

亲水作用色谱串联质谱结合反相色谱串联质谱的油料磷脂轮廓分析

赵品贞,陶冠军,刘睿杰,常明,金青哲,王兴国

(江南大学食品学院,食品科学与技术国家重点实验室,食品安全与质量控制协同创新中心,江苏无锡214122)

摘要:采用超高效液相色谱串联四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术,建立了一种亲水作用色谱(HILIC)和反相色谱(RPLC)结合的磷脂轮廓分析方法,并对8种植物油料的磷脂分子种(PE、PC、PI、LPE、LPC)进行了系统分析。结果表明:8种油料的PC和PE分子种组成基本相似;PI和LPC、LPE分子种组成差异显著,油菜籽、长柄扁桃仁和美藤果仁的PI含量均高于大豆,油菜籽中PI组成以16:0-18:2和18:1-18:2为主,长柄扁桃仁的PI以16:0-18:1为主,美藤果仁的PI以16:0-18:2和18:2-18:2为主。棉籽和亚麻籽的溶血磷脂含量较高,其中棉籽溶血磷脂的脂肪酸组成以亚油酸为主,亚麻籽中则以油酸为主。该检测方法快速、灵敏、准确,能同时分离多种甘油磷脂、溶血磷脂及其同分异构体。

关键词:亲水作用色谱;串联质谱;油料;磷脂

中图分类号:TS222+.1;TQ646.1 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)09-0085-07

Phospholipids profile analysis of oilseeds by hydrophilic interaction chromatography – tandem mass spectrometry combined with reversed phase liquid chromatography – tandem mass spectrometry

ZHAO Pinzhen, TAO Guanjun, LIU Ruijie, CHANG Ming,
JIN Qingzhe, WANG Xingguo

(Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control, State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Using ultra high performance liquid chromatography – quadrupole – time – of – flight mass spectrometry (UPLC – Q – TOF – MS) technology, a phospholipids profile analysis method combining with hydrophilic chromatography (HILIC) and reversed phase chromatography (RPLC) was established. The molecular species of the main phospholipids in eight oilseeds were comprehensively separated and detected, including PE, PC, PI, LPE and LPC. The results showed that the composition of PC and PE molecular species was generally similar among the eight oilseeds, but the composition of PI, LPC and LPE molecular species was significantly different. The contents of PI in rapeseed, *Amygdalus pedunculata* pall, and *Plukenetia volubilis* Linneo were higher than that in soybean. The main composition of PI in rapeseed was 16:0 – 18:2 and 18:1 – 18:2. In *Amygdalus pedunculata* pall, the main composition was

16:0 – 18:1 and the *Plukenetia volubilis* Linneo was mainly composed of 16:0 – 18:2 and 18:2 – 18:2. Cottonseed and flaxseed had higher lysophospholipid content and fatty acids were mainly linoleic acid for cottonseed, and oleic acid for flaxseed. The method had the items of rapidness, sensitiveness and accuracy, which could realize

收稿日期:2019-12-31;修回日期:2020-01-23

基金项目:国家自然科学基金(31872895);国家食品科学与工程一流学科建设项目(JUFSTR20180202)

作者简介:赵品贞(1994),女,在读硕士,研究方向为脂质营养(E-mail)zhaopinzen@foxmail.com。

通信作者:常明,副教授(E-mail)chang@jiangnan.edu.cn。

the simultaneously separation of various glycerophospholipids, lysophospholipids and their isomers.

Key words: HILIC; Q-TOF-MS; oilseed; phospholipids

磷脂是一类带有磷酸基团的甘油酯,广泛存在于植物油料中。植物油料中的磷脂以磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)等甘油磷脂为主,同时还含有少量的溶血磷脂,即溶血磷脂酰胆碱(LPC)和溶血磷脂酰乙醇胺(LPE),不同来源的油料中磷脂组成各不相同^[1]。近年来,油料中PC和PE被广泛地研究和应用,但其中的PI和溶血磷脂却鲜有报道。有研究表明,PI可以直接参与许多细胞活动,对神经突触的延伸效果极佳,且具有良好的乳化性能^[2-3]。溶血磷脂较甘油磷脂乳化性和抗氧化性更强,在食品、医药和畜牧业等领域得到广泛的应用,市场需求量逐渐增加^[4-5]。此外,同类磷脂的不同分子种的功能也存在显著差异,如二亚油酰磷脂酰胆碱(DLPC)在预防脂肪肝病变和心血管疾病方面的效果更为显著^[6]。因此,系统研究不同油料中的磷脂结构对开发不同需求的多样化的磷脂高端产品具有非常重要的价值。

目前,常用的磷脂检测技术有薄层色谱(TLC)^[7]、核磁共振(³¹P-NMR)^[8-9]、气相色谱(GC)^[10]、液相色谱(LC)^[11]和质谱(MS)^[12-14]等,现有文献中关于油料磷脂分析及结果见表1。前4种分析方法虽然操作相对简单,但是分离效果不好,鉴定磷脂分子种的脂肪酸通常需要甲酯化或分离制备等预处理过程,且一般仅能分析样品中磷脂的总脂肪酸组成,不能鉴定每种磷脂分子连接的脂肪酸种类,因而无法实现对磷脂结构的精确分析。MS通常与LC(HPLC或UPLC)串联可得到磷脂更

为广泛的分子结构信息。MS离子源大多数采用基质辅助激光解吸(Matrix-assisted laser desorption Ionization, MALDI)和电喷雾(Electrospray ionization, ESI),前者分析磷脂需要烦琐的样品预处理和严苛的实验条件,成本较高,因而ESI较之使用更为广泛。LC分为正相液相色谱(NPLC)和反相液相色谱(RPLC)两种模式。近年来,一种非常适合于分离极性和亲水性化合物的亲水作用色谱(Hydrophilic interaction chromatography, HILIC)受到各个领域的关注^[15]。HILIC具有与NPLC相似的保留性能,常使用水/水溶性有机相洗脱体系,克服了NPLC常采用非极性溶剂而与质谱检测器兼容性较差的缺陷^[16],且具有色谱柱渗透性好、反压较低等优势,能基于磷脂亲水头极性的差异将不同类别的磷脂分开。此外,HILIC与RPLC有较好的选择正交性,可进一步根据磷脂非极性尾与固定相之间的疏水相互作用力的差异来分离磷脂分子^[17]。因此,结合这两种分离模式,将能极大地提高磷脂的分离效果。同时,以串联质谱作为检测器,不需标准品即可实现磷脂分子种更准确的定性定量分析,可直接得到磷脂分子侧链结构及其脂肪酸组成。

本文采用HILIC模式和RPLC模式相结合的串联四极杆-飞行时间质谱(Q-TOF-MS)技术,对8种植物油料大豆、葵花籽、棉籽、油菜籽、亚麻籽、水飞蓟籽、长柄扁桃仁、美藤果仁的磷脂轮廓进行了全面分析。

表1 油料磷脂的分析方法及结果

样本	分析方法	磷脂	鉴定结构	参考文献
5种植物油料饼	TLC, ³¹ P-NMR	1种PC, 1种PE, 1种PA, 1种LPC/PI	总脂肪酸组成	[9]
磷虾油	GC-FID, ³¹ P-NMR	3种PC, 3种PE, 1种PI和1种LPC	总脂肪酸组成	[10]
菜籽油	GC-FID, HPLC-UV	1种PC, 1种PE和1种PI	总脂肪酸组成	[11]
拟南芥种子	MALDI-MS	6种PC和6种PI	侧链结构如PC 34:2	[12]
菜籽油	shotgun-ESI-MS/MS	26种PC, 18种PA, 14种PE, 12种PI, 6种PS, 8种LPC, 6种LPS和2种LPE	侧链结构	[13]
2种植物油	Q-TOF-MS	14种PC, 12种PE, 11种PI, 27种PG, 17种PA和20种PS	侧链结构	[14]
大豆	HPLC-ELSD, HPLC-TOF-MS	6种PC	侧链结构及其脂肪酸组成如PC 18:3/18:3	[15]
拟南芥种子	ESI-MS	12种PC和6种PI	侧链结构及其脂肪酸组成	[12]

注:PC为磷脂酰胆碱,PI为磷脂酰肌醇,PG为磷脂酰甘油,PE为磷脂酰乙醇胺,PA为甘油磷脂酸,PS为磷脂酰丝氨酸,LPC为溶血磷脂酰胆碱,LPE为溶血磷脂酰乙醇胺,LPS为溶血磷脂酰丝氨酸。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大豆、葵花籽、棉籽、油菜籽、亚麻籽、长柄扁桃仁、美藤果仁、水飞蓟籽均为市售。

甲醇、氯仿、正己烷、乙醚、异丙醇和乙腈均为色谱纯,美国 TEDIA 高纯溶剂有限公司;氯化钾和乙酸铵,国药有限公司;氮气和氩气(纯度均 $\geq 99.999\%$),太湖气体有限公司。

ACQUITY UPLC、Q-TOF-MS,美国 Waters 公司;AB304-S 型电子天平、SE812 型氮吹仪、固相萃取柱(CNWBOND Si SPE Cartridge, 1 g, 6 mL),上海安谱实验科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 总脂提取

参考 Bligh^[18]的方法进行总脂的提取。油料经粉碎机粉碎后,于 4℃ 保存。将 10 g 样品与 60 mL 氯仿-甲醇溶液(体积比 2:1)混合,超声 20 min 后,过滤得到澄清溶液,向溶液中加入 13.5 mL 氯化钾溶液(质量浓度为 0.88 g/100 mL),将混合物于 4 000 r/min 离心 5 min。取下层有机相在氮气流下吹干,得到油料的总脂。

1.2.2 固相萃取(Solid phase extraction, SPE)纯化磷脂

参照 Avalli 等^[19]的方法,利用 SPE 小柱纯化磷脂。将约 500 mg 提取的总脂溶于 1 mL 氯仿-甲醇溶液(体积比 2:1)中。首先用 3 mL 正己烷活化小柱,然后上样,依次用 3 mL 正己烷-乙醚(体积比 8:2)和 3 mL 正己烷-乙醚(体积比 1:1)洗脱弱极性脂和中性脂,最后用 4 mL 甲醇和 2 mL 氯仿-甲醇-水(体积比 3:5:2)洗脱极性脂。将极性脂溶液在氮气流下吹干,用甲醇溶解至溶液质量浓度为 1 mg/mL,待进样分析。

1.2.3 磷脂分析鉴定

1.2.3.1 HILIC 条件

采用 Xbridge-HILIC 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m, Waters, USA);柱温 45℃;进样器温度 20℃;洗脱液 A 为乙腈,洗脱液 B 为 10 mmol/L 乙酸铵溶液;梯度洗脱程序为 0~2 min 90% A, 2~18 min 90%~60% A, 18~20 min 60%~90% A;流动相流速 0.3 mL/min;进样体积 1 μ L。

1.2.3.2 RPLC 条件

采用 BEH-C18 色谱柱(50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m, Waters, USA);柱温 45℃;进样器温度 20℃;洗脱液 A 为异丙醇-乙腈(体积比 90:10),洗脱液 B 为乙腈-水(体积比 50:50);梯度洗脱程序为 0~1

min 40% A, 1~20 min 40%~100% A, 20~25 min 100%~40% A;流动相流速 0.3 mL/min;进样体积 1 μ L。

1.2.3.3 MS 条件

毛细管电压和锥孔电压分别为 3.5 kV 和 30 eV;离子源温度和脱溶剂气温度分别保持在 100℃ 和 400℃;脱溶剂气流速为 700 L/h。分别采用电喷雾电离源正离子(ESI⁺)和负离子(ESI⁻)扫描;采用全信息串联质谱(MS^E)模式扫描,扫描时间和间隔扫描时间分别为 0.2 s 和 0.02 s;低碰撞能量设置为 6 eV,高碰撞能量范围为 20~30 eV;质量扫描范围为 m/z 50~1 500。在分析过程中,使用亮氨酸脑啡肽(0.3 ng/ μ L)进行精确质量校正(每 30 s),在正离子模式下亮氨酸脑啡肽 m/z 为 556.277 1,在负离子模式下亮氨酸脑啡肽 m/z 为 554.266 0。

1.2.4 数据处理

采用 MassLynx V4.1(Waters, USA)对原始数据进行分析。使用 Origin 9.1 和 Microsoft Excel 2019 进行数据处理和图表绘制,数据以“平均值 \pm 标准偏差”表示。

2 结果与讨论

2.1 不同类型磷脂的分离

根据磷脂极性头的差异,通过 HILIC 对不同类型的磷脂分子进行分离。以亚麻籽为例,其磷脂的总离子流图见图 1。由图 1 可知,磷脂在 20 min 之内被洗脱,分离时间短,色谱峰分离度良好,结合质谱信息即可确认磷脂种类并得到同一类型磷脂中的不同分子的准分子离子的 m/z 。在洗脱过程中,磷脂的洗脱时间在 2.0~14.0 min 之间,洗脱顺序为 PI、PE、LPE、PC 和 LPC,其保留时间分别为:PI 3.30~4.20 min, PE 8.80~9.20 min, LPE 10.00~10.75 min, PC 10.75~12.00 min, LPC 12.50~13.50 min。

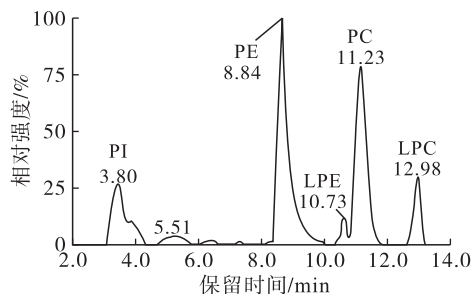


图 1 亚麻籽中磷脂的总离子流图

2.2 不同磷脂分子种的分离鉴定

通过 HILIC-Q-TOF-MS 得到 PC、PE、PI、

LPC 和 LPE 准分子离子的 m/z , 再结合 C18 色谱、 MS^E 扫描模式得到的碎片信息, 准确鉴定不同磷脂分子的结构。图 2 列出了亚麻籽(图 2A)、葵花籽(图 2B)、油菜籽(图 2C)和水飞蓟籽(图 2D)PC 的提取离子色谱图。由图 2 可知, 8.0 ~ 16.0 min 为不同种类的 PC。C18 色谱柱的优势在于可使同一类型磷脂分离出 3 个以上的峰谱, 随后根据其质谱图分析磷脂分子脂肪酸结构。磷脂分子洗脱的顺序与脂肪酸当量碳数(ECN) ($ECN = \text{总碳数} - \text{总双键}$

数 $\times 2$)有关, 保留时间随着 ECN 的增加而延长, 如亚麻籽 PC 分子的洗脱顺序从前到后依次为 ECN 24、26、28、30、32、34。值得注意的是磷脂同分异构体也被分开, 例如亚麻籽 PC 36:3 的 18:1-18:2 和 18:0-18:3 两种磷脂分子(图 2A)以及葵花籽 PC 36:2 的两种结构 18:1-18:1 和 18:0-18:2 均可分开(图 2B)。此方法分离效果好、灵敏度高, 一些含量较低的磷脂分子也得到了鉴定, 如油菜籽 PC 18:2-22:0 分子。

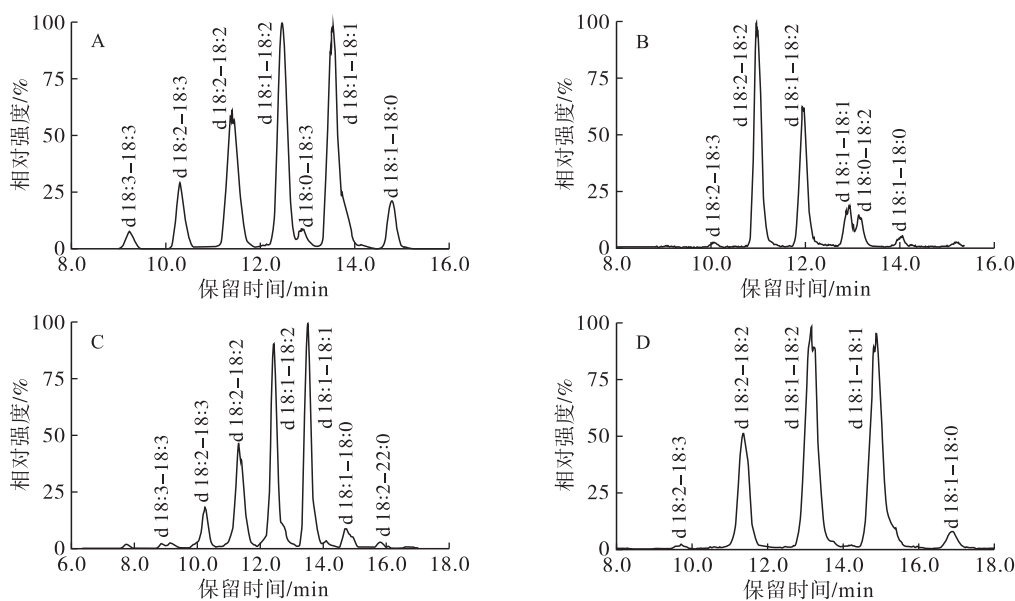


图 2 亚麻籽(A)、葵花籽(B)、油菜籽(C)、水飞蓟籽(D)PC 的提取离子色谱图

采用 MS^E 模式扫描, 通过碰撞能量的高低转换可以在一次进样后得到磷脂分子的准分子离子和相应的碎片离子的 m/z 。磷脂分子在 ESI^+ 模式下, 极性头断裂, 形成中性丢失, 从而产生电信号。磷脂分子产生的准分子离子峰以 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 的形式存在, 且 $[M+H]^+$ 信号强度远高于 $[M+Na]^+$ 。首先, 通过观察 MS^E 模式的低能量下总离子图中准分子离子峰 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 的 m/z , 判断磷脂的相对分子质量。PC 和 PE 的相对分子质量范围在 600 ~ 900 之间, 而 LPC 和 LPE 的相对分子质量范围在 400 ~ 600 之间。其次, 通过在高能量下得到的磷脂特征性碎片可以初步确定磷脂分子的种类, 如 PC 和 LPC 在正离子模式下能产生 m/z 184 的特征碎片离子 $[HPO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3]^+$, PE 和 LPE 能产生特征碎片离子 $[M+H-C_2H_8NO_4P]^+$ 。最后, 根据磷脂对应的脂肪酸碎片离子 $[M-R_1+H]^+$ 和磷脂极性头碎片离子的 m/z , 计算得到两条酰基侧链上的脂肪酸的相对分子质量, 最终得到磷脂的分子结构。以亚麻籽磷脂保留时间为 14.79

min 的色谱峰(图 2A)为例: 低能量状态下(图 3A)的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 788.6882, $[M+Na]^+$ 为 m/z 810.6640, 从而确定其相对分子质量为 787; 高能量状态下(图 3B)的 3 个碎片离子峰 $[M+H-HPO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3]^+$ 、 $[HPO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3]^+$ 、 $[HPO_4(CH_2)_2H]^+$ 分别为 m/z 601.5693、 m/z 184.0956 和 m/z 86.1077, 确定其为一种 PC 分子, 侧链结构为 36:1, 另一碎片离子峰 $[M+H-C_{16}H_{31}CH=O-H_2O]^+$ 为 m/z 506.4079, 计算得到该磷脂分子的 2 种脂肪酸的相对分子质量分别为 282 和 284, 分别对应油酸和硬脂酸, 故此磷脂为 PC 18:1-18:0。

PI 在 ESI^+ 和 ESI^- 模式下均有响应, 在 ESI^+ 条件下, PI 形成 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰; 在 ESI^- 条件下, PI 形成 $[M-H]^-$ 离子, 在高能量下产生 m/z 约 241 的特征碎片离子 $[C_6H_{10}O_8P]^-$, 同时磷脂酰基端断裂产生 $[RCOO]^-$ 的碎片离子以及 $[M-H-RCOOH]^-$ 。以棉籽 PI 中 1 个色谱峰为例: 低能量状态下(图 4A)的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z

833.559 9, 确定其相对分子质量为 834; 高能态下(图 4 B)的 4 个碎片离子峰 $[C_3H_5O_5P]^-$ 、 $[C_6H_{10}O_8P]^-$ 、 $[M-H-C_{16}H_{32}O_2]^-$ 、 $[M-H-C_{18}H_{32}O_2]^-$ 分别为 m/z 152.993 7、241.005 8、

553.267 7、577.288 9, 确定其为一种 PI 分子, 侧链结构为 34:2, 计算得到脂肪酸的相对分子质量为 256、280, 分别对应棕榈酸和亚油酸, 故此磷脂为 PI 16:0-18:2。

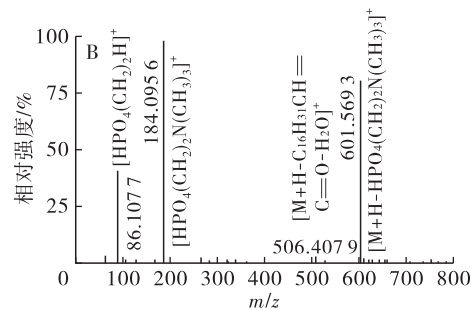
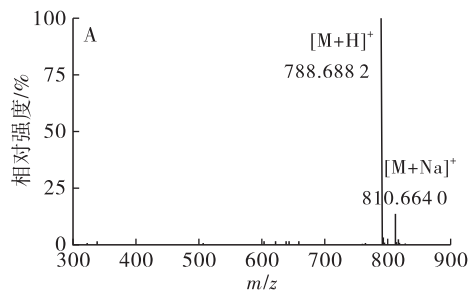


图 3 亚麻籽 PC 18:1-18:0 的低能量(A)和高能量(B) ESI⁺ 质谱图

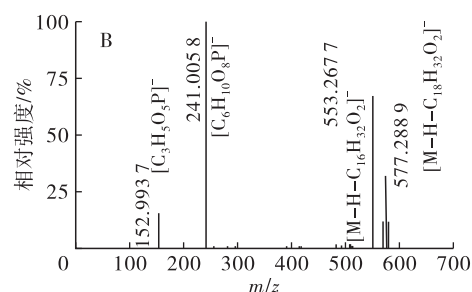
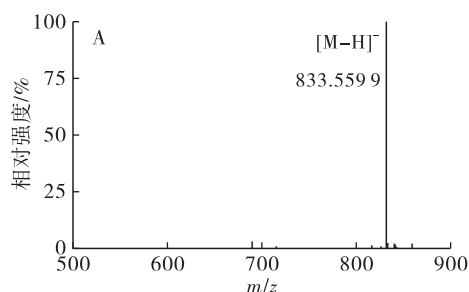
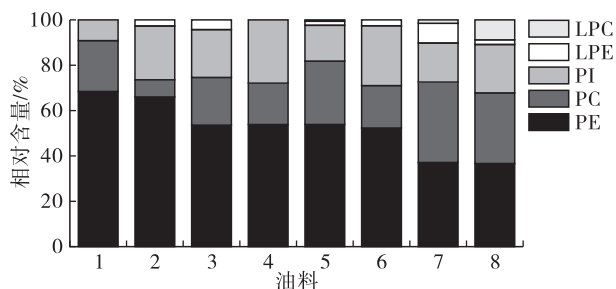


图 4 棉籽 PI 16:0-18:2 的低能量(A)和高能量(B) ESI⁻ 质谱图

2.3 8 种植物油料的磷脂组成

通过以上方法检测, 采用面积归一化法计算磷脂含量, 8 种植物油料中磷脂分子的组成及相对含量见图 5。由图 5 可知, 油料中 PE、PC 和 PI 的含量最为丰富, 大豆、葵花籽、棉籽中磷脂含量顺序是 PE > PC > PI, 这与文献 [20] 结果一致。值得关注的是, 油菜籽 ((27.8 ± 3.48)%)、长柄扁桃仁 ((26.31 ± 2.08)%) 和美藤果仁 ((23.77 ± 1.40)%) 中的 PI 含量较高, 均超过大豆 ((21.25 ± 1.85)%)。因此, 油菜籽、长柄扁桃仁和美藤果仁可考虑作为提供 PI 的油料原料。对比其他油料, 棉籽和亚麻籽的溶血磷脂(LPC 和 LPE) 含量较高, 分别为 (10.26 ± 1.58)% 和 (10.93 ± 0.41)%, 高于大豆 ((4.24 ± 0.12)%), 另外在葵花籽和油菜籽中未发现溶血磷脂。



注: 1. 葵花籽; 2. 美藤果仁; 3. 大豆; 4. 油菜籽; 5. 水飞蓟籽; 6. 长柄扁桃仁; 7. 棉籽; 8. 亚麻籽。

图 5 油料的磷脂种类及含量

对 8 种植物油料的 5 类磷脂的分子种进行了分析, 结果如表 2 所示。与 Imbs^[21]、Beermann^[22]、Wang^[23] 等的研究相比, 除 PC 和 PE 之外, 本文还实现了对 PI、LPC 和 LPE 的分离鉴定, 并确定了其脂肪酸组成。由表 2 可知, 8 种植物油料中 PC 和 PE 的脂肪酸组成多以棕榈酸、油酸、亚油酸和亚麻酸为主, 另外, 多种油料的 PC 中含有少量的硬脂酸以及油菜籽的 PC 中含有少量的山萘酸。8 种油料的 PC 和 PE 分子种组成基本相似, 分别以 PC18:1-18:2、PC18:2-18:2 和 PE16:0-18:2、PE18:2-18:2 为主。而油料的 PI 和溶血磷脂(LPC 和 LPE) 分子种组成差异明显, 油菜籽的 PI 以 16:0-18:2 ((26.53 ± 2.56)%) 和 18:1-18:2 ((28.29 ± 2.45)%) 为主, 长柄扁桃仁的 PI 以 16:0-18:1 ((56.10 ± 3.96)%) 为主, 美藤果仁的 PI 以 16:0-18:2 ((24.83 ± 2.37)%) 和 18:2-18:2 ((19.13 ± 0.21)%) 为主。棉籽的溶血磷脂脂肪酸组成以亚油酸为主, LPC 18:2 和 LPE 18:2 占比分别为 (49.39 ± 2.67)% 和 (47.17 ± 3.30)%。亚麻籽的溶血磷脂脂肪酸以油酸为主, LPC 18:1 和 LPE 18:1 占比分别为 (38.34 ± 2.94)% 和 (26.49 ± 1.21)%。

表 2 8 种油料的磷脂分子种及含量

准分子离子峰 m/z ^a	磷脂	脂肪酸	相对含量 ^b /%										
			大豆	葵花籽	棉籽	油菜籽	亚麻籽	水飞蓟籽	长柄扁桃仁	美藤果仁			
714.5	PE 34:3	16:0-18:3	6.43 ± 0.54			2.68 ± 0.21	5.46 ± 0.21						
716.5	PE 34:2	16:0-18:2	24.92 ± 0.20	28.31 ± 0.20	36.95 ± 3.74	9.05 ± 2.31	15.89 ± 2.36	19.20 ± 1.69	24.52 ± 2.60	7.86 ± 0.45			
718.5	PE 34:1	16:0-18:1	5.81 ± 0.32	3.45 ± 0.26	11.73 ± 2.57	10.27 ± 2.45	9.63 ± 0.89	18.52 ± 2.47	7.84 ± 1.03	48.10 ± 3.80			
738.5	PE 36:5	18:2-18:3	17.64 ± 2.31	1.01 ± 0.02		8.55 ± 0.36	12.68 ± 2.61	0.45 ± 0.02	1.79 ± 0.03	2.86 ± 0.36			
740.5	PE 36:4	18:2-18:2	31.88 ± 2.69	42.04 ± 3.60	28.55 ± 2.70	21.02 ± 3.45	24.08 ± 3.56	20.48 ± 0.37	30.35 ± 2.20	10.71 ± 0.80			
742.5	PE 36:3	18:1-18:2	5.61 ± 1.20	12.47 ± 0.11	13.75 ± 1.27	23.87 ± 2.69	19.42 ± 1.45	25.17 ± 3.78	24.64 ± 3.42	24.05 ± 2.41			
744.5	PE 36:2	18:1-18:1	7.72 ± 0.11	12.72 ± 2.10	9.02 ± 0.34	24.55 ± 3.00	12.84 ± 0.13	16.18 ± 2.36	10.86 ± 1.24	6.43 ± 0.90			
778.6	PC 36:6	18:3-18:3	2.24 ± 0.02			0.65 ± 0.01	1.69 ± 0.04						
780.6	PC 36:5	18:2-18:3	19.40 ± 1.21	0.99 ± 0.03	0.43 ± 0.09	6.37 ± 2.04	6.77 ± 1.58	0.53 ± 0.01	1.03 ± 0.02	9.35 ± 1.54			
782.6	PC 36:4	18:2-18:2	54.72 ± 2.52	48.98 ± 2.64	34.36 ± 1.02	20.59 ± 2.12	21.38 ± 3.37	18.04 ± 0.17	21.41 ± 3.64	33.32 ± 2.45			
784.6	PC 36:3	18:1-18:2	21.30 ± 2.21	32.11 ± 2.48	39.12 ± 2.23	33.65 ± 1.89	30.09 ± 2.30	40.41 ± 2.60	42.19 ± 2.46	38.87 ± 1.32			
784.5	PC 36:3	18:0-18:3						1.94 ± 0.21					
786.5	PC 36:2	18:1-18:1	0.59 ± 0.04	9.29 ± 2.34	16.92 ± 1.48	34.64 ± 1.61	32.81 ± 2.25	38.60 ± 1.40	30.81 ± 1.52	6.32 ± 1.22			
786.6	PC 36:2	18:0-18:2	1.75 ± 0.03	6.35 ± 2.32	6.32 ± 1.24					12.14 ± 0.56			
788.6	PC 36:1	18:0-18:1		2.29 ± 0.05	2.84 ± 0.06	3.46 ± 1.01	5.31 ± 1.77	2.42 ± 0.31	4.55 ± 0.25				
844.5	PC 40:2	18:2-22:0				0.63 ± 0.01							
831.5	PI 34:3	16:0-18:3	3.60 ± 0.03	2.18 ± 0.02	18.03 ± 1.02	7.42 ± 0.03		6.01 ± 0.45		13.76 ± 2.21			
833.5	PI 34:2	16:0-18:2	10.87 ± 2.31	14.84 ± 1.30	19.42 ± 2.61	26.53 ± 2.56		22.02 ± 1.14		24.83 ± 2.37			
835.5	PI 34:1	16:0-18:1	15.90 ± 0.46	3.45 ± 0.05	5.58 ± 0.12	6.38 ± 1.08	26.25 ± 1.16	4.89 ± 0.23	56.10 ± 3.96	15.77 ± 2.61			
853.5	PI 36:6	18:3-18:3	23.46 ± 1.04			3.38 ± 0.02	25.63 ± 2.41						
855.5	PI 36:5	18:2-18:3		19.43 ± 1.52		8.04 ± 1.05	13.13 ± 1.34	13.52 ± 2.30		17.11 ± 2.47			
857.5	PI 36:4	18:2-18:2	23.46 ± 0.21	34.74 ± 0.21	38.05 ± 3.71	19.97 ± 0.21	11.25 ± 0.21	30.11 ± 0.21	14.45 ± 0.21	19.13 ± 0.21			
859.5	PI 36:3	18:1-18:2	5.11 ± 0.06	8.87 ± 0.68	18.93 ± 3.69	28.29 ± 2.45	10.63 ± 2.31	23.44 ± 1.29	15.95 ± 0.37				
861.5	PI 36:2	18:1-18:1	6.09 ± 0.01	4.75 ± 0.06			13.13 ± 1.71		8.26 ± 0.18				
863.5	PI 36:1	18:0-18:1	11.52 ± 0.73	11.74 ± 1.80					5.25 ± 1.53	9.40 ± 1.67			
454.3	LPE 16:0	16:0	21.63 ± 0.67		24.31 ± 1.55		17.27 ± 3.36	14.94 ± 2.14	21.69 ± 3.41	22.79 ± 2.18			
476.3	LPE 18:3	18:3	10.14 ± 0.20		3.77 ± 0.07		16.51 ± 2.42	4.02 ± 0.86	8.24 ± 0.22	14.78 ± 2.37			
478.3	LPE 18:2	18:2	57.98 ± 3.52		47.17 ± 3.30		32.25 ± 3.43	37.36 ± 2.01	28.63 ± 3.12	41.89 ± 3.21			
480.3	LPE 18:1	18:1	5.82 ± 0.33		19.53 ± 2.98		26.49 ± 1.21	37.93 ± 3.64	30.15 ± 1.12	8.83 ± 0.25			
482.3	LPE 18:0	18:0	4.44 ± 1.78		5.22 ± 0.25		7.49 ± 0.43	5.75 ± 0.73	11.28 ± 2.11	11.70 ± 0.39			
496.3	LPC 16:0	16:0			19.59 ± 0.20		12.65 ± 2.36	13.58 ± 1.47					
518.3	LPC 18:3	18:3					9.88 ± 1.69						
520.4	LPC 18:2	18:2			49.39 ± 2.67		30.83 ± 1.67	38.27 ± 1.35					
522.4	LPC 18:1	18:1			26.94 ± 1.32		38.34 ± 2.94	48.15 ± 3.30					
524.4	LPC 18:0	18:0			4.08 ± 1.45		8.30 ± 1.45						

注:a 为 PC、PE、LPC、LPE 的准分子离子峰为 $[M+H]^+$, PI 的准分子离子峰为 $[M-H]^-$; b 为不同分子结构的磷脂占该类磷脂总量的比例。

3 结论

联合应用 HILIC-Q-TOF-MS 与 RPLC-Q-TOF-MS 技术快速准确地分析了 8 种植物油料的磷脂组成。结果表明,8 种油料的 PC 和 PE 分子种组成基本相似,分别以 PC18:1-18:2、PC18:2-18:2 和 PE16:0-18:2、PE18:2-18:2 为主。PI 和溶血磷脂(LPC 和 LPE)分子种组成差异明显,油菜籽((27.8 ± 3.48)%)、长柄扁桃仁((26.31 ± 2.08)%)和美藤果仁((23.77 ± 1.40)%)的 PI 含量均高于大豆((21.25 ± 1.85)%),这 3 种油料可作为 PI 的新型来源。油菜籽的 PI 以 16:0-18:2 和

18:1-18:2 为主,长柄扁桃仁的 PI 以 16:0-18:1 为主,美藤果仁的 PI 以 16:0-18:2 和 18:2-18:2 为主。棉籽和亚麻籽的溶血磷脂含量较高,其中棉籽溶血磷脂的脂肪酸组成以亚油酸为主,亚麻籽中则以油酸为主。

本文采用 HILIC 色谱,使用乙腈和水为流动相,与质谱检测器兼容性更好,分离效果极佳,灵敏度高,能同时分离鉴定出 PC、PE、PI、LPC 和 LPE,使定性分析和定量分析更为准确,并通过 C18 反相色谱柱分离出磷脂的同分异构体。此外,本文采用 MS^E 扫描模式,样品不需要进行甲酯化等复杂预处理,根

据得到的准分子离子和碎片离子信息直接推断油料磷脂脂肪酸组成。PC 和 LPC 的特征碎片离子为 $[\text{HPO}_4(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_3]^+$, PE 和 LPE 的特征碎片离子为 $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_2\text{H}_8\text{NO}_4\text{P}]^+$, PI 的特征碎片离子为 $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_8\text{P}]^-$ 。本研究可为植物油料中磷脂的分离分析提供新方法,为油料中具有特殊生理功能的磷脂产品的开发奠定了基础。

参考文献:

- [1] AMBROSEWICZ - WALACIK M, TAŃSKA M G, ROTKIEWICZ D. Phospholipids of rapeseeds and rapeseed oils: factors determining their content and technological significance—a review[J]. Food Rev Int, 2015,31(4):385-400.
- [2] MCLAUGHLIN S, MURRAY D. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics[J]. Nature, 2005,438(7068):605-611.
- [3] 王强,曹栋,史苏佳,等.大豆磷脂酰肌醇的提取工艺研究[J].食品工业科技,2014,35(9):211-215.
- [4] BOONTIAM W, HYUN Y K, JUNG B, et al. Effects of lysophospholipid supplementation to reduced energy, crude protein, and amino acid diets on growth performance, nutrient digestibility, and blood profiles in broiler chickens [J]. Poultry Sci, 2019,98(12):6693-6701.
- [5] 樊坤,伊艳杰,刘阳.大豆溶血磷脂的制备及其生物安全性分析[J].中国油脂,2019,44(6):124-132.
- [6] 凌文慧.酶法制备高含量二亚油酰磷脂酰胆碱的研究[D].江苏无锡:江南大学,2011.
- [7] YANG L, WANG W, ZHANG J. TLC determination of phosphatidylcholine in soybean phospholipid and egg phospholipid[J]. Chin J Pharmac Anal, 2005,25(9):1067-1069.
- [8] ZHU D, HAYMAN A, KEBEDE B, et al. ^{31}P NMR - based phospholipid fingerprinting of powdered infant formula[J]. J Agric Food Chem, 2019,67(36):10265-10272.
- [9] CANSELL M, BARDEAU T, MORVAN E, et al. Phospholipid profiles of oleaginous pressed cakes using NMR and gas chromatography[J]. J Am Oil Chem Soc, 2017,94(9):1219-1223.
- [10] AKANBI T O, BARROW C J. Compositional information useful for authentication of krill oil and the detection of adulterants [J]. Food Anal Meth, 2018,11(1):178-187.
- [11] CHOE J, CHOE E. Effect of soy - derived phospholipid on the autoxidation of canola oil in a water/oil emulsion [J]. J Am Oil Chem Soc, 2016,93(8):1085-1094.
- [12] STURTEVANT D, DUENAS M E, LEE Y, et al. Three - dimensional visualization of membrane phospholipid distributions in *Arabidopsis thaliana* seeds: a spatial perspective of molecular heterogeneity [J]. Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lipids, 2017,1862(2):268-281.
- [13] XIE Y, WEI F, XU S, et al. Profiling and quantification of lipids in cold - pressed rapeseed oils based on direct infusion electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2019,285:194-203.
- [14] ZITOUNI M, WEWER V, DOERMANN P, et al. Quadrupole time - of - flight mass spectrometry analysis of glycerophospholipid molecular species in the two halophyte seed oils: *Eryngium maritimum* and *Cakile maritima*[J]. Food Chem, 2016,213:319-328.
- [15] CHRISTIAN V, CARINA W, CRISTINA C, et al. Separation and identification of phospholipids by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem high resolution mass spectrometry with focus on isomeric phosphatidylglycerol and bis (monoacylglycerol) phosphate [J]. J Chromatogr A, 2018,1565:105-113.
- [16] TAN B, NEGAHBAN A, MCDONALD T, et al. Utilization of hydrophilic - interaction LC to minimize matrix effects caused by phospholipids[J]. Bioanalysis, 2012,4(16):2049-2058.
- [17] ZHU C, DANE A, SPIJKSMA G, et al. An efficient hydrophilic interaction liquid chromatography separation of 7 phospholipid classes based on a diol column [J]. J Chromatogr A, 2012,1220:26-34.
- [18] BLIGH E. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1959,37:911-917.
- [19] AVALLI A, CONTARINI G. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD [J]. J Chromatogr A, 2005,1071(1/2):185-190.
- [20] 毕艳兰.油脂化学[M].北京:化学工业出版社,2005:131-132.
- [21] IMBS A B, PHAM L Q. Lipid composition of ten edible seed species from North Vietnam [J]. J Am Oil Chem Soc, 1995,72(8):957-961.
- [22] BEERMANN C, GREEN A, MOBIUS M, et al. Lipid class separation by HPLC combined with GC FA analysis: comparison of seed lipid compositions from different *Brassica napus* L. varieties [J]. J Am Oil Chem Soc, 2003,80(8):747-753.
- [23] WANG X, LI P, ZHANG W, et al. Detection of phospholipid compounds in soybean and soybean oil samples using ultrasonic extraction and normal - phase HPLC with UV detection [J]. J Instrum Anal, 2011,30(5):527-531.