

# 不同溶剂提取牦牛酥油中的磷脂及其脂质组学研究

雷有娟<sup>1</sup>, 孙万成<sup>1</sup>, 罗毅皓<sup>1</sup>, 马海青<sup>2</sup>, 康海燕<sup>3</sup>

(1. 青海大学农牧学院, 西宁 810016; 2. 青海省祁连县畜牧兽医站, 青海 祁连 810499;

3. 青海省祁连县默勤镇畜牧兽医站, 青海 祁连 810499)

**摘要:** 研究不同提取溶剂对牦牛酥油中油脂和磷脂得率的影响, 并进行脂肪酸组成和脂质组学分析。结果表明: 从白色和黄色牦牛酥油中, 利用正己烷提取的油脂和磷脂得率最高, 油脂得率分别为 84.32% 和 88.86%, 磷脂得率分别为 11.28% 和 12.27%。白酥油检出 33 种脂肪酸, 其中饱和脂肪酸 22 种, 不饱和脂肪酸 11 种, 支链脂肪酸 6 种。黄酥油中检出 32 种脂肪酸, 其中饱和脂肪酸 20 种, 不饱和脂肪酸 12 种, 支链脂肪酸 6 种。白酥油和黄酥油中饱和脂肪酸分别占脂肪酸总量的 74.92% 和 73.25%, 不饱和脂肪酸分别占脂肪酸总量的 25.09% 和 26.75%, 支链脂肪酸分别占脂肪酸总量的 9.06% 和 5.28%。对 5 种溶剂提取磷脂的脂肪酸组成进行比较, 发现正己烷提取的磷脂中不饱和脂肪酸含量最高, 白酥油磷脂和黄酥油磷脂中不饱和脂肪酸分别占 10.78% 和 22.54%。通过脂质组学分析, 白酥油、黄酥油、白酥油磷脂和黄酥油磷脂在负离子模式下共检出 6 种脂质: 30 种 PE, 含量分别为 33.35%、35.49%、34.53% 和 30.26%; 17 种 PC, 含量分别为 21.77%、20.53%、19.81% 和 12.86%; 3 种 PG, 含量分别为 1.05%、1.32%、0.67% 和 2.33%; 6 种 Hex2Cer, 含量分别为 6.45%、4.62%、4.99% 和 2.94%; 5 种 PS, 含量分别为 30.66%、33.53%、24.04% 和 42.71%; 7 种 PI, 含量分别为 6.72%、4.51%、15.95% 和 8.90%。

**关键词:** 牦牛酥油; 油脂; 磷脂; 脂肪酸组成; 脂质组学

中图分类号: TS225.2; TQ646 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)05-0110-07

## Extraction of phospholipids from yak butter with different solvent and its lipidomics analysis

LEI Youjuan<sup>1</sup>, SUN Wancheng<sup>1</sup>, LUO Yihao<sup>1</sup>, MA Haiqing<sup>2</sup>, KANG Haiyan<sup>3</sup>

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. Animal Husbandry and Veterinary Station of Qilian County, Qilian 810499, Qinghai, China; 3. Animal Husbandry and Veterinary Station of Moqin Town in Qilian County, Qilian 810499, Qinghai, China)

**Abstract:** The effects of different extraction solvents on the yields of oil and phospholipids in yak butter were studied, and fatty acid composition and lipidomics analysis were performed. The results showed that the yields of oil and phospholipid extracted by *n*-hexane from white and yellow yak butter were the highest, with the oil yields of 84.32% and 88.86% respectively, and the phospholipid yields of 11.28% and 12.27% respectively. 33 kinds of fatty acids were detected in white yak butter, including 22 kinds of saturated fatty acids, 11 kinds of unsaturated fatty acids and 6 kinds of branched chain fatty acids. 32 kinds of fatty acids were detected in yellow yak butter, including 20 kinds of saturated fatty acids, 12 kinds of unsaturated fatty acids and 6 kinds of branched chain fatty acids. The saturated fatty acids in white and yellow yak butter account for 74.92% and 73.25% of total fatty acids respectively, unsaturated fatty acids account for 25.09% and 26.75% of total fatty

acids respectively, and branched chain fatty acids account for 9.06% and 5.28% of the total fatty acids respectively. Comparing the fatty acids composition of phospholipids extracted by the five solvents, it was found that the content of unsaturated fatty acids in the phospholipids extracted by *n*-hex-

收稿日期: 2019-08-15; 修回日期: 2019-12-22

基金项目: 青海省科技厅项目(2018-ZJ-728, 2017-ZJ-711)

作者简介: 雷有娟(1994), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与安全(E-mail)1844297031@qq.com。

通信作者: 罗毅皓, 副教授(E-mail)291649347@qq.com。

ane was the highest, it accounted for 10.78% and 22.54% in white butter and yellow butter phospholipid, respectively. Through lipidomics analysis, 6 kinds of lipids were detected in negative ion mode in white butter, yellow butter, white butter phospholipids and yellow butter phospholipids; 30 kinds of PE, with the contents of 33.35%, 35.49%, 34.53% and 30.26%; 17 kinds of PC, with the contents of 21.77%, 20.53%, 19.81% and 12.86%; 3 kinds of PG, with the contents of 1.05%, 1.32%, 0.67% and 2.33%; 6 kinds of Hex2Cer, with the contents of 6.45%, 4.62%, 4.99% and 2.94%; 5 kinds of PS, with the contents of 30.66%, 33.53%, 24.04% and 42.71%; 7 kinds of PI, with the contents of 6.72%, 4.51%, 15.95% and 8.90%.

**Key words:** yak butter; oil; phospholipids; fatty acid composition; lipidomics

牦牛酥油主要成分为脂肪、水分和少量蛋白质,并且含有丰富的微量元素<sup>[1]</sup>和不饱和脂肪酸。牦牛乳的功能性脂肪酸总量比普通牛乳约高3%<sup>[2]</sup>,夏季或者秋季从牦牛乳中提炼出的酥油呈鲜黄色,而冬季牦牛酥油则呈奶白色。研究表明<sup>[3-4]</sup>牦牛酥油功能性脂肪酸含量比原乳丰富,如亚油酸、花生四烯酸、 $\alpha$ -亚麻酸、EPA和DHA。

磷脂(PL)是生物膜的基本组成成分,包括鞘磷脂和甘油磷脂两大类,鞘磷脂主要存在于高等动物组织中,甘油磷脂在动物肝脏、脑及卵巢中含量丰富。目前,PL的分析方法有质谱技术<sup>[5-6]</sup>,核磁共振光谱法<sup>[7-8]</sup>,高效液相色谱(HPLC)串联不同的检测器<sup>[9-10]</sup>,如紫外(UV)检测器、示差折光(RI)检测器、质谱(MS)、蒸发光散射(ELSD)检测器等。脂质组学从2003年提出以来迅速成为研究热点<sup>[11-12]</sup>,是代谢组学的一个重要研究领域,其研究的技术主要包括脂质的提取、分离、分析鉴定以及相应的生物信息学技术。本实验主要围绕牦牛酥油磷脂的提取,脂肪酸组成分析和脂质组学分析展开研究,以期对牦牛酥油的进一步开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

白、黄牦牛酥油购自青海省祁连县野牛沟牧民家;15%三氟化硼甲醇溶液;LC-MS级甲醇、LC-MS级甲基叔丁基醚,CNW Technologies;LC-MS级醋酸铵、LC-MS级氨水、LC-MS级二氯甲烷、LC-MS级异丙醇,默克公司;99% *d7*-PE、99% *d7*-LPC、99% *d7*-TG,Avanti;正己烷、无水乙醇、异丙醇、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、氢氧化钾、氯化钠均为分析纯。

Trace DSQ气相色谱质谱联用仪,赛默飞世尔科技公司;1290 UPLC超高效液相色谱仪,Agilent公司;Triple TOF 6600高分辨质谱,AB Sciex;Heraeus Fresco17离心机,Thermo Fisher Scientific;BSA124S-CW天平,Sartorius;明澈D24 UV纯水仪,Merck Millipore;PS-60AL超声仪;Phenomen Kinetex 1.7 $\mu$ m

C18 100 A 色谱柱(100 m $\times$ 2.1 mm),菲罗门;LC-04C医用离心机;MVS-1旋涡混合器;THZ-82恒温振荡器;JM-B 3003电子天平。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 牦牛酥油磷脂提取

氯仿-甲醇(2:1)提取牦牛酥油磷脂采用Folch法<sup>[13]</sup>。正己烷、乙醇、异丙醇、乙酸乙酯提取牦牛酥油磷脂工艺为:分别称取5份6g牦牛酥油于50 mL离心管中,分别加入6倍体积的不同溶剂,45 $^{\circ}$ C下恒温振荡1 h,之后在3 000 r/min下离心10 min,去除下层蛋白质及其他杂质,取上清液在旋转蒸发器中浓缩油脂,记录油脂质量,之后向提取的油脂中加入丙酮,溶液开始变浑浊时停止加入(丙酮添加量为上清液体积的2~3倍),振荡均匀后在4 $^{\circ}$ C冰箱中静置约25 h,离心分离出离心管底部粗磷脂后用氮气吹干,得到磷脂产品,于-20 $^{\circ}$ C冷冻保存。按下式计算提取的牦牛酥油中油脂得率和磷脂得率。

$$\text{油脂得率} = \frac{\text{油脂质量}}{\text{牦牛酥油原料质量}} \times 100\%$$

$$\text{磷脂得率} = \frac{\text{磷脂质量}}{\text{牦牛酥油原料质量}} \times 100\%$$

#### 1.2.2 脂肪酸组成分析

##### 1.2.2.1 样品甲酯化

取0.5 g样品于具塞试管中,加入10 mL甲醇和1 g氢氧化钾,盖住瓶口,于65 $^{\circ}$ C恒温振荡2 h。取出冷却后,加入浓盐酸酸化至pH 2~3,再加入10 mL正己烷,振荡均匀,静置10 min待其分层,取正己烷层(上层)于另一干燥试管中,氮气吹干正己烷获得游离脂肪酸。加入质量分数为15%的BF<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 1 mL,90 $^{\circ}$ C水浴2 h;取出冷却后,移入离心管中,加2 mL正己烷,振荡,3 500 r/min离心2 min,取正己烷层氮气吹干,待GC-MS分析。

##### 1.2.2.2 GC-MS条件

DB-5MS色谱柱(60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m)。程序升温条件:初始温度60 $^{\circ}$ C,保持1 min;以10 $^{\circ}$ C/min升温至180 $^{\circ}$ C,以4 $^{\circ}$ C/min升温至280 $^{\circ}$ C,

保持 10 min; 以 20 °C/min 升温至 300 °C, 保持 2 min。载气为高纯 He (99.999%), 进样口温度 280 °C, 进样量 1.0 mL/min, 传输线温度 285 °C; 离子源温度 250 °C; 溶剂延迟时间 7 min; 质量扫描范围 ( $m/z$ ) 40 ~ 550。

### 1.2.3 牦牛酥油以及磷脂 UHPLC - QTOF - MS 脂质组学分析

#### 1.2.3.1 样品处理

取 10 mg 样品, 加入 400  $\mu$ L H<sub>2</sub>O、960  $\mu$ L 甲基叔丁基醚 - 甲醇 (MTBE - MeOH, 体积比 5:1, 含 9  $\mu$ L 10 mg/kg *d7* - PE (15:0/18:1)、9  $\mu$ L 10 mg/kg *d7* - LPC (18:1)、9  $\mu$ L 100 mg/kg *d7* - TG (15:0/18:1/15:0)。涡旋 60 s, 超声 10 min 后在 4 °C、3 000 r/min 条件下离心 15 min, 取上清液 500  $\mu$ L; 重新加入 500  $\mu$ L MTBE - MeOH, 涡旋 60 s, 超声 10 min 后继续在 4 °C、3 000 r/min 条件下离心 15 min, 取上清液 500  $\mu$ L; 再次加入 500  $\mu$ L MTBE - MeOH, 涡旋 60 s, 超声 10 min, 4 °C、3 000 r/min 条件下离心 15 min, 取上清液 500  $\mu$ L。合并 3 次上清液后旋干, 用 200  $\mu$ L 二氯甲烷 - 甲醇 (DCM - MeOH, 体积比 1:1) 复溶, 将上清液稀释 20 倍。取 75  $\mu$ L 上清液于 2 mL 进样瓶, 待 UPLC - MS 检测。

#### 1.2.3.2 UPLC - MS 分析条件

流动相 A 为 10 mmol/L HCOONH<sub>4</sub> (甲酸铵) - 40% H<sub>2</sub>O - 60% ACN (乙腈), 流动相 B 为 10 mmol/L HCOONH<sub>4</sub> - 10% ACN - 90% IPA (异丙醇), 梯度洗脱程序见表 1, 进样量 2  $\mu$ L。轰击能量 35 eV, 每 50 ms 15 张二级谱图。ESI 离子源参数: 雾化气压 (GS1) 60 Pa, 辅助气压 60 Pa, 气帘气压 30 Pa, 温度 550 °C, 喷雾电压 -4 500 V。AB 6600 Triple TOF 质谱仪能够在控制软件 (Analyst TF 1.7, AB Sciex) 控制下基于 IDA 功能进行一级、二级质谱数据采集。在每个数据采集循环中, 筛选出强度大于 100 的分子离子进行采集对应的二级质谱数据。

表 1 UPLC 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流速/( $\mu$ L/min)	A/%	B/%
0.00	300	60	40
12.00	300	0	100
13.50	300	0	100
13.70	300	60	40
18.00	300	60	40

#### 1.2.3.3 数据处理

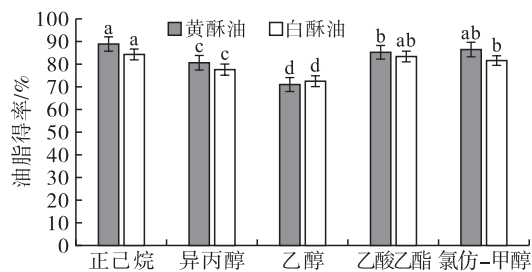
使用 ProteoWizard 软件将质谱转成 mzXML 格式, 再使用 XCMS 软件进行保留时间校正、峰识别、

峰提取、峰积分、峰对齐等工作, minfrac 设为 0.5, cutoff 设为 0.6。使用 XCMS 软件、R 程序包及脂质二级数据库进行脂质鉴定, 再根据加入的内标物质量浓度及其峰面积、各脂质物质峰面积以及 RF 数据代入相应的公式计算样品中脂质物质含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 牦牛酥油的油脂得率及磷脂得率

不同溶剂提取的牦牛酥油中油脂得率如图 1 所示。



注: 不同字母表示均值间有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。下同。

图 1 不同溶剂提取牦牛酥油中油脂得率的比较

从图 1 可以看出: 正己烷、异丙醇、乙醇、乙酸乙酯、氯仿 - 甲醇 5 种溶剂提取牦牛酥油中的油脂得率不同, 黄酥油中油脂的含量高于白酥油, 黄酥油油脂得率依次为正己烷 > 氯仿 - 甲醇 > 乙酸乙酯 > 异丙醇 > 乙醇, 其中正己烷提取的油脂得率最高, 达 88.86%, 乙醇提取的最低, 白酥油油脂得率依次为正己烷 > 乙酸乙酯 > 氯仿 - 甲醇 > 异丙醇 > 乙醇, 其中正己烷提取的油脂得率最高, 达 84.32%, 乙醇提取的最低。

不同溶剂提取牦牛酥油的磷脂得率如图 2 所示。

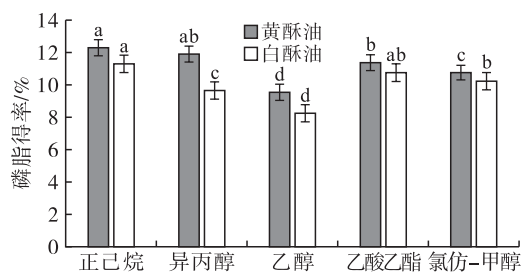


图 2 不同溶剂提取牦牛酥油中磷脂得率的比较

从图 2 可以看出: 正己烷、异丙醇、乙醇、乙酸乙酯、氯仿 - 甲醇 5 种不同溶剂提取牦牛酥油中磷脂得率也不同, 黄酥油中磷脂含量略高于白酥油, 黄酥油磷脂得率依次为正己烷 > 异丙醇 > 乙酸乙酯 > 氯仿 - 甲醇 > 乙醇, 其中正己烷提取的磷脂得率最高, 达 12.27%, 乙醇提取的最低, 白酥油磷脂得率依次为正己烷 > 乙酸乙酯 > 氯仿 - 甲醇 > 异丙醇 > 乙醇, 其中正己烷提取的磷脂得率最高, 达 11.28%, 乙醇提取的最低。

## 2.2 牦牛酥油以及磷脂的脂肪酸组成(见表2)

表2 牦牛酥油及不同溶剂提取牦牛酥油磷脂脂肪酸组成及相对含量

%

脂肪酸	白酥油	不同溶剂提取白酥油磷脂脂肪酸相对含量					氯仿- 甲醇	黄酥油	不同溶剂提取黄酥油磷脂脂肪酸相对含量				
		乙酸乙酯	乙醇	异丙醇	正己烷	氯仿- 甲醇			乙酸乙酯	乙醇	异丙醇	正己烷	氯仿- 甲醇
C10:0	2.03	0.13	0.23	0.10	0.14	0.28	2.91	0.32	0.17	0.15	0.85	0.39	
C12:0	1.93	0.78	0.98	0.47	1.03	0.87	2.97	1.08	0.69	0.61	2.52	1.18	
iso-C13:0	ND	0.04	0.04	ND	ND	0.02	ND	0.04	ND	ND	0.10	0.04	
C13:0	0.09	0.06	0.09	0.08	0.19	0.07	0.11	0.08	0.14	0.06	0.24	0.10	
iso-C14:0	1.20	0.25	0.27	0.15	0.24	0.22	0.39	0.18	0.19	0.14	0.57	0.21	
C14:1	0.17	ND	0.07	ND	ND	ND	0.04	ND	ND	ND	0.28	ND	
C14:0	9.63	11.30	11.23	7.33	11.64	12.75	12.17	11.18	7.55	9.19	9.24	11.74	
iso-C15:0	0.95	0.72	0.70	0.40	0.73	0.58	0.80	0.61	0.48	0.47	1.19	0.61	
anteiso-C15:0	2.34	1.32	1.41	0.80	1.18	0.94	1.93	0.86	1.15	0.63	1.79	0.84	
C15:0	3.16	3.76	2.94	1.92	3.93	4.61	3.32	2.87	1.72	2.30	4.64	3.85	
iso-C16:0	0.96	1.17	1.05	0.75	1.53	1.11	0.22	0.60	0.60	0.53	1.10	0.66	
C16:1 <sub>n-7</sub>	1.27	0.34	0.31	0.36	0.69	ND	0.12	0.13	0.65	0.08	0.91	0.11	
trans-C16:1	ND	ND	0.27	0.23	0.35	0.23	ND	0.16	ND	0.13	0.83	0.24	
C16:0	26.66	32.78	36.90	41.77	27.21	30.11	27.73	32.68	40.99	38.64	17.63	26.71	
iso-C17:0	1.46	1.45	1.21	0.83	2.13	1.81	0.87	0.90	0.64	0.83	1.90	1.24	
anteiso-C17:0	2.16	2.01	1.91	1.23	2.45	1.68	1.06	1.02	1.07	0.90	1.83	1.03	
C17:0	2.91	4.22	2.85	2.14	4.31	5.03	2.07	2.22	1.55	1.97	3.67	3.35	
iso-C18:0	ND	0.58	0.55	0.35	0.68	0.65	ND	0.39	0.36	0.29	0.83	0.51	
C18:2 <sub>n-9</sub>	0.63	0.16	0.10	0.31	0.36	0.03	2.03	0.19	0.34	0.06	1.00	0.06	
C18:1 <sub>n-6</sub>	1.04	3.63	3.69	5.05	6.03	2.02	0.42	4.81	4.71	2.19	7.23	3.33	
C18:1 <sub>n-9</sub>	19.13	3.44	3.72	3.11	1.60	2.44	22.55	3.72	6.69	1.61	8.80	4.25	
trans-C18:1 <sub>n-9</sub>	ND	0.08	0.09	0.08	1.42	0.14	ND	0.29	0.19	0.18	1.31	0.56	
C18:0	14.74	23.93	24.07	26.37	20.15	24.09	14.00	31.42	25.23	35.37	16.64	29.08	
C18:2	0.02	ND	ND	ND	0.33	ND	0.02	0.30	0.64	ND	2.02	0.32	
iso-C19:0	ND	0.16	0.20	ND	0.92	0.18	ND	ND	ND	ND	ND	0.20	
C19:0	0.96	1.45	0.94	0.80	1.64	1.92	0.47	ND	ND	0.54	1.74	1.17	
C19:1	1.11	ND	ND	ND	ND	ND	0.42	ND	ND	ND	ND	ND	
C20:0	1.78	2.96	1.96	1.66	3.27	4.02	1.21	1.76	0.72	1.42	3.28	3.57	
C20:1	1.28	ND	ND	ND	ND	ND	0.68	ND	ND	ND	ND	ND	
C20:4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	ND	ND	ND	ND	ND	
C20:5	0.22	ND	ND	ND	ND	ND	0.31	ND	ND	ND	ND	ND	
C21:0	0.37	0.71	0.48	0.41	1.41	0.96	0.20	0.36	ND	0.27	0.95	0.80	
C22:0	0.81	1.39	0.96	1.35	1.86	1.81	0.50	0.93	1.72	0.70	1.69	1.91	
C22:6	0.16	ND	ND	ND	ND	ND	0.07	ND	ND	ND	ND	ND	
C23:0	0.39	0.65	0.45	1.28	1.23	0.82	ND	0.44	1.22	0.44	0.86	0.92	
C24:0	0.29	0.35	0.31	0.59	0.77	0.49	0.21	0.39	0.57	0.32	0.91	0.86	
C24:1	0.05	ND	ND	ND	ND	ND	0.04	ND	ND	ND	ND	ND	
C25:0	0.05	0.06	ND	ND	ND	0.10	ND	0.04	ND	ND	ND	0.14	
C26:0	0.07	ND	ND	ND	ND	ND	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	
BCFA	9.06	7.69	7.34	4.51	9.85	7.19	5.28	4.59	4.50	3.79	9.31	5.34	
MUFA	24.05	7.54	8.18	8.90	10.09	4.87	24.29	9.13	12.24	4.17	19.52	8.51	
PUFA	1.04	0.16	0.10	0.31	0.69	0.03	2.46	0.49	0.98	0.06	3.02	0.39	
SFA	74.92	92.19	91.72	90.79	88.64	95.09	73.25	90.37	86.78	95.77	74.18	91.10	
MCFA	3.96	0.91	1.21	0.57	1.17	1.15	5.88	1.40	0.86	0.76	3.36	1.57	
LCFA	96.04	98.94	98.75	99.37	98.26	98.81	94.12	98.57	99.14	99.24	93.19	98.41	

注:BCFA为支链脂肪酸,MUFA为单不饱和脂肪酸,PUFA为多不饱和脂肪酸,SFA为饱和脂肪酸,MCFA为中链脂肪酸,LCFA为长链脂肪酸(C13以上),ND表示未检出,iso-表示支链,anteiso表示反式支链,trans表示反式。

从表2可以看出:白酥油中共检出33种脂肪酸,其中饱和脂肪酸22种,不饱和脂肪酸11种,支链脂肪酸6种;黄酥油共检出32种脂肪酸,其中饱和脂肪酸20种,不饱和脂肪酸12种,支链脂肪酸6种。白酥油和黄酥油中饱和脂肪酸含量分别占脂肪酸总量的74.92%和73.25%,不饱和脂肪酸分别占脂肪酸总量的25.09%和26.75%,支链脂肪酸分别占脂肪酸总量的9.06%和5.28%,长链脂肪酸相对含量分别达96.04%和94.12%。

牦牛酥油磷脂中饱和脂肪酸含量最多,其次是单不饱和脂肪酸,多不饱和脂肪酸含量最少。在同一牦牛酥油样品中,不同溶剂提取的磷脂中脂肪酸含量有显著性差异( $P < 0.05$ ),白酥油中MUFA含量从多到少依次为正己烷>异丙醇>乙醇>乙酸乙酯>氯仿-甲醇,黄酥油中MUFA含量从多到少依次为正己烷>乙醇>乙酸乙酯>氯仿-甲醇>异丙醇;白酥油中PUFA含量从多到少依次为正己烷>异丙醇>乙酸乙酯>乙醇>氯仿-甲醇,黄酥油中PUFA含量从多到少依次为正己烷>乙醇>乙

酸乙酯>氯仿-甲醇>异丙醇;白酥油中SFA含量从多到少依次为氯仿-甲醇>乙酸乙酯>乙醇>异丙醇>正己烷,黄酥油中SFA含量从多到少依次为异丙醇>氯仿-甲醇>乙酸乙酯>乙醇>正己烷;白酥油中BCFA含量从多到少依次为正己烷>乙酸乙酯>乙醇>氯仿-甲醇>异丙醇;黄酥油中BCFA含量从多到少依次为正己烷>氯仿-甲醇>乙酸乙酯>乙醇>异丙醇。5种不同溶剂相比较而言,白酥油和黄酥油中以正己烷为提取剂提取的磷脂中MUFA、PUFA和BCFA含量相对较高,而SFA含量相对较低。

### 2.3 牦牛酥油 UPLC-QTOF-MS 脂质组学全定量分析

用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法(UPLC-QTOF-MS)对白色和黄色牦牛酥油以及提取的磷脂进行脂质组学分析,用正、负离子模式分别检测了4个样本,发现负离子模式更适合检测磷脂,因此选用负离子模式。负离子模式下牦牛酥油及磷脂脂质组学测定结果见表3。

表3 负离子模式下牦牛酥油及磷脂脂质组学测定结果

磷脂种类	质荷比	白酥油/(ng/mL)	黄酥油/(ng/mL)	白酥油磷脂/(ng/mL)	黄酥油磷脂/(ng/mL)
PC(14:0/14:0)	722.49	300.81	910.69	1 510.08	463.45
PC(16:0/14:0)	750.53	4 259.98	4 890.91	17 721.23	7 087.51
PC(16:0/15:0)	764.54	4 566.99	4 699.44	13 724.95	4 030.77
PC(14:0/18:1)	776.54	3 005.02	3 159.78	10 157.48	3 351.54
PC(16:0/16:0)	778.56	7 759.65	9 928.40	30 969.06	13 451.34
PC(15:0/18:1)	790.56	2 357.21	2 614.83	9 796.62	2 385.09
PC(16:0/17:0)	792.57	3 298.77	3 354.45	9 165.28	3 682.45
PC(16:0/18:3)	800.54	1 092.73	609.62	2 950.37	1 294.25
PC(16:0/18:2)	802.56	4 158.31	6 181.79	10 829.74	5 097.22
PC(16:0/18:1)	804.58	20 643.91	26 498.74	72 551.94	23 527.47
PC(18:0/16:0)	806.59	2 436.94	4 855.03	9 123.08	7 113.26
PC(17:0/18:1)	818.59	3 421.11	2 135.19	6 870.74	1 780.87
PC(18:0/17:0)	820.60	1 091.48	762.42	1 936.38	1 452.72
PC(18:2/18:1)	828.57	2 237.14	7 951.47	4 858.71	3 760.89
PC(18:1/18:1)	830.59	7 619.88	14 780.80	16 652.00	11 619.02
PC(18:0/18:1)	832.61	6 231.73	12 858.14	20 808.92	13 877.72
PC(20:3/18:1)	854.60	346.81	4 424.65	437.94	420.27
PE(16:0)	452.27	619.13	362.81	1 732.01	431.89
PE(18:2)	476.27	1 816.86	571.35	4 404.61	518.04
PE(18:1)	478.29	5 965.24	1 601.82	18 888.01	988.56
PE(18:0)	480.31	891.78	825.76	2 552.98	998.39
PE(16:0/14:0)	662.47	593.21	572.95	2 048.72	898.16
PE(14:0/18:1)	688.49	2 267.66	2 025.85	8 214.18	2 552.28
PE(16:0/16:0)	690.50	1 122.84	1 067.74	3 906.15	1 748.28
PE(15:0/18:1)	702.51	1 681.58	1 253.68	5 950.96	1 621.69
PE(18:0/15:0)	704.52	580.63	556.68	1 975.13	729.98
PE(16:0/18:3)	712.49	1 370.42	1 902.44	4 677.60	2 676.26
PE(16:0/18:2)	714.51	6 049.36	9 490.37	23 739.41	12 077.96

续表 3

磷脂种类	质荷比	白酥油/(ng/mL)	黄酥油/(ng/mL)	白酥油磷脂/(ng/mL)	黄酥油磷脂/(ng/mL)
PE(16:0/18:1)	716.52	15 227.19	17 254.05	69 720.87	24 664.00
PE(18:0/16:0)	718.53	1 694.89	1 971.62	6 610.46	2 553.27
PE(18:1/17:1)	728.52	1 684.66	2 020.18	6 183.30	2 262.01
PE(17:0/18:1)	730.54	3 291.21	2 922.96	13 518.29	3 353.01
PE(18:1/18:3)	738.51	1 308.87	5 126.93	4 237.21	5 879.16
PE(18:1/18:2)	740.52	7 263.91	23 953.28	24 562.61	28 552.81
PE(18:1/18:1)	742.54	30 229.41	75 076.66	123 261.47	90 886.82
PE(18:0/18:1)	744.55	14 227.64	28 729.75	64 679.59	46 594.16
PE(18:0/18:0)	746.56	1 852.38	3 223.42	6 723.83	4 817.19
PE(19:0/18:1)	758.57	829.56	611.77	2 728.85	747.26
PE(18:0/20:4)	766.54	2 527.78	2 095.95	3 772.94	2 077.13
PE(18:1/20:1)	770.57	1 071.95	1 175.50	2 613.34	1 263.21
PE(18:0/20:1)	772.59	1 019.57	875.24	2 423.61	1 183.39
PE(18:1/21:0)	786.60	335.59	523.39	1 159.54	431.23
PE(P-16:0/18:1)	700.53	2 792.48	1 419.21	3 823.43	2 077.52
PE(P-16:0/20:4)	722.51	2 437.03	860.41	1 009.18	821.27
PE(P-18:0/18:1)	728.56	1 009.42	630.88	1 794.04	1 041.44
PE(P-16:0/22:5)	748.53	1 740.58	956.12	1 107.63	930.76
PE(P-18:0/20:1)	756.60	1 112.32	1 520.38	418.60	310.20
PG(11:0/18:1)	677.45	1 069.25	986.52	1 376.37	11 567.88
PG(19:0/18:2)	787.53	1 176.83	2 442.55	3 821.32	4 761.04
PG(22:0/18:2)	829.58	1 377.72	3 665.89	2 884.76	2 561.40
PS(18:0/18:3)	784.51	6 598.44	24 546.35	20 722.06	27 427.01
PS(18:0/18:2)	786.53	21 709.60	45 404.04	72 960.40	102 882.32
PS(18:1/18:0)	788.53	6 143.35	14 227.45	14 992.56	20 614.08
PS(18:0/18:1)	788.54	47 054.86	77 978.29	88 745.10	152 024.46
PS(18:0/22:5)	836.54	23 849.37	18 452.65	93 896.18	43 865.27
Hex2Cer(d14:0/24:0)	964.69	1 617.15	1 657.63	4 126.89	1 285.80
Hex2Cer(d15:0/24:0)	978.71	2 407.55	2 864.06	6 230.21	1 941.99
Hex2Cer(d14:0/26:1)	990.71	4 968.03	5 168.92	12 942.63	4 951.30
Hex2Cer(d14:0/26:0)	992.72	2 922.15	3 756.98	8 283.77	4 155.06
Hex2Cer(d15:0/26:1)	1 004.72	6 395.41	5 533.52	18 958.27	6 863.29
Hex2Cer(d16:0/26:1)	1 018.74	3 845.79	5 885.92	9 971.91	4 683.23
PI(18:1/16:0)	835.53	387.38	1 153.41	8 509.97	3 221.16
PI(16:0/18:1)	835.53	3 443.26	3 015.43	17 593.87	6 463.13
PI(18:1/18:2)	859.53	1 322.45	2 051.63	10 410.15	2 034.56
PI(18:1/18:1)	861.55	5 549.77	6 379.92	50 749.27	19 368.52
PI(18:0/18:1)	863.56	7 632.00	6 170.39	78 418.17	27 397.54
PI(18:1/20:4)	883.53	1 006.96	1 608.08	6 855.83	5 191.59
PI(18:0/20:4)	885.55	3 747.56	3 932.06	20 686.69	8 619.95

注:PC为磷脂酰胆碱,PE为磷脂酰乙醇胺,PG为磷脂酰甘油,PS为磷脂酰丝氨酸,Hex2Cer为二己糖基神经酰胺,PI为磷脂酰肌醇;括号内分别为磷脂结构一位( $R_1$ )和二位( $R_2$ )所带脂肪酸。

从表3可以看出,在负离子模式下,白酥油、黄酥油、白酥油磷脂和黄酥油磷脂中共检测出5种甘油磷脂(PE、PC、PG、PS、PI)和1种神经酰胺(Hex2Cer)。共鉴定出68种PL,其中PE 30种、PC 17种、PG 3种、PI 7种、PS 5种、Hex2Cer 6种。PE

主要集中在  $m/z$  662 ~ 786 区域,PC 主要集中在  $m/z$  722 ~ 854 区域,PI 主要集中在  $m/z$  835 ~ 885 区域,PS 主要集中在  $m/z$  784 ~ 836 区域。在牦牛白酥油中含量最高的是 PS(18:0/18:1)、PE(18:1/18:1)、PS(18:0/22:5)、PS(18:0/18:2)和 PC(16:0/18:1),

在牦牛黄酥油中含量最多的是 PS(18:0/18:1)、PE(18:1/18:1)、PS(18:0/18:2)、PE(18:0/18:1)和 PC(16:0/18:1),在白酥油磷脂中含量最多的是 PE(18:1/18:1)、PS(18:0/22:5)、PS(18:0/18:1)、PI(18:0/18:1)和 PS(18:0/18:2),黄酥油磷脂中含量最多的是 PS(18:0/18:1)、PS(18:0/18:2)、PE(18:1/18:1)、PE(18:0/18:1)和 PS(18:0/22:5)。它们的 2 条脂肪酸链 sn-1/sn-2 位多数由 18:0 和 18:1 组成,所有的脂肪酰基链有 14~26 个碳,每个链上有 0~5 个双键。

将表 3 数据整理分析得到牦牛酥油及其磷脂中 6 种磷脂的含量分布如图 3 所示。

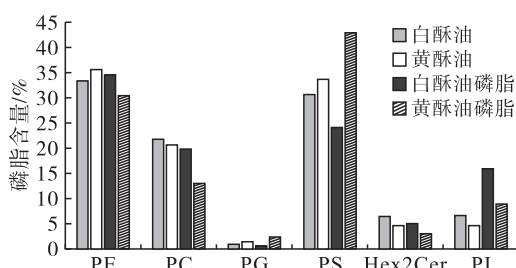


图 3 负离子模式下 4 个样本中不同磷脂含量

从图 3 可以看出,白酥油、黄酥油和自酥油磷脂中 PE 含量最多,分别占 33.35%、35.49% 和 34.53%,其次为 PS,分别占 30.66%、33.53% 和 24.04%,PC 分别占 21.77%、20.53% 和 19.81%,PI 分别占 6.72%、4.51% 和 15.95%,PG 含量最少,分别占 1.05%、1.32% 和 0.67%。而黄酥油磷脂中 PS 含量最多,占 42.71%,其次为 PE,占 30.26%,PC 占 12.86%,PI 占 8.90%,PG 含量最少,占 2.33%。Hex2Cer 在白酥油、黄酥油、白酥油磷脂和黄酥油磷脂中分别占 6.45%、4.62%、4.99% 和 2.94%。

### 3 结论

利用不同提取溶剂(乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、氯仿-甲醇、正己烷)提取了白色和黄色牦牛酥油中油脂和磷脂,发现以正己烷为提取剂时油脂和磷脂得率均较高。经 GC-MS 分析,在白酥油中检出 33 种脂肪酸,其中饱和脂肪酸 22 种,不饱和脂肪酸 11 种,支链脂肪酸 6 种;在黄酥油中检出 32 种脂肪酸,其中饱和脂肪酸 20 种,不饱和脂肪酸 12 种,支链脂肪酸 6 种。牦牛酥油磷脂中饱和脂肪酸含量最多,其次是单不饱和脂肪酸,多不饱和脂肪酸含量最少。但 5 种溶剂相比较而言,在白酥油和自酥油中以正己烷为提取剂提取的磷脂中多不饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸含量相对较高。通过脂质组学分析,白酥油、黄酥油、白酥油磷脂和黄酥油磷脂在

负离子模式下共检测出 30 种 PE、17 种 PC、3 种 PG、6 种 Hex2Cer、5 种 PS 和 7 种 PI。白酥油、黄酥油和自酥油磷脂中 PE 含量最多,其次为 PS、PC 和 PI,PG 含量最少,而黄酥油磷脂中 PS 含量最多,其次为 PE、PC 和 PI,PG 含量最少。

### 参考文献:

- [1] NEUPANEY D, KIM J, ISHIOROSHI M, et al. Study on some functional and compositional properties of yak butter lipid[J]. Anim Sci J, 2015, 74(5):391-397.
- [2] 喻峰,熊华,吕培蕾. 牦牛乳脂肪酸结构与功能特性分析[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1):311-315.
- [3] 苟钰姣,丁路明,王玉鹏. 牦牛乳及乳制品、犏牛和黑白花奶牛乳的脂肪酸组成分析[J]. 草业科学, 2013, 30(2):274-279.
- [4] 喻峰,熊华,吕培蕾. 西藏牦牛酥油脂肪酸成分分析及功能特性评价[J]. 中国油脂, 2006, 31(11):35-38.
- [5] SONG S, CHEONG L, WANG H, et al. Characterization of phospholipid profiles in six kinds of nut using HILIC-ESI-IT-TOF-MS system[J]. Food Chem, 2018, 240:1171-1178.
- [6] 沈清,金仁耀,冯俊丽,等. 基于亲水色谱-质谱技术的刀额新对虾脂质组学研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(7):272-276.
- [7] 庞思勉,张明霞,姬红萍.  $^{31}\text{P}$  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] 俞乐,丛芳,王兴国,等. 不同来源大豆毛油磷脂组成的核磁检测及脂肪酸含量比较[J]. 中国油脂, 2017, 42(1):130-133.
- [9] LIANG P, LI R, SUN H, et al. Phospholipids composition and molecular species of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) roe[J]. Food Chem, 2018, 245:806-811.
- [10] 程新伟,梁鹏,涂晓玲,等. 养殖大黄鱼各部位磷脂组分及其脂肪酸组成分析[J]. 食品工业科技, 2017, 38(4):7-11.
- [11] LI X B, HE Q X, HOU H R, et al. Targeted lipidomics profiling of marine phospholipids from different resources by UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS approach[J]. J Chromatogr B, 2018, 1096:107-112.
- [12] YUAN G, SHIMIN W. Comprehensive analysis of the phospholipids and phytosterols in *Schisandra chinensis* oil by UPLC-Q/TOF-MSE[J]. Chem Phys Lipids, 2019, 221:15-23.
- [13] FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. J Biol Chem, 1957, 226:497-509.