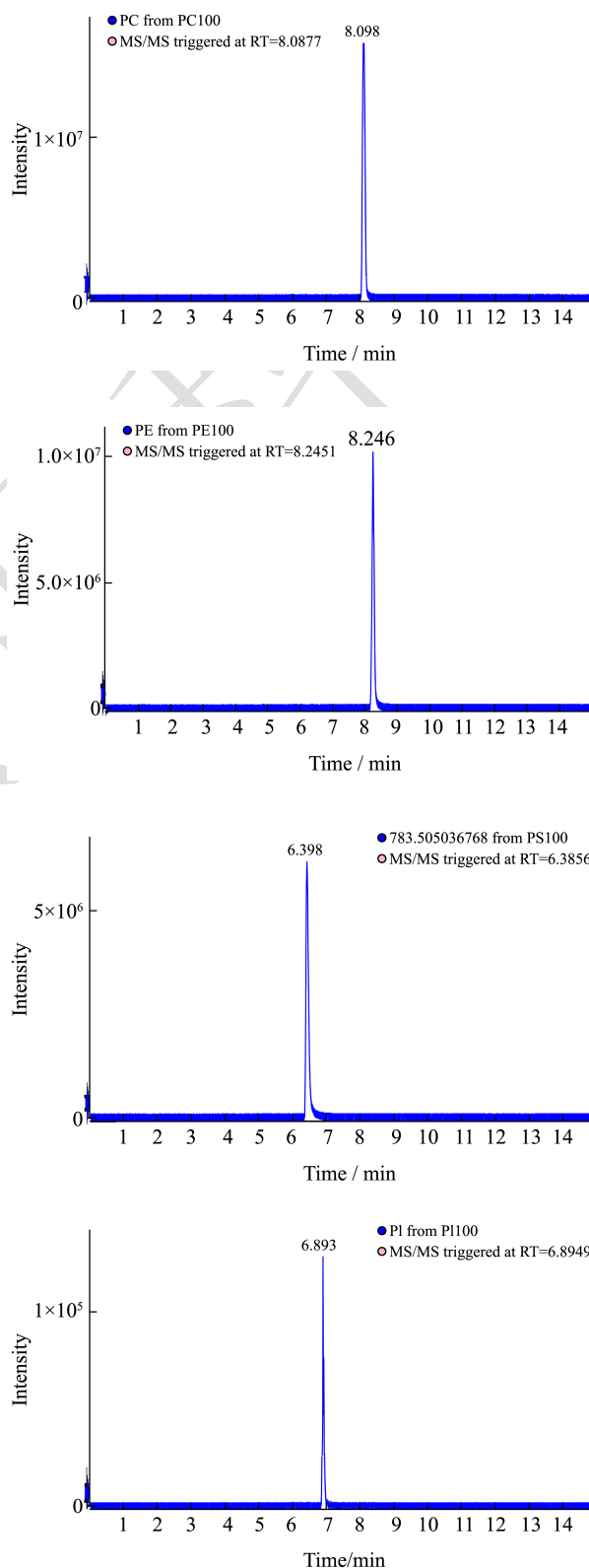
2 结果与讨论

2.1 磷脂组学分析的方法验证

2.1.1 磷脂标准品的预运行

超高效液相色谱(Waters)联用飞行时间质谱仪(ABSCIEX)(UPLC-Triple-TOF-MS/MS)被用于人乳样品中磷脂的定性和相对定量分析。仪器对磷脂标准品分析后得到的离子色谱图如图 1。磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)和鞘磷脂(SM)在正离子模式下被检测到有较高的离子强度。与负离子模式相比, 磷脂酰肌醇(PI)在正离子模式下的响应较低。因此, 本研究在正负离子条件下同时对数据进行采集, 而后分别取磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺

(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)和鞘磷脂(SM)的正离子, 磷脂酰肌醇(PI)的负离子模式进行数据分析。由图 1 可知, 各磷脂标准品在所选定条件下均得到有效分离, 且峰型上无拖尾等不良峰型存在, 峰型较好。表明所选实验参数针对样品中磷脂的分离具有良好效果, 可以用于样品分析和检测。



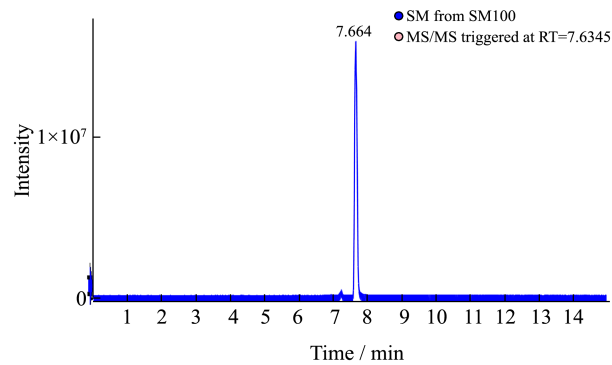


图 1 5 种磷脂的提取离子色谱图(XIC 图)

Fig.1 Extracted ion chromatograms of the five PL standards

2.1.2 方法灵敏度及精密度

为了进一步对实验方法的可靠性进行验证，特对

表 2 分析方法的仪器精密度验证

Table 2 Validation results of instrument precision for the analytical methods

名称	检测模式	信噪比	仪器精密度 RSD/%
PC(16:0/16:0)	ESI (+)	72	3.16
PE(16:0/16:0)	ESI (+)	10	1.13
PS(18:2(9Z, 12Z)/18:2(9Z, 12Z))	ESI (+)	32	3.67
PI(18:0~20:4)	ESI (-)	43	9.17
SM(16:0)	ESI (+)	8	3.48

表 3 分析方法的组内和组间精密度验证

Table 3 Validation results of intra-batch and inter-batch precisions for the analytical methods

名称	检测模式	组内精密度 RSD/%	组间精密度 RSD/%
PC(34:0)	ESI (+)	4.91	1.15
PE(16:0/16:0)	ESI (+)	6.90	7.44
PS (36:2)	ESI (+)	3.92	2.80
PI(18:0~20:4)	ESI (-)	14.58	12.47
SM(36:1;2)	ESI (+)	1.02	2.20

2.1.3 回收率

结果显示，5 种磷脂的在加标浓度为 0.01 mg/mL 的条件下回收率为 87.34%~110.41%之间，加标浓度为 0.001 mg/mL 的条件下回收率为 87.32%~105.30%之

方法的灵敏度、仪器精密度、组内精密度和组间精密度进行了考察，具体结果分别详见表 2 和表 3。实验过程中发现，人乳样品中未检测到标品中的 PS [18:2(9Z, 12Z)/18:2(9Z, 12Z)和 SM(16:0)]，故而在组内和组间精密度实验中将观测目标选定为 PS(36:2)和 SM(32:1;2)。结果表明，在所选用的实验条件下，仪器对于几种磷脂的检测具有较高的灵敏度 (LOD 介于 0.01~0.02 ng 之间)，此时的 S/N 值记录如表 2。5 种磷脂标准品和样品中目标观测物的提取离子色谱峰面积的 RSD%值均小于 15%，表明本方法精密度良好。同时，根据组内精密度和组间精密度的结果显示，本研究具有较好的稳定性和重复性。

间，加标浓度为 0.0001 mg/mL 的条件下回收率为 89.31%~112.77%之间，该范围处于微量仪器分析所要求的 80%~120%之间，故而认为该脂质提取方法能够满足磷脂分析的要求。

表 4 磷脂提取方法的回收率

Table 4 Recovery of phospholipid extraction

名称	回收率/%		
	0.01 mg/mL	0.001 mg/mL	0.0001 mg/mL
PC(16:0/16:0)	108.02±3.25	105.30±2.74	110.05±4.23
PE(16:0/16:0)	94.52±2.11	91.22±1.66	98.18±2.45
PS(18:2(9Z, 12Z)/18:2(9Z, 12Z))	89.04±2.54	87.32±2.03	89.31±2.42
PI(18:0~20:4)	87.34±4.01	88.21±3.07	90.66±2.65
SM(16:0)	99.60±1.28	94.12±1.95	95.12±2.04

2.2 人乳中磷脂的定性分析

根据 Murphy 等^[19]综述的磷脂母离子、特征离子

以及中性丢失等的鉴定原则，对初乳期、过渡期和成熟期共计 73 份乳样进行分析，在质量精度低于 5×10^{-6} 的条件下，人乳中能够被定性的磷脂有 60 种。其中，

磷脂酰胆碱(PC)(包括溶血性磷脂酰胆碱(LPC)在内)17种, 磷脂酰乙醇胺(PE)25种, 磷脂酰丝氨酸(PS)4种, 磷脂酰肌醇(PI)6种, 鞘磷脂(SM)9种。跟 Liu^[20]等从牛乳中鉴定出的58种甘油磷脂和鞘磷脂相比, 人乳中磷脂酰丝氨酸(PS)和鞘磷脂(SM)的种类分别为4种和9种, 少于牛乳中的8种和17种; 但是人乳中磷脂酰乙醇胺(PE)的种类更加丰富, 共检出25种, 该结果远大于牛乳中的7种; 磷脂酰胆碱(PC)方面也检出了PC 38:4、PC O-34:1、PC O-34:3和PC O-36:4等在

牛乳中未检出的种类。另外, Paola 等^[21]对牛乳和驴乳中的磷脂进行过质谱分析, 发现了包括磷脂酰胆碱(PC)在内的22种甘油磷脂和鞘磷脂, 其中的磷脂酰胆碱(PC)在本研究中全部被发现, 但是牛乳和驴乳中的PE(C16:0/C18:1)、PS(C16:0/C16:0)、PS(C16:0/C18:1)、PS(C16:0/C18:0)和PI(C16:0/C18:2)、PI(C16:0/C18:1)以及SM(C18:1)等在本研究中并未检测到, 这需要在未来的研究中进一步确认和比较。磷脂酰肌醇(PI)的典型负离子模式的二级质谱图如图2所示。

表5 中国人乳中磷脂类别鉴定表

Table 5 List of PL species identified in human milk samples from Chinese women

磷脂	化学式	m/z(实验)	m/z(理论)	$\Delta(\times 10^{-6})$	加和离子	保留时间/min
PC 30:0	C ₃₈ H ₇₆ NPO ₈	705.5309	705.5315	-0.80	[M+H] ⁺	7.63
PC 32:0	C ₄₀ H ₈₀ NPO ₈	733.5622	733.5629	-1.00	[M+H] ⁺	8.16
PC 32:1	C ₄₀ H ₇₈ NPO ₈	731.5465	731.5471	-0.80	[M+H] ⁺	7.63
PC 32:3	C ₄₀ H ₇₄ NPO ₈	727.5152	727.5181	-4.00	[M+H] ⁺	7.62
PC 34:0	C ₄₂ H ₈₄ NPO ₈	761.5935	761.5940	-0.60	[M+H] ⁺	8.71
PC 34:1	C ₄₂ H ₈₂ NPO ₈	759.5778	759.5773	0.70	[M+H] ⁺	8.13
PC 34:2	C ₄₂ H ₈₀ NPO ₈	757.5622	757.5625	-0.40	[M+H] ⁺	7.68
PC 34:3	C ₄₂ H ₇₈ NPO ₈	755.5465	755.5495	-4.00	[M+H] ⁺	8.16
PC 36:1	C ₄₄ H ₈₆ NPO ₈	787.6091	787.6096	-0.60	[M+H] ⁺	8.68
PC 36:2	C ₄₄ H ₈₄ NPO ₈	785.5935	785.5941	-0.80	[M+H] ⁺	8.18
PC 38:4	C ₄₆ H ₈₄ NPO ₈	809.5935	809.5927	1.00	[M+H] ⁺	8.02
LPC 16:0	C ₂₄ H ₅₀ NPO ₇	495.3325	495.3326	-0.30	[M+H] ⁺	3.73
LPC 18:0	C ₂₆ H ₅₄ NPO ₇	523.3638	523.3633	1.00	[M+H] ⁺	4.92
LPC 18:2	C ₂₆ H ₅₀ NPO ₇	519.3325	519.3328	-0.50	[M+H] ⁺	3.19
PC O-34:1	C ₄₂ H ₈₄ NPO ₇	745.5985	745.5983	0.30	[M+H] ⁺	8.42
PC O-34:3	C ₄₂ H ₈₀ NPO ₇	741.5672	741.5681	-1.20	[M+H] ⁺	7.91
PC O-36:4	C ₄₄ H ₈₂ NPO ₇	767.5829	767.5837	-1.00	[M+H] ⁺	7.79
PE 34:0	C ₃₉ H ₇₈ NPO ₈	719.5465	719.5468	-0.40	[M+H] ⁺	8.87
PE 34:2	C ₃₉ H ₇₄ NPO ₈	715.5152	715.5156	-0.60	[M+H] ⁺	7.80
PE 36:1	C ₄₁ H ₈₀ NPO ₈	745.5622	745.5629	-0.90	[M+H] ⁺	8.84
PE 36:2	C ₄₁ H ₇₈ NPO ₈	743.5465	743.5470	-0.70	[M+H] ⁺	8.33
PE 36:3	C ₄₁ H ₇₆ NPO ₈	741.5309	741.5319	-1.30	[M+H] ⁺	7.79
PE 36:4	C ₄₁ H ₇₄ NPO ₈	739.5152	739.5180	-3.80	[M+H] ⁺	8.28
PE 36:5	C ₄₁ H ₇₂ NPO ₈	737.4996	737.5027	-4.20	[M+H] ⁺	7.80
PE 38:1	C ₄₃ H ₈₄ NPO ₈	773.5935	773.5938	-0.40	[M+H] ⁺	9.37
PE 38:2	C ₄₃ H ₈₂ NPO ₈	771.5778	771.5785	-0.90	[M+H] ⁺	8.80
PE 38:4	C ₄₃ H ₇₈ NPO ₈	767.5465	767.5470	-0.60	[M+H] ⁺	8.15
PE 38:5	C ₄₃ H ₇₆ NPO ₈	765.5309	765.5340	-4.00	[M+H] ⁺	8.33
PE 40:5	C ₄₅ H ₈₀ NPO ₈	793.5622	793.5633	-1.40	[M+H] ⁺	8.31
LPE 18:0	C ₂₃ H ₄₈ NPO ₇	481.3168	481.3167	0.20	[M+H] ⁺	5.02
LPE 18:1	C ₂₃ H ₄₆ NPO ₇	479.3012	479.3016	-0.90	[M+H] ⁺	3.94
LPE 18:2	C ₂₃ H ₄₄ NPO ₇	477.2855	477.2858	-0.60	[M+H] ⁺	3.28

转下页

接上页

LPE 20:1	C ₂₅ H ₅₀ NPO ₇	507.3325	507.3322	0.50	[M+H] ⁺	4.92
PE O-34:2	C ₃₉ H ₇₆ NPO ₇	701.5359	701.5366	-1.00	[M+H] ⁺	8.56
PE O-34:3	C ₃₉ H ₇₄ NPO ₇	699.5203	699.5212	-1.30	[M+H] ⁺	8.06
PE O-36:2	C ₄₁ H ₈₀ NPO ₇	729.5672	729.5677	-0.70	[M+H] ⁺	9.13
PE O-36:3	C ₄₁ H ₇₈ NPO ₇	727.5516	727.5517	-0.20	[M+H] ⁺	8.60
PE O-36:4	C ₄₁ H ₇₆ NPO ₇	725.5359	725.5364	-0.70	[M+H] ⁺	8.04
PE O-36:5	C ₄₁ H ₇₄ NPO ₇	723.5203	723.5203	0.00	[M+H] ⁺	7.87
PE O-37:3	C ₄₂ H ₈₀ NPO ₇	741.5672	741.5681	-1.20	[M+H] ⁺	7.91
PE O-38:5	C ₄₃ H ₇₈ NPO ₇	751.5516	751.5524	-1.00	[M+H] ⁺	8.40
PE O-40:5	C ₄₅ H ₈₂ NPO ₇	779.5829	779.5835	-0.80	[M+H] ⁺	8.77
PS 36:2	C ₄₂ H ₇₈ NPO ₁₀	787.5363	787.5372	-1.10	[M+H] ⁺	7.20
PS 38:4	C ₄₄ H ₇₈ NPO ₁₀	811.5363	811.5370	-0.90	[M+H] ⁺	10.60
PS 38:5	C ₄₄ H ₇₆ NPO ₁₀	809.5207	809.5238	-3.80	[M+H] ⁺	7.20
PS 40:5	C ₄₆ H ₈₀ NPO ₁₀	837.5520	837.5528	-1.00	[M+H] ⁺	7.23
PI 34:1	C ₄₃ H ₈₁ PO ₁₃	836.5415	836.5396	2.30	[M-H] ⁻	7.02
PI 36:1	C ₄₅ H ₈₅ PO ₁₃	864.5728	864.5693	4.00	[M-H] ⁻	7.34
PI 36:2	C ₄₅ H ₈₃ PO ₁₃	862.5571	862.5543	3.30	[M-H] ⁻	7.07
PI 38:3	C ₄₇ H ₈₅ PO ₁₃	888.5728	888.5697	3.50	[M-H] ⁻	7.12
PI 38:4	C ₄₇ H ₈₃ PO ₁₃	886.5571	886.5537	3.80	[M-H] ⁻	6.99
SM 32:1;2	C ₃₇ H ₇₅ N ₂ PO ₆	674.5363	674.5369	-0.90	[M+H] ⁺	7.20
SM 34:1;2	C ₃₉ H ₇₉ N ₂ PO ₆	702.5676	702.5682	-0.90	[M+H] ⁺	7.74
SM 36:1;2	C ₄₁ H ₈₃ N ₂ PO ₆	730.5989	730.5993	-0.50	[M+H] ⁺	8.32
SM 38:1;2	C ₄₃ H ₈₇ N ₂ PO ₆	758.6302	758.6310	-1.00	[M+H] ⁺	8.92
SM 38:2;2	C ₄₃ H ₈₅ N ₂ PO ₆	756.6145	756.6150	-0.60	[M+H] ⁺	8.30
SM 40:1;2	C ₄₅ H ₉₁ N ₂ PO ₆	786.6615	786.6625	-1.30	[M+H] ⁺	9.50
SM 40:2;2	C ₄₅ H ₈₉ N ₂ PO ₆	784.6458	784.6452	0.80	[M+H] ⁺	8.88
SM 42:1;2	C ₄₇ H ₉₅ N ₂ PO ₆	814.6928	814.6940	-1.50	[M+H] ⁺	10.14
SM 42:2;2	C ₄₇ H ₉₃ N ₂ PO ₆	812.6822	812.6829	-0.90	[M+H] ⁺	9.40

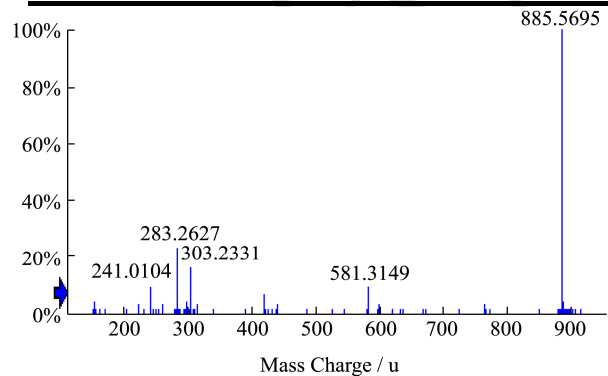


图2 一种磷脂酰肌醇(PI, 18:0~20:4)的二级质谱图(负离子模式)

Fig.2 MS/MS spectrum (in negative IT mode) of one PI species (18:0~20:4)

2.3 人乳中磷脂的相对定量分析

2.3.1 人乳中磷脂的相对定量

结果显示,人乳中5种磷脂的相对含量分别为磷脂酰胆碱(PC)38.12%、磷脂酰乙醇胺(PE)26.97%、鞘磷脂(SM)29.54%、磷脂酰丝氨酸(PS)4.43%、磷脂酰肌醇(PI)0.94%(图3)。这与Hundrieser^[22]等人的研究结果一致,但是更多的研究则得出了鞘磷脂(SM)占总磷脂的百分比大于磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰乙醇胺(PE)的结果;同时,结果显示磷脂酰肌醇(PI)在人乳中的含量较低,远低于其他研究中报告的4.6%~11.7%^[23,24]。跟牛乳相比,人乳中磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂(SM)的相对含量更高而磷脂酰乙醇胺(PE)的相对含量更低^[25,26]。另外,结果显示,PC36:2、PE36:2、PS36:2和PI36:2均为该磷脂所在族中相对含量最高的类别,这跟人体血液中的磷脂组成存在差异^[27],但是却可能和自然界中C18广泛存在有一定的联系。在所有的磷脂中,PC 36:2是含量最大的磷脂酰胆碱(PC),约占总磷脂酰胆碱(PC)的28.11%(图4)。PE 36:2、PS 36:2、

PI 36:2 占磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰肌醇(PI)的比例最大, 分别占到了这 3 种磷脂 22.65%, 53.68%和 38.27% (图 5、图 6 和图 7)。在鞘磷脂中, SM 34:1;2、SM 36:1;2 和 SM 40:1;2 的比例最高且含量相当, 分别占鞘磷脂的 17.92%、18.14%和 17.60%(图 8)。

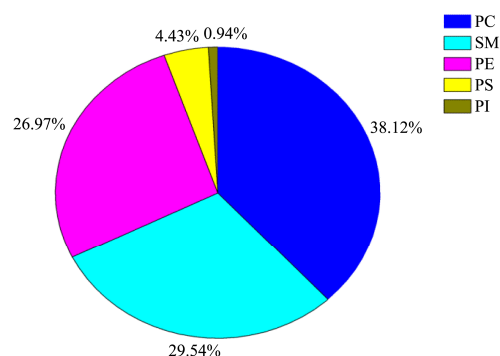


图3 各主要磷脂在中国人乳中的相对含量 (%总磷脂)

Fig.3 Relative content of the main phospholipids in human milk samples from Chinese women (% total PL)

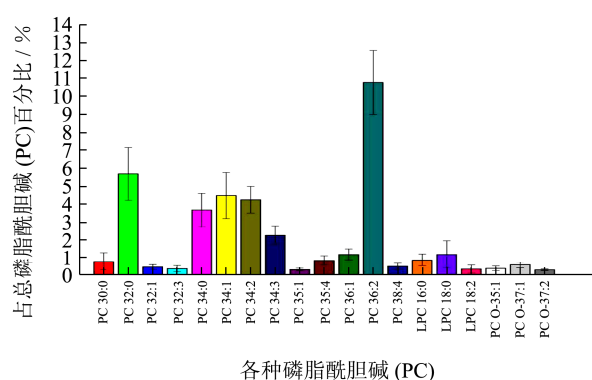


图4 人乳中各种磷脂酰胆碱(PC)的组成

Fig.4 Composition of various phosphatidylcholines (PCs) in human milk

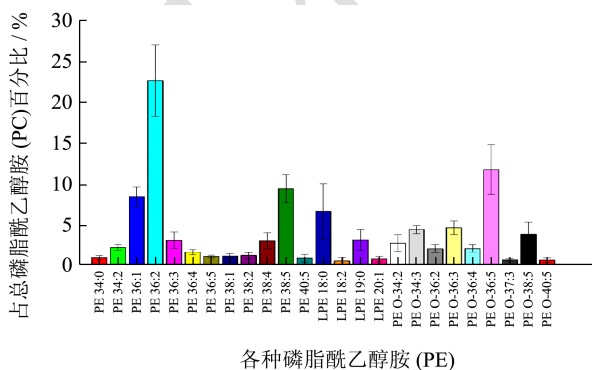


图5 人乳中各种磷脂酰乙醇胺(PE)的组成

Fig.5 Composition of various phosphatidylethanolamines (PEs) in human milk

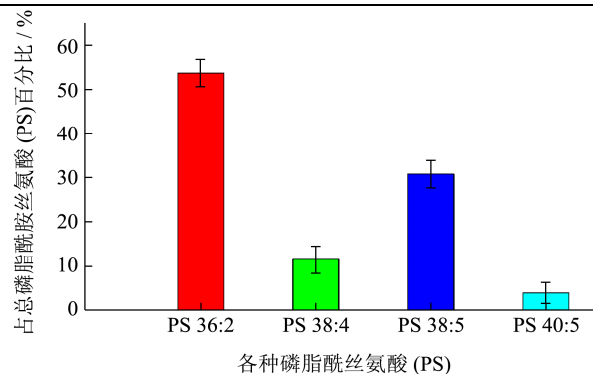


图6 人乳中各种磷脂酰丝氨酸(PS)的组成

Fig.6 Composition of various phosphatidylserines (PSs) in human milk

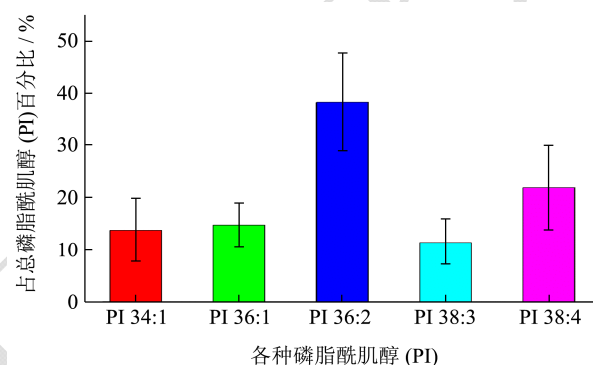


图7 人乳中各种磷脂酰肌醇(PI)的组成

Fig.7 Composition of various phosphatidylinositols (PIs) in human milk

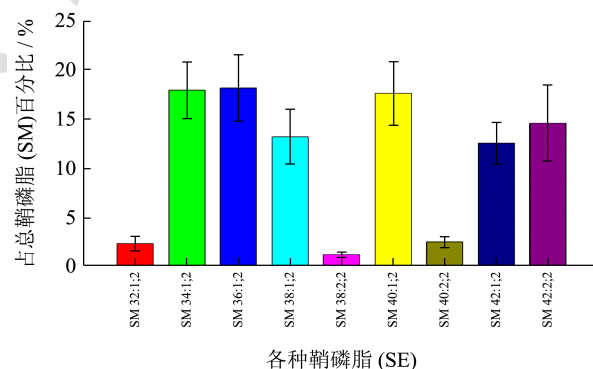


图8 人乳中各种鞘磷脂(SM)的组成

Fig.8 Composition of various sphingomyelins (SMs) in human milk

2.3.2 人乳中磷脂的动态变化

与人乳中脂质相似, 各磷脂的相对含量也随着泌乳期的变化而变化。如图9所示, 除了磷脂酰胆碱(PC)占总磷脂的百分比会随着泌乳期的变化从初乳期的41.16%降低到成熟期的36.64%以外, 其他磷脂的相对含量都随着泌乳期的变化而升高。磷脂酰乙醇胺(PE)从24.73%升至27.65%; 鞘磷脂(SM)从26.95%升高至

30.02%; 磷脂酰丝氨酸(PS)从 4.13%升至 4.93%; 磷脂酰肌醇(PI)从 0.32%升高至 0.75%。这与日本人乳中的多数磷脂的变化趋势一致,除了磷脂酰乙醇胺(PE)是降低的以外^[28]。在 17 种磷脂酰胆碱(PC)中,共有包括 PC30:0、PC32:0 等在内的 11 种组分在初乳期、过渡期和成熟期中的相对含量变化差异显著。这说明磷脂酰胆碱(PC)在以母乳作为营养来源的婴儿体内具有重要的生物学作用,尤其是其作为大脑神经递质的原料来源,更是在婴儿的智力发育过程中扮演了不可忽视的重要角色^[29]。对磷脂酰乙醇胺(PE)而言,PE 36:2、PE 36:3、PE 38:4、PE 38:5、PE 40:5、LPE 18:0、LPE 18:2、PE O-34:2、PE O-37:3 这 9 种磷脂酰乙醇胺随着泌乳期的变化其相对含量也呈现出具有统计学意义的差异,绝大多数则不显著。PE36:2、PE 36:3、PE 38:5、LPE 18:2、PE O-34:2 占总磷脂的百分比随着泌乳期的变化呈现出逐渐升高的趋势,而 PE 38:4、PE 40:5、LPE 18:0 和 PE O-34:2 的相对含量则随着泌乳期的变化而不断降低。磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)和鞘磷脂(SM)中随泌乳期变化其相对含量差异显著的磷脂种类分别为 2 种、3 种和 1 种。其余各族磷脂分子相对含量随泌乳期的变化趋势详见表 6。

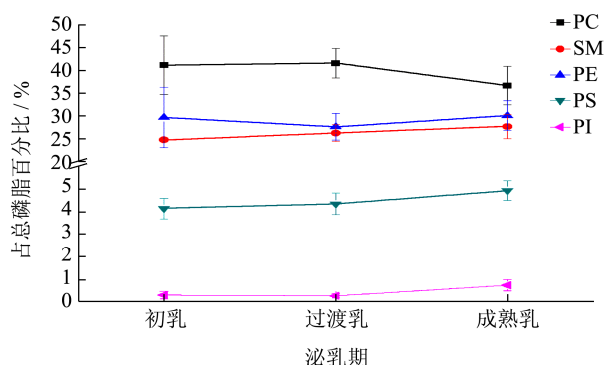


图9 人乳中各磷脂的相对含量随泌乳期变化趋势图

Fig.9 Chart showing the changes in the relative content of phospholipids in human milk with the lactation period

表 6 中国人乳中 60 种磷脂的相对含量随泌乳期的变化(%总磷脂)

Table 6 Changes in the relative contents of 60 kinds of phospholipids with lactation period, in human milk samples from Chinese women (% total PL)

磷脂	初乳(n=25)	过渡乳(n=24)	成熟乳(n=24)
PC 30:0	1.44±0.98 ^a	0.68±0.40 ^b	0.69±0.39 ^b
PC 32:0	7.17±0.92 ^a	6.23±1.16 ^b	5.00±1.45 ^c
PC 32:1	0.48±0.15 ^a	0.50±0.12 ^a	0.39±0.15 ^a
PC 32:3	0.51±0.27 ^a	0.32±0.18 ^b	0.32±0.16 ^b
PC 34:0	4.31±1.61 ^a	4.38±0.37 ^a	3.03±0.63 ^b
PC 34:1	5.70±1.01 ^a	5.04±0.73 ^a	3.82±1.34 ^b

PC 34:2	4.75±0.06 ^a	4.44±0.59 ^a	3.99±0.83 ^a
PC 34:3	2.38±0.65 ^a	2.43±0.37 ^a	2.10±0.57 ^a
PC 36:1	1.77±0.08 ^a	1.28±0.13 ^b	0.98±0.21 ^b
PC 36:2	8.11±2.37 ^b	10.80±1.07 ^{ab}	11.30±1.76 ^a
PC 38:4	0.34±0.09 ^b	0.57±0.27 ^a	0.45±0.09 ^{ab}
LPC 16:0	0.95±0.81 ^a	0.81±0.22 ^a	0.86±0.35 ^a
LPC 18:0	1.26±0.62 ^a	1.43±1.18 ^a	0.97±0.39 ^b
LPC 18:2	0.09±0.08 ^b	0.31±0.18 ^a	0.38±0.26 ^a
PC O-34:1	0.37±0.22 ^a	0.31±0.11 ^a	0.39±0.13 ^a
PC O-34:3	0.42±0.19 ^a	0.53±0.16 ^a	0.61±0.16 ^a
PC O-36:4	0.19±0.11 ^b	0.26±0.03 ^{ab}	0.29±0.03 ^a
PE 34:0	0.24±0.04 ^a	0.25±0.06 ^a	0.24±0.07 ^a
PE 34:2	0.54±0.09 ^a	0.64±0.10 ^a	0.60±0.12 ^a
PE 36:1	2.61±0.41 ^a	2.11±0.13 ^a	2.28±0.32 ^a
PE 36:2	4.63±0.01 ^c	5.55±0.87 ^b	6.81±1.73 ^a
PE 36:3	0.50±0.09 ^b	0.81±0.28 ^a	0.97±0.36 ^a
PE 36:4	0.34±0.10 ^a	0.46±0.07 ^a	0.43±0.06 ^a
PE 36:5	0.23±0.01 ^a	0.29±0.05 ^a	0.30±0.06 ^a
PE 38:1	0.33±0.12 ^a	0.30±0.08 ^a	0.28±0.08 ^a
PE 38:2	0.36±0.14 ^a	0.32±0.08 ^a	0.30±0.08 ^a
PE 38:4	0.56±0.14 ^c	0.93±0.33 ^a	0.81±0.22 ^b
PE 38:5	1.66±0.57 ^c	2.45±0.39 ^{ab}	2.79±0.53 ^a
PE 40:5	0.16±0.01 ^b	0.30±0.15 ^a	0.19±0.06 ^b
LPE 18:0	2.77±0.69 ^a	2.02±0.83 ^{ab}	1.38±0.62 ^b
LPE 18:1	0.95±0.81 ^a	0.81±0.22 ^a	0.86±0.35 ^a
LPE 18:2	0.02±0.01 ^c	0.11±0.06 ^b	0.19±0.15 ^a
LPE 20:1	0.14±0.02 ^a	0.20±0.03 ^a	0.21±0.13 ^a
PE O-34:2	1.24±0.47 ^a	0.73±0.10 ^b	0.64±0.12 ^c
PE O-34:3	0.96±0.16 ^a	1.17±0.18 ^a	1.27±0.21 ^a
PE O-36:2	0.71±0.23 ^a	0.55±0.08 ^a	0.53±0.11 ^a
PE O-36:3	1.16±0.60 ^a	1.15±0.28 ^a	1.35±0.16 ^a
PE O-36:4	0.45±0.11 ^a	0.53±0.18 ^a	0.62±0.17 ^a
PE O-36:5	2.84±1.31 ^a	3.18±0.77 ^a	3.20±0.93 ^a
PE O-37:3	0.11±0.01 ^b	0.16±0.03 ^{ab}	0.20±0.06 ^a
PE O-38:5	1.00±0.35 ^a	1.06±0.59 ^a	1.04±0.27 ^a
PE O-40:5	0.21±0.12 ^a	0.15±0.05 ^a	0.17±0.07 ^a
PS 36:2	2.23±0.27 ^a	2.27±0.32 ^a	2.70±0.34 ^a
PS 38:4	0.66±0.08 ^a	0.46±0.07 ^b	0.43±0.11 ^b
PS 38:5	1.12±0.14 ^b	1.36±0.26 ^{ab}	1.65±0.20 ^a
PS 40:5	0.13±0.03 ^a	0.25±0.10 ^a	0.16±0.07 ^a
PI 34:1	0.05±0.01 ^{ab}	0.04±0.01 ^b	0.08±0.02 ^a
PI 36:1	0.03±0.01 ^b	0.03±0.01 ^b	0.13±0.05 ^a
PI 36:2	0.09±0.05 ^b	0.10±0.04 ^b	0.33±0.14 ^a
PI 38:3	0.06±0.04 ^a	0.04±0.02 ^a	0.06±0.02 ^a

转下页

接上页

PI 38:4	0.09±0.07 ^a	0.07±0.02 ^a	0.14±0.09 ^a
SM 32:1;2	0.68±0.27 ^a	0.62±0.27 ^a	0.74±0.20 ^a
SM 34:1;2	6.26±0.14 ^a	5.01±0.47 ^b	5.06±0.76 ^{ab}
SM 36:1;2	4.73±1.64 ^a	5.15±0.96 ^a	5.53±1.56 ^a
SM 38:1;2	4.14±2.44 ^a	3.19±0.43 ^a	4.33±1.16 ^a
SM 38:2;2	0.39±0.05 ^a	0.32±0.08 ^a	0.32±0.08 ^a
SM 40:1;2	4.18±1.17 ^a	4.81±0.89 ^a	5.56±1.25 ^a
SM 40:2;2	0.91±0.18 ^a	0.69±0.13 ^a	0.72±0.16 ^a
SM 42:1;2	3.19±0.62 ^a	3.48±0.37 ^a	3.83±0.89 ^a
SM 42:2;2	5.17±0.41 ^a	4.34±1.46 ^a	3.93±0.83 ^a

3 结论

人乳中各种甘油磷脂和鞘磷脂共计 60 种, 磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、鞘磷脂(SM)、磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰肌醇(PI)占总磷脂的比例分别为 38.12%、26.97%、29.54%、4.43%和 0.94%。本研究对不同泌乳期中国人乳中的各类磷脂进行了相对定量, 除了 PC30:0、PE36:2、PS38:5、PI36:1 和 SM34:1;2 等 26 种磷脂随泌乳期变化其相对含量变化明显外, 大部分的甘油磷脂和鞘磷脂的相对含量随泌乳期的变化其差异并不显著。

参考文献

- [1] Fuquay J W, Fox P F, McSweeney P L H. Encyclopedia of dairy sciences (2nd edition) [M]. The United Kingdom: Academic Press, 2011
- [2] 马守庆, 边高瑞, 朱伟云. 母乳的生物学功能研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 233-238
- MA Shou-qing, BIAN Gao-rui, ZHU Wei-yun. Progresses in biological functions of maternal milk [J]. Food Science, 2015, 36(5): 233-238
- [3] 张洪渊, 万海清. 生物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006
- ZHANG Hong-yuan, WAN Hai-qing. Biochemistry [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006
- [4] 王希成. 生物化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 2005
- WANG Xi-cheng. Biochemistry [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2005
- [5] 王涛, 梅旭荣, 钟秀丽, 等. 脂质组学研究方法及其应用[J]. 植物学报, 2010, 45(2): 249-257
- WANG Tao, MEI Xu-rong, ZHONG Xiu-li, et al. The profiling method of lipidomics and its applications [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2010, 45(2): 249-257
- [6] Jensen R G. Lipids in human milk [J]. Lipids, 1999, 34(12): 1243-1314
- [7] Hamosh M, Peterson J A, Henderson T R, et al. Protective function of human milk: the milk fat globule [J]. Seminars in Perinatology, 1999, 23(3): 242-249
- [8] Keenan T W, Patton S. The milk lipid globule membrane, in the handbook of milk composition (jensen, r g, ed) [M]. San Diego: Academic Press, 1995
- [9] Benoit B, Fauquant C, Daira P, et al. Phospholipid species and minor sterols in french human milks [J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 684-691
- [10] Saito H, Ishihara K. Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants [J]. Journal of Oil & Fat Industries, 1997, 74(12): 1531-1536
- [11] Hooijdonk A C M V, Kussendrager K D, Steijns J M. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence [J]. British Journal of Nutrition, 2000, 84(S1): S127-134
- [12] 许海丹. 蛋黄磷脂的精制工艺及其稳定性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005
- XU Hai-dan. Studies on the purification technology and stability of egg lecithin [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005
- [13] Kivinen A, Tarpila S, Salminen S, et al. Gastroprotection with milk phospholipids: a first human study [J]. Milchwissenschaft, 1992, 47: 694-696
- [14] 钟静芬. 表面活性剂在医药中的应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996
- ZHONG Jing-fen. Application of surfactants in medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996
- [15] 唐传核. 植物功能性食品[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004
- TANG Chuan-he. Plant functional food [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004
- [16] 李力. 磷脂与疾病及其研究方法[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1994
- LI li. Phospholipids and diseases and their research methods [M]. Yinchuan: Ningxia People's Publishing House, 1994
- [17] 胡小中. 磷脂酰胆碱的生理功能和作用机理[J]. 粮油食品科技, 2011, 19(4): 42-44
- HU Xiao-zhong. Physiological function of phosphatidylcholine and its possible mechanism of action [J]. Science & Technology of Cereals Oils & Foods, 2011, 19(4): 42-44
- [18] Folch J, Lees M, Sloane Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue [J]. Journal of Biological Chemistry, 1957, 226(1): 497-509
- [19] Murphy R C, Axelsen P H. Mass spectrometric analysis of

- long-chain lipids [J]. Mass Spectrometry Reviews, 2011, 30(4): 579-599
- [20] Liu Z, Moate P, Cocks B, et al. Comprehensive polar lipid identification and quantification in milk by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2015, s978-979: 95-102
- [21] Paola D, Francesco C, Filomena C, et al. Determination of phospholipids in milk samples by means of hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to evaporative light scattering and mass spectrometry detection [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(37): 6476-6482
- [22] Hundrieser K, Clark R M. A method for separation and quantification of phospholipid classes in human milk [J]. Journal of Dairy Science, 1988, 71(1): 61-67
- [23] Francesca G, Cristina C H, Brigitte F, et al. Quantification of phospholipids classes in human milk [J]. Lipids, 2013, 48(10): 1051-1058
- [24] Harzer G, Haug M, Dieterich I, et al. Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1983, 37(4): 612-621
- [25] Fagan P, Wijesundera C. Liquid chromatographic analysis of milk phospholipids with on-line pre-concentration [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1054(1): 241-249
- [26] Sanchez-Juanes F, Alonso J M, Zancada L, et al. Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes [J]. International Dairy Journal, 2009, 19(5): 273-278
- [27] Pang L Q, Liang Q L, Wang Y M, et al. Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipid classes in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy [J]. Journal of Chromatography B, 2008, 869(1-2): 118-125
- [28] Shoji H, Shimizu T, Kaneko N, et al. Comparison of the phospholipid classes in human milk in japanese mothers of term and preterm infants [J]. Acta Paediatrica, 2006, 95(8): 996-1000
- [29] 殷涌光,陈玉江,刘瑜,等.磷脂功能性质及其生产应用的研究进展[J].食品与机械,2009,25(3):120-124
- YIN Yong-guang, CHEN Yu-jiang, LIU Yu, et al. The functionand characterof lecithinandthe research processofits productionand application [J]. Food & Machinery, 2009, 25(3): 120-124
-
- (上接第 319 页)
- [9] Pastor-Navarro N, Morais S, Maquieira Á, et al. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. Application to honey samples [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 594(2): 211-218
- [10] 杨琳.动物性食品中土霉素、金霉素和四环素检测方法研究进展[J].中国动物检疫,2012,8:63-66
- YANG Lin. Development of detection methods of oxytetracycline, chlortetracycline and tetracycline in animal derived foods [J]. China Animal Health Inspection, 2012, 8: 63-66
- [11] 梁锦添,韦超,郑忠毅,等.氯化血红素作为过氧化氢模拟酶制备高纯度低聚果糖[J].广西大学学报(自然科学版), 2012,37(5):893-898
- LIANG Jin-tian, WEI Chao, ZHENG Zhong-yi, et al. Production of highly pure fructooligosaccharide using hemin as a mimetic catalase [J]. Journal of Guangxi University, 2012, 37(5): 893-898
- [12] Wu Y, Wang F, S Zhan, et al. Regulation of hemin peroxidase catalytic activity by arsenic-binding aptamers for the colorimetric detection of arsenic (III) [J]. RSC Advances, 2013, 3(48): 25614-25619
- [13] 周学辉,孔德明.G-四联体-Hemin 过氧化物酶用于 Ag⁺的定量检测[C]//中国化学会学术年会,2010
- ZHOU Xue-hui, KONG De-ming. Ag⁺ quantitation using G-quadruplex-hemin DNAzyme [C]// Chinese Chemical Society, 2010
- [14] Tan H, Chen Y. Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium (III) for detection of tetracycline in milk [J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2012, 173: 262-267