

检测分析

DOI: 10.12166/j.zgyz.1003-7969/2020.09.019

高效液相色谱-蒸发光散射法分析海鲈肌肉磷脂组成

王霞^{1,2},林婉玲¹,李来好¹,吴燕燕¹,杨少玲¹,黄卉¹,杨贤庆¹,林织³

(1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所,国家水产品加工技术研发中心,农业农村部水产品加工重点实验室,广州 510300; 2. 广东药科大学 公共卫生学院,广州 510006; 3. 广东顺欣海洋渔业集团有限公司,广东 阳江 529800)

摘要:对海水鱼海鲈肌肉磷脂的脂肪酸组成进行了测定,并建立了利用高效液相色谱-蒸发光散射法(HPLC-ELSD)分析其磷脂组成的方法。采用 Chromolith® Performance - Si 型正相硅胶色谱柱(100 mm × 4.6 mm)进行磷脂组分分离,流动相为正己烷-异丙醇-乙酸体系,三元梯度洗脱,流速为1.5 mL/min,以各磷脂组分保留时间定性,峰面积定量。结果表明:海鲈肌肉磷脂不饱和脂肪酸含量为62.59%,EPA和DHA总含量达30.86%。采用HPLC-ELSD,磷脂组分分离效果良好,精密度高,变异系数均小于3%,平均回收率为86.00%~105.00%,相对标准偏差小于3.50%,此方法测定海鲈肌肉磷脂组成准确、高效,可运用于其他如海水鱼磷脂的分析检测。海鲈肌肉包含6种磷脂组分,其中磷脂酰乙醇胺(PE)含量最高,磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰肌醇(PI)次之。

关键词:海鲈;磷脂;高效液相色谱蒸发光散射法(HPLC-ELSD);脂肪酸**中图分类号:**TS254.2;TS207.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2020)09-0097-05

Determination of phospholipids composition in *Lateolabrax japonicus* muscle by HPLC-ELSD

WANG Xia^{1,2}, LIN Wanling¹, LI Laihao¹, WU Yanyan¹, YANG Shaoling¹,
HUANG Hui¹, YANG Xianqing¹, LIN Zhi³

(1. Key Lab of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Research and Development Center for Aquatic Product Processing, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Guangdong Shunxin Marine Fisheries Group Co., Ltd., Yangjiang 529800, Guangdong, China)

Abstract:The fatty acid composition of phospholipids in seawater fish *Lateolabrax japonicus* muscle was studied. The method for analyzing the phospholipids composition by high performance liquid chromatography - evaporative light scattering detector (HPLC - ELSD) was established. Chromolith® Performance - Si type positive phase silica gel column (100 mm × 4.6 mm) was used as separation column, and n-hexane - isopropanol - acetic acid was used as mobile phase system with three element gradient elution and flow rate 1.5 mL/min. Each phospholipids component was qualified by retention time and quantified by peak area. The results indicated that the content of unsaturated fatty acids in *Lateolabrax japonicus* muscle phospholipids was 62.59%, and the total content of EPA and DHA was

30.86%. Each phospholipids component was separated well by HPLC - ELSD. The method had high precision, and the coefficient of variation was less than 3%. The average recovery rate was in the range of 86.00% - 105.00%, and the relative standard deviation was less than 3.50%. The method was accurate and efficient for the determination of phospholipids composition in

收稿日期:2019-11-22;修回日期:2020-04-20**基金项目:**“十二五”国家重点研发计划(2016YFD0400201-6);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2019TS16);现代农业产业技术体系专项(CARS-47);“扬帆计划”引进创新创业团队专项(2015YT02H109)**作者简介:**王霞(1992),女,硕士研究生,研究方向为食品安全(E-mail)m15989276577@163.com。**通信作者:**林婉玲,副研究员,博士(E-mail)lwlsclf@163.com。

Lateolabrax japonicus muscle, and was suitable for the determination of phospholipids in seawater fish. Six kinds of phospholipids components were detected in *Lateolabrax japonicus* muscle. Among them, the content of phosphatidylethanolamine (PE) was the highest, followed by phosphatidylcholines (PC) and phosphatidylinositol (PI).

Key words: *Lateolabrax japonicus*; phospholipids; high performance liquid chromatography – evaporative light scattering detector (HPLC – ELSD); fatty acid

海鲈(*Lateolabrax japonicus*)又称鲈鱼、花寨和板鲈,分布于渤海至南海近岸及通海的江河水域,生长周期快、适应性广,是我国重要的海水养殖鱼类^[1]。海鲈肉质鲜美、清香,含有丰富的蛋白质和微量元素^[2-3],此外还含有丰富的磷脂。磷脂是生物膜的重要组成部分,作为膜的结构物质和功能单位,以规律的结构保证细胞的正常形态和功能,还是脂类依赖性酶类起催化作用时不可缺少的物质。衰老和多种结构的改变也与膜磷脂的改变有关。磷脂的补充在抗衰老,防治动脉粥样硬化、肝硬化、皮肤病、血液病,调节血糖,促进骨折愈合,调节神经功能及开发智力等方面均有较强的作用^[4-5]。目前,有关海鲈的研究主要集中在产品加工工艺^[6-7]、理化特性^[8]、饲料喂养^[9-10]、副产品加工^[11]和基本营养成分^[12-13]等方面。而对于海鲈磷脂方面的研究较少,缺少海鲈磷脂组成检测方法的研究,不利于海鲈的进一步开发利用。

目前,关于磷脂检测的常用方法有薄层层析法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)和核磁共振法(NMR)^[14]。TLC适用于不同类别间磷脂的分离,简便、直观,但预处理比较烦琐、耗时,对准确度影响较大。HPLC可以用于磷脂类别间和类别内的分离,有利于复杂样本的定性和定量分析^[15]。NMR可以定性定量分析,具有快速、准确性高的优点,但是样本用量较大^[16]。目前,HPLC是磷脂定性定量研究的主要方法。由于磷脂结构中包含1个极性的磷酸头部基团和1~2个非极性脂肪酰基尾部基团,且根据极性头部基团的差异,磷脂呈现不同种类^[17],等度洗脱难以完全分离,梯度洗脱较适合于磷脂分离,会获得较好的峰形和分离度,紫外和示差折光检测器不适合梯度洗脱,蒸发光散射检测器(ELSD)能消除因梯度洗脱和流动相给分析检测带来的影响^[14]。常用的流动相有正己烷–异丙醇–乙酸和氯仿–甲醇–水/氨水两种体系,其中氯仿–甲醇–水/氨水体系噪声信号较高,不适合ELSD检测,应选择正己烷–异丙醇–乙酸体系^[18]。因此,本实验以海鲈为研究对象,选择高效液相色谱–蒸发光散射法,采用正己烷–异丙

醇–乙酸体系,梯度洗脱,对海水鱼海鲈肌肉磷脂组成进行分析测定,以期为海鲈的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

海鲈(1.8 kg),广州市南沙市场;溶血磷脂酰乙醇胺(LPE,纯度>99%)、磷脂酰乙醇胺(PE,纯度>98%)、磷脂酰丝氨酸(PS,纯度>98%)、磷脂酰肌醇(PI,纯度>98%)、磷脂酰胆碱(PC,纯度>98%)、鞘磷脂(SM,纯度≥98%)、溶血磷脂酰胆碱(LPC,纯度>98%),2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT),美国Sigma公司;正己烷、异丙醇均为色谱纯,广州华屹欣实验器材有限公司;氯仿、甲醇、丙酮均为分析纯,东莞市宏都化工有限公司。

1.1.2 仪器与设备

LC-20AD高效液相色谱仪、ELSD-LT II蒸发光散射检测器、QP2010 plus气相色谱–质谱(GC-MS)联用仪,日本岛津公司;BS 224S电子天平,德国Sartorius公司;TDZ5-WS台式低速离心机,中国湖南湘仪离心机公司;氮吹仪,美国Organimation公司。

1.2 实验方法

1.2.1 海鲈肌肉脂类物质的提取

取新鲜海鲈的可食用部分肌肉,去皮后用生理盐水冲洗,均质机打碎后待处理。按照Folch等^[19]的方法,使用氯仿–甲醇法提取脂质。精密称取绞碎鱼肉放入50 mL离心管中,加入15 mL氯仿–甲醇(体积比2:1)溶液(含0.01% BHT),在冰浴条件下用均质机均质2次(10 000 r/min, 2×15 s,间隔30 s),再加入15 mL氯仿–甲醇溶液,然后静置1 h后过滤,将全部滤液移到已知质量的离心管中,加入0.2倍体积的0.85%生理盐水,然后用离心机进行离心(3 000 r/min, 15 min),将分离的下层脂质溶液通过氮吹进行浓缩,冷却至恒重称量,得到海鲈肌肉脂类物质,计算其粗脂肪含量。

1.2.2 海鲈肌肉磷脂的纯化

使用氯仿–甲醇法提取的脂类物质,一般为结

合态脂类,除含有磷脂外,还有糖脂、胆固醇及胆固醇酯等物质,会干扰磷脂检测,所以样品在进行分析前需要纯化。因为磷脂难溶于丙酮,因此将丙酮(4℃)加入脂类物质中,离心(4 000 r/min, 7 min)除去上清液,反复多次,直至上清液无色,然后氮气吹干后得到海鲈肌肉磷脂,于-20℃冷冻保存备用。

1.2.3 海鲈肌肉磷脂脂肪酸组成分析

将三氟化硼-甲醇溶液加入海鲈肌肉磷脂进行甲酯化后,根据GB 5009.168—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》,测定样品磷脂脂肪酸组成。

1.2.4 海鲈肌肉磷脂组成测定

1.2.4.1 标准曲线的绘制

PE、PI、PS、PC、SM、LPC 和 LPE 7 种标准品配制前储存在-20℃,配制(PI 和 LPE 用氯仿溶解,其他用甲醇溶解)后放在4℃保存。将 PE、LPE、PS、PI、PC、LPC 和 SM 标准溶液分别单独进样进行 HPLC-ELSD 分析,记录各个标准品的出峰时间,依据保留时间对磷脂标准品进行定性。稀释不同质量浓度的混合标准品,从低质量浓度到高质量浓度进样,每个样品重复进样3次,以各个标准品质量浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.4.2 HPLC-ELSD 分析条件

HPLC 条件: Chromolith® Performance-Si 型正相硅胶色谱柱(100 mm×4.6 mm);流动相 A 为正己烷(0.04% 的三乙胺),流动相 B 为异丙醇,流动相 C 为 13% 的乙酸溶液;柱温箱温度 30℃;进样量 20 μL^[18];采用三元梯度洗脱,梯度洗脱程序见表 1^[20]。

ELSD 条件: 雾化气体为氮气, 气体压强 320 kPa, 漂移管温度 70℃。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相体积分数/%			流速/(mL/min)
	A	B	C	
0.0	40	57	3	1.5
8.0	40	50	10	1.5
15.0	40	50	10	1.5
15.1	40	57	3	1.5
24.0	40	57	3	1.5

1.2.4.3 样品测定

取适量海鲈肌肉磷脂样品,溶解于甲醇,经0.22 μm 有机相滤膜过滤进样品瓶,按 1.2.4.2 进行 HPLC-ELSD 分析。以保留时间定性,将各峰面积代入标准曲线方程中,计算海鲈肌肉磷脂各组成含量。

1.2.5 数据处理

每个样品有3个平行,结果均表示为“平均值±标准差”,并用 Excel 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 海鲈肌肉粗脂肪含量与磷脂脂肪酸组成

采用氯仿-甲醇法提取脂质,得到海鲈肌肉粗脂肪含量为(10.86±0.73)%。海鲈肌肉磷脂脂肪酸组成及相对含量见表 2。

表 2 海鲈肌肉磷脂脂肪酸组成及相对含量

脂肪酸	相对含量/%
肉豆蔻酸 C14:0	0.59±0.13
棕榈酸 C16:0	14.83±0.28
十七烷酸 C17:0	0.30±0.08
硬脂酸 C18:0	21.69±0.48
棕榈油酸 C16:1	2.36±0.24
亚油酸 C18:2	3.33±0.21
亚麻酸 C18:3	13.97±0.60
花生四烯酸 C20:4	12.06±0.15
二十碳五烯酸 C20:5	5.74±0.00
二十二碳六烯酸 C22:6	25.12±0.41
饱和脂肪酸	37.41±0.41
不饱和脂肪酸	62.59±0.41

由表 2 可知,海鲈肌肉磷脂中含有 10 种脂肪酸,主要有棕榈酸、硬脂酸、亚麻酸、花生四烯酸和二十二碳六烯酸(DHA),其中二十碳五烯酸(EPA)和 DHA 总含量占总脂肪酸的 30.86%。EPA 和 DHA 能够降低心血管疾病发生的概率,可改善视力,能够有效降低重度抑郁症和躁郁症的发病率^[21]。海鲈肌肉磷脂中含有大量的不饱和脂肪酸,占总脂肪酸的 62.59%。不饱和脂肪酸能够对心血管系统起到积极作用,如缓解血栓,且能够增强记忆力以及预防阿尔茨海默病,还可以提高免疫力等^[22-24]。海鲈肌肉磷脂脂肪酸能够满足人体营养需求,有较高的营养价值。

2.2 海鲈肌肉磷脂组成

2.2.1 磷脂标准曲线

7 种磷脂混合标准品的 HPLC-ELSD 图谱见图 1,海鲈肌肉磷脂的 HPLC-ELSD 图谱见图 2。

由图 1 及图 2 可知,在本实验的洗脱条件下,磷脂混合标准样品和海鲈肌肉磷脂样品均能达到基线分离,峰形良好,且海鲈肌肉磷脂中未检出 SM。按照 1.2.4.1, 绘制标准曲线, 各磷脂标准曲线方程、线性范围及相关系数见表 3。

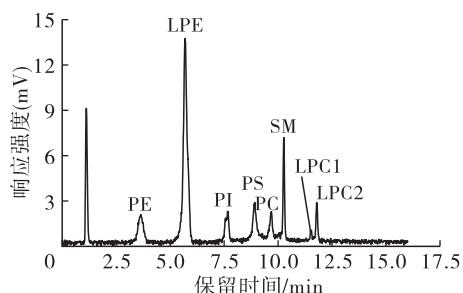


图1 7种磷脂混合标准品的HPLC-ELSD图谱

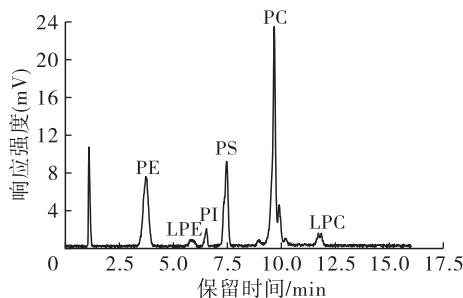


图2 海鲈肌肉磷脂HPLC-ELSD图谱

表3 磷脂标准曲线方程、线性范围及相关系数(R^2)

磷脂	线性方程	线性范围/(mg/mL)	R^2
PE	$Y = 154.697X - 51.472.9$	0.4~2.0	0.995
LPE	$Y = 720.158X - 85.891.7$	0.3~1.5	0.999
PI	$Y = 432.162X - 19.157.0$	0.08~0.4	0.999
PS	$Y = 390.352X - 20.104.5$	0.1~0.5	0.998
PC	$Y = 221.837X - 13.913.7$	0.1~0.5	0.992
SM	$Y = 385.790X - 15.324.2$	0.1~0.5	0.997
LPC	$Y = 169.642X - 6.525.69$	0.1~0.5	0.995

由表3可知,磷脂各组分质量浓度与峰面积线性关系良好,相关系数大于0.99。PE、LPE、PI的线性范围分别为0.4~2.0 mg/mL、0.3~1.5 mg/mL和0.08~0.4 mg/mL。PS、PC、SM、LPC的线性范围均为0.1~0.5 mg/mL。

2.2.2 精密度实验

磷脂混合标准品重复进样3次,得出各磷脂组分相应峰面积的平均值和变异系数,结果见表4。

表4 磷脂标准品峰面积的精密度

磷脂	峰面积/ 10^4	变异系数/%
PE	25.916 ± 0.194	0.75
LPE	98.247 ± 0.903	0.92
PI	15.242 ± 0.140	0.92
PS	17.205 ± 0.246	1.43
PC	9.458 ± 0.210	2.22
SM	17.871 ± 0.175	0.98
LPC	7.946 ± 0.061	0.77

由表4可知,磷脂标准品各组分峰面积变异系数均小于3%,重现性好。

2.2.3 回收率实验

称取相同质量的海鲈肌肉4份,每份3 g。其中3份加入已知质量的磷脂标准品,1份不加,涡旋处理,配成新样品,根据1.2.1和1.2.2方法制备海鲈肌肉磷脂样品,按1.2.4.3进行测定,每份样品平行测定3次,计算磷脂加标回收率,结果见表5。

表5 磷脂的加标回收率

磷脂	本底值/mg	加标量/mg	检测值/mg	回收率/%	RSD/%
PE	1.360 ± 0.178	0.4	1.718 ± 0.031	89.50	2.10
		1	2.366 ± 0.186	100.60	1.41
		2	3.460 ± 0.002	105.00	1.21
LPE	0.140 ± 0.007	0.3	0.398 ± 0.004	86.00	2.45
		0.4	0.522 ± 0.002	95.50	1.33
		1	1.021 ± 0.005	88.10	3.14
PI	0.340 ± 0.046	0.08	0.411 ± 0.083	88.75	1.38
		0.2	0.533 ± 0.020	96.50	2.35
		0.4	0.689 ± 0.007	87.25	1.29
PS	0.070 ± 0.013	0.1	0.157 ± 0.023	87.00	0.51
		0.2	0.255 ± 0.017	92.50	2.72
		0.3	0.348 ± 0.001	92.67	1.29
PC	0.990 ± 0.088	0.1	1.093 ± 0.113	103.00	2.13
		0.2	1.174 ± 0.040	92.00	3.10
		0.4	1.362 ± 0.029	93.00	1.13
SM	0	0.1	0.097 ± 0.019	97.00	0.44
		0.2	0.188 ± 0.008	94.00	2.25
		0.4	0.345 ± 0.011	86.25	2.90
LPC	0.170 ± 0.011	0.1	0.257 ± 0.026	87.00	2.09
		0.2	0.363 ± 0.009	96.50	1.18
		0.5	0.689 ± 0.012	103.80	0.15

从表5可以看出,7种磷脂加标回收率范围在86.00%~105.00%,相对标准偏差(RSD)小于3.50%,有较好的准确度。

2.3 海鲈肌肉磷脂组成(见表6)

表6 海鲈肌肉磷脂组成及含量

磷脂	含量/(g/kg)
PE	0.30 ± 0.220
LPE	0.05 ± 0.002
PI	0.08 ± 0.055
PS	0.02 ± 0.012
PC	0.22 ± 0.157
LPC	0.04 ± 0.026

从表6可以看出,海鲈肌肉包含6种磷脂组分,其含量高低顺序为PE>PC>PI>LPE>LPC>PS,SM未检出。PE具有抗氧化作用,可用于美容、保护心血管等;PC是重要的膜结构成分,具有特有的生物活性和生理功能,能够促进和改善大脑组织和神

经系统的功能,提高记忆力,防治老年痴呆,治疗溃疡性结肠炎等^[25~26]。

3 结 论

通过高效液相色谱-蒸发光散射法测定海鲈肌肉磷脂组成,选择流动相正己烷-异丙醇-乙酸体系得到的峰形良好,能够完全分离,且精密度和加标回收率满足实验要求,其中精密度高,变异系数均小于3%,加标回收率为86.00%~105.00%,相对标准偏差小于3.50%,能够快速、高效检测磷脂组成。本实验方法对于海水鱼磷脂测定,分离效果良好,可运用于其他海水鱼磷脂组分测定。

海鲈肌肉磷脂不饱和脂肪酸含量为62.59%,EPA和DHA总含量达30.86%,海鲈肌肉中共检出6种磷脂组分,其中PE、PC和PI含量较高,可对人体健康起到积极作用,利于人体均衡膳食摄入。

参考文献:

- [1] 中国水产科学研究院. 我科研人员首次完成花鲈基因组精细图谱绘制[J]. 江西饲料, 2019(1):46.
- [2] 罗茵. 多管齐下助海鲈“游”得更远[J]. 海洋与渔业, 2018(10):58~59.
- [3] 王远红, 吕志华, 高天翔, 等. 不同海域中国花鲈营养成分的比较研究[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2003, 33(4):531~536.
- [4] 李立. 磷脂与疾病及其研究方法[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1993.
- [5] HAN X. Neurolipidomics: challenges and developments [J]. Front Biosci, 2011, 12(4):2601~2615.
- [6] 董志俭, 孙丽平, 祁兴普, 等. 海鲈鱼/草鱼鱼丸的加工工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(2):103~107.
- [7] 岳开华, 黄永春, 张业辉, 等. 超高压处理对海鲈鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 广东农业科学, 2016, 43(1):111~116, 193.
- [8] 高继庆, 赵云平, 秦华伟, 等. 木糖葡萄球菌发酵对海鲈鱼肉理化性质的影响[J]. 农产品加工, 2018(12):1~5.
- [9] 李雅婷, 田梦丽, 谢换换, 等. 饲料中添加肌肉生长抑制素抑制肽对海鲈生长性能、体组成、血清生化指标及肝脏与血清免疫指标的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(2):519~528.
- [10] 张树威. 饲料磷水平对淡水养殖花鲈生长、体组成及脂代谢的影响[D]. 福建厦门: 集美大学, 2018.
- [11] 刘磊, 祝婧, 张名位, 等. 海鲈鱼胶原蛋白肽制备工艺优化及其促进成纤维细胞增殖活性比较[J]. 中国食品学报, 2016, 16(11):89~95.
- [12] 曹湛慧, 黄和, 操玉涛, 等. 淡水和海水养殖花鲈营养成分的比较[J]. 食品与机械, 2014, 30(3):44~48.
- [13] 吴燕燕, 李冰, 朱小静, 等. 养殖海水和淡水鲈鱼的营养组成比较分析[J]. 食品工业科技, 2016, 37(20):348~352, 359.
- [14] 闫媛媛, 张康逸, 黄健花, 等. 磷脂分离、纯化和检测方法的研究进展[J]. 中国油脂, 2012, 37(5):61~65.
- [15] 朱超, 梁琼麟, 王文明, 等. 磷脂组学研究中的分析检测技术[J]. 分析化学, 2016, 44(6):984~993.
- [16] 邓冬艳, 邓鹏翅, 宋红杰, 等. 核磁共振法测定蛋黄中磷脂酰胆碱含量的实验研究[J]. 实验技术与管理, 2018, 35(10):50~53.
- [17] 马会芳, 魏芳, 董绪燕, 等. 基于衍生化技术的甘油磷脂分析方法研究进展[J]. 分析测试学报, 2018, 37(11):1396~1404.
- [18] 韩迎雪, 林婉玲, 杨少玲, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定翘嘴红鲌肌肉中磷脂的组成[J]. 食品科学, 2019, 40(14):223~228.
- [19] FOLCH J, LEES M, SLOANE G S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues [J]. J Biol Chem, 1957, 226(1):497~509.
- [20] 卢航, 里慧, 赵景华, 等. 利用高效液相色谱-蒸发光检测器法分析鮰鱼脑中磷脂组成[J]. 食品科学, 2015, 36(24):177~180.
- [21] 李妍, 王静, 李麒龙, 等. EPA与DHA最新研究进展[J]. 农产品加工(学刊), 2013(3):6~13.
- [22] SAHEN A F, ZAIDUL I S M, JINAP S, et al. PUFAs in fish: extraction, fractionation, importance in health[J]. Compr Rev Food Sci F, 2010, 8(2):59~74.
- [23] INNIS S M. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain[J]. Brain Res, 2008, 1237(4):35~43.
- [24] RUXTON C H S, REED S C, SIMPSON M J A, et al. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence[J]. J Hum Nutr Diet, 2010, 17(5):449~459.
- [25] ANSELL G B. Phospholipids: chemistry, metabolism and function [M]. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1964.
- [26] SCHNEIDER H, BRAUN A, FÜLLEKRUG J, et al. Lipid-based therapy for ulcerative colitis—modulation of intestinal mucus membrane phospholipids as a tool to influence inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(10):4149~4164.