

基于 SPE – HILIC – QTOF – MS 技术鉴定 巴氏杀菌乳中的磷脂成分

顾竞一, 李夏冰, 廖光琴, 王天彩, 王子双, 贾 琪, 张星联, 钱永忠, 邱 静

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业农村部农产品质量安全重点实验室, 北京 100081)

摘要: 为了全面认识巴氏杀菌乳的磷脂组成, 并为乳磷脂研究提供数据基础, 建立了一种固相萃取 (SPE) 结合亲水作用液相色谱 (HILIC) – 四极杆飞行时间 (QTOF) – 质谱 (MS) 技术鉴定巴氏杀菌乳中磷脂的方法, 对脂质提取、SPE 以及 MS 条件进行优化, 并对 4 种哺乳动物 (骆驼、山羊、水牛、奶牛) 巴氏杀菌乳磷脂组成进行了分析。结果表明: 选取 4 mL 二氯甲烷 – 甲醇 (体积比 2:1) 溶剂提取 1 mL 样品中的脂质, 通过 10 mL 正己烷和 10 mL 异丙醇 – 二氯甲烷 (体积比 3:7) 的两步淋洗与 2 mL 甲醇一步洗脱分离磷脂组分; 选择 3 次迭代采集样品 MS/MS 信息; 在 4 种哺乳动物巴氏杀菌乳中共鉴定出涵盖 7 个磷脂亚类的 580 个磷脂分子, 包括 116 个鞘磷脂、18 个心磷脂、181 个磷脂酰乙醇胺、262 个磷脂酰胆碱、1 个磷脂酰甘油、1 个磷脂酰肌醇和 1 个磷脂酰丝氨酸。综上, SPE – HILIC – QTOF – MS 分析方法可有效鉴定乳品中的磷脂组成。

关键词: 磷脂; 固相萃取; 亲水作用液相色谱 – 四极杆飞行时间 – 质谱

中图分类号: TS252.2; O657 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2025)05-0141-09

Identification of phospholipids in pasteurized milk using SPE – HILIC – QTOF – MS

GU Jingyi, LI Xiabing, LIAO Guangqin, WANG Tiancai, WANG Zishuang,
JIA Qi, ZHANG Xinglian, QIAN Yongzhong, QIU Jing

(Key Laboratory for Quality and Safety of Agricultural Products of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Chinese Academy of Agricultural
Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to comprehensively understand of pasteurized milk phospholipids composition and provide a data base for milk phospholipid research, a solid – phase extraction (SPE) combined with hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – quadrupole – time – of – flight (QTOF) – mass spectrometry (MS) technique was developed for the identification of phospholipids in pasteurized milk. Lipid extraction, SPE, and MS conditions were optimized and the phospholipid composition of pasteurized milk from four mammalian species (camel, goat, buffalo and cow) was analyzed. The results showed that 4 mL of dichloromethane – methanol (volume ratio 2:1) was selected to extract the lipid from 1 mL of the sample, and the phospholipid fractions were separated by a two – step washing of 10 mL of *n* – hexane and 10 mL of isopropanol – dichloromethane (volume ratio 3:7) with a one – step elution of 2 mL of methanol;

three iterations were selected to collect the MS/MS information of the sample. A total of 580 phospholipid molecules covering 7 subclasses were identified, including 116 sphingomyelins, 18 cardiolipins, 181 phosphatidylethanolamines, 262 phosphatidylcholines, 1 phosphatidylglycerol, 1 phosphatidylinositol and 1 phosphatidylserine. In

收稿日期: 2024-01-21; 修回日期: 2024-12-25

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项 (2022YFF0606800); 中国农业科学院基本科研业务费专项 (1610072022007, Y2023PT19)

作者简介: 顾竞一 (1998), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品科学 (E-mail) msy_361@163.com。

通信作者: 邱 静, 研究员, 博士 (E-mail) qiuqing@caas.cn。

conclusion, the SPE – HILIC – QTOF – MS analytical method can effectively identify the composition of phospholipids in dairy products.

Key words: phospholipid; solid – phase extraction; hydrophilic interaction liquid chromatography – quadrupole – time – of – flight – mass spectrometry

磷脂(PL)根据骨架不同可分为甘油磷脂(GP)与鞘磷脂(SM)两大类,根据极性头基的不同,GP又可进一步分为磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)、心磷脂(CL)等。磷脂因其重要的生物学作用而受到广泛关注,例如,膳食乳磷脂已被证实可以促进神经发育^[1]、增强儿童认知能力^[2]、缓解压力^[3]等,并可作为母乳产品的补充剂^[4]。乳品是人类摄入磷脂的主要来源之一,其中巴氏杀菌乳因最大限度地维持了生乳的营养成分和风味,在全球范围内占据了较大市场份额(约为70%)^[5]。因此,准确认识巴氏杀菌乳中磷脂组成具有重要意义。

乳品中的磷脂浓度远低于甘油酯,且在分析过程中易受甘油酯电离抑制效应的影响,因此对脂质提取物进行分离纯化去除干扰物质通常有助于磷脂的检测分析。固相萃取(SPE)是一种有效的技术手段,可用于将磷脂与甘油酯分离。相较于SPE,色谱分离技术为磷脂提供了更精细的分离效果。其中,亲水作用液相色谱(HILIC)使用水和有机溶剂混合物作为流动相,与质谱(MS)结合使用时表现出优异的兼容性^[6],是分离极性和可电离化合物的可靠技术。此外,HILIC还能将相同亚类的磷脂集中在特定的保留时间窗口内,有利于磷脂的同类鉴定。目前,SPE和HILIC已被广泛用于乳制品中磷脂的分析,如:Ali^[7]、Wei^[8]等采用SPE – HILIC – MS联用技术,分别对不同哺乳动物奶粉和不同哺乳动物乳中的磷脂进行了研究,分别鉴定到73个和167个磷脂分子;Mou等^[9]采用HILIC – MS联用技术从不同加工方式的牛乳中共鉴定出175个磷脂分子;Song等^[10]则通过HILIC – MS联用技术,在不同泌乳期母乳中鉴定出258个磷脂分子。

然而,目前在乳制品中鉴定到的磷脂数量与其实际存在的磷脂数量之间仍存在一定差距。这可能归因于几个因素:①样品中不同物质的浓度相差多个数量级,高浓度脂质会部分或完全抑制低浓度脂质的信号^[11];②来自复杂样本的脂质检

测信号往往受到内源性和外源性化学噪声的影响^[12];③结构所致的低电离效率使低丰度磷脂的母离子和子离子MS信号难以被检测^[13]。因此,本研究以4种哺乳动物(骆驼、山羊、水牛、奶牛)巴氏杀菌乳为载体,采用SPE – HILIC – 四极杆飞行时间(QTOF) – MS对巴氏杀菌乳的磷脂成分进行鉴定,通过对脂质提取、SPE以及MS条件进行优化,获得具有更全面挖掘磷脂组成的方法,并进一步细化和深入地全面分析巴氏杀菌乳的磷脂组成,为乳磷脂研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

4种哺乳动物巴氏杀菌乳样品(骆驼乳、山羊乳、水牛乳和奶牛乳),均购自线上商城;乙腈、异丙醇,美国赛默飞公司;甲酸、乙酸铵,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;二氯甲烷、甲醇和正己烷,均为色谱纯,德国默克公司;十五烷酸甘油三酯[TG(15:0/15:0/15:0)]、十七烷酸甘油三酯[TG(17:0/17:0/17:0)]、三油酸甘油三酯[TG(18:1/18:1/18:1)]、1,2-二月桂酰-sn-甘油[DG(12:0/12:0/0:0)]、C24:0神经酰胺[Cer(d18:1/24:0)]、C24:0二氢神经酰胺[DihydroCer(d18:0/24:0)]、C8:0葡萄糖基神经酰胺[GluCer(d18:1/8:0)]、C16:0葡萄糖基神经酰胺[GluCer(d18:1/16:0)]、C18:0葡萄糖基神经酰胺[GluCer(d18:1/18:0)]、C24:1葡萄糖基神经酰胺[GluCer(d18:1/24:1)]、1-十七烷基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺[PE(17:0/0:0)]、1-十五烷酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱[PC(15:0/0:0)]、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺[PE(16:0/18:1)]、1-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-肌醇)[PI(18:0/0:0)]、1-棕榈酰-2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱[PC(16:0/14:0)]、1-硬脂酰-2-亚油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱[PC(18:0/18:2)]、1,2-二神经酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱[PC(24:1/24:1)]和C18:0鞘磷脂[SM(d18:1/18:0)]等脂质标准品,美国Avanti Polar

Lipids 公司。

1.1.2 仪器与设备

Cleanert NH₂ 固相萃取柱 (500 mg/6 mL), 天津博纳艾杰尔科技有限公司; 1290 Infinity II 液相色谱系统、6545B LC - ESI - Q/TOF 质谱分析仪, 美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

1.2.1.1 脂质提取

使用 Folch 法^[14]并稍作修改提取 4 种哺乳动物巴氏杀菌乳样品中的脂质。于 15 mL 离心管中加入 1 mL 样品, 依次添加含有 0.2% 甲酸的 4 mL 二氯甲烷 - 甲醇 (体积比 2:1) 溶液和 1 mL 超纯水, 涡旋混匀并在冰水浴中静置 10 min, 在 4 ℃、8 000 r/min 下离心 5 min, 收集下层有机相, 按上述步骤再重复提取 1 次, 合并下层有机相, 氮吹至干并用 1 mL 二氯甲烷 - 甲醇 (体积比 2:1) 溶液复溶, 所得脂质样品保存于 -80 ℃ 待用。

1.2.1.2 SPE 分离磷脂

将上述脂质样品氮吹至干并用 500 μL 正己烷复溶, 将复溶物载样至 Cleanert NH₂ 固相萃取柱 (500 mg/6 mL), 依次使用 10 mL 正己烷和 10 mL 异丙醇 - 二氯甲烷 (体积比 3:7) 溶液淋洗非磷脂组分, 再用 2 mL 甲醇洗脱磷脂组分, 收集磷脂洗脱液, 在温和的氮气下吹干, 用 1 mL 二氯甲烷 - 甲醇 (体积比 2:1) 溶液复溶, 过 0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜, 所得磷脂组分保存于 -80 ℃ 待测。

1.2.2 HILIC - QTOF - MS 条件

HILIC 条件: Waters Acquity UPLC BEH HILIC 色谱柱 (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm); 柱温 40 ℃; 进样量 3 μL; 流动相 A 为乙腈 - 水 (体积比 25:75) 溶液, 流动相 B 为乙腈 - 水 (体积比 95:5) 溶液, A、B 两相都添加有 0.2% 的甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵溶液; 色谱分离正式开始前使用 99% 流动相 B 平衡色谱柱 30 min; 洗脱梯度为 0 min A 相与 B 相体积比 1:99, 6 ~ 11 min A 相与 B 相体积比 6:94, 11 ~ 16 min A 相与 B 相体积比 8:92, 16 ~ 20 min A 相与 B 相体积比 12:88, 20.1 ~ 23.1 min A 相与 B 相体积比 60:40, 23.1 ~ 25 min A 相与 B 相体积比 1:99, 20.1 ~ 23 min 和 23.1 ~ 25 min 分别为柱冲洗和柱平衡阶段, MS 不采集数据; 流速 0.3 mL/min。

MS 条件: 电喷雾离子源, 数据依赖型模式采集数据; MS 采集质量范围 (m/z) 100 ~ 1 600, MS/MS 采集质量范围 (m/z) 50 ~ 1 200; 正离子模式 (POS) 碰撞能 20 eV; 负离子模式 (NEG) 碰撞能 25 eV; 气

体温度 250 ℃, 鞘气温度 300 ℃; 鞘气流速 12 L/min; 毛细管电压 3 000 V; 碎裂电压 150 V; 锥孔电压 65 V; MS 和 MS/MS 最小采集速率 3 spectra/s; 每个循环最大采集 3 个母离子, 启用动态排除, 重复一次, 然后排除 0.05 min; 迭代排除 (IE) 采集模式, 质量偏差容忍度 ($+/-$) 20×10^{-6} , 保留时间排除范围 ($+/-$) 0.1 min; 迭代次数为 3 次 (同一样品连续采集 4 次)。

1.2.3 数据分析

使用 MS - DIAL 4.9.221218 软件对磷脂定性。调整软件鉴定结果提供的磷脂分子积分峰面积, 优选积分峰面积相对标准偏差 (RSD) $\pm 10\%$ 、信噪比 (S/N) > 3 、保留时间偏移 ± 0.1 min 的磷脂分子进一步分析; 使用 Excel 对数据进行预处理; 使用 SIMCA - P 14.1 对脂质组学数据进行主成分分析 (PCA); 使用 OriginPro 2021 绘图。

2 结果与讨论

2.1 脂质提取条件的优化

2.1.1 样品量

磷脂在牛乳中的含量为 4.6 ~ 49.1 mg/100 mL, 在乳脂中的相对含量为 0.2% ~ 1.0%^[15]。为应对乳中磷脂的低丰度属性, 最有效的解决措施是增加样品量。由于本实验后续涉及 SPE 步骤, 虽然 SPE 具有分离纯化功能, 但增加实验步骤带来的潜在损失对微量样本是不友好的, 因此在除去非磷脂组分的前提下确保磷脂的检出, 考察了样品量对磷脂鉴定数量的影响, 结果如图 1 所示。

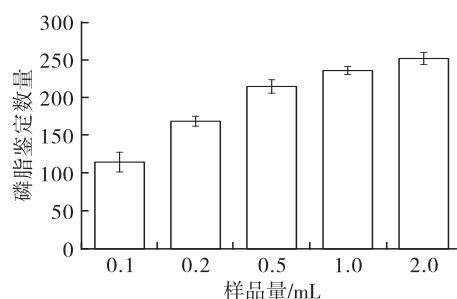


图 1 不同样品量的提取鉴定效果

Fig. 1 Effect of extraction and identification for different sample volume

由图 1 可知, 磷脂鉴定数量随样品量的增多而增加, 且增量逐步减小。样品量的增加提高了上机溶液中待测组分的浓度, 但也需要更多的提取溶剂以提取待测组分, 此外, 上机浓度过高不但会造成 MS 信号的饱和, 还有可能污染离子源。在实际进样过程中, 采用 2 mL 样品处理后上机时, 导致离子源表面附着一层油膜, 并直接影响 MS 的电离能力,

降低了后续样品的 MS 信号。而采用 1 mL 样品时, 离子源表面未出现明显油膜, 且 MS 信号未发生显著降低。因此, 选择 1 mL 巴氏杀菌乳样品进行后续实验。

2.1.2 提取溶剂用量

根据 Gil 等^[16] 评估不同脂质提取方法提出的分析方法, 本实验将不同组中鉴定到的相同磷脂分子

的最大峰面积视为 100% 的相对回收率(相对回收率是指将不同组中同一物质的最大峰面积或浓度等量化指标视为 100%, 以此计算不同组中相同物质的相对水平)。以相对回收率为衡量指标, 考察提取溶剂用量对样品中磷脂的提取效果, 结果如图 2 所示。

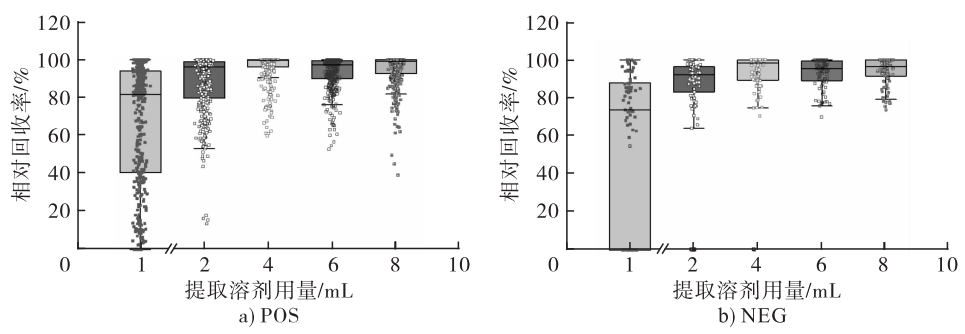


图 2 正、负离子模式下提取溶剂用量对磷脂相对回收率的影响

Fig. 2 Effect of extraction solvent volume on relative recovery of phospholipids in positive and negative ion modes

由图 2 可知, 正、负离子模式下磷脂的相对回收率均随提取溶剂用量的增加而增加, 并从 4 mL 开始相对回收率趋于稳定, 即 4 mL 提取溶剂是可以高效提取 1 mL 样品中脂质的最小用量。因此, 选取 4 mL 二氯甲烷-甲醇(体积比 2:1)溶液提取 1 mL 样品进行后续实验。

2.2 SPE 条件的优化

2.2.1 淋洗和洗脱溶剂

脂质极性覆盖范围广, 通常可以分为极性脂质和非极性脂质, 磷脂因含有亲水性的磷酸基团而属于极性脂质。NH₂ 固相萃取柱的基质为硅胶, 具有

极性吸附和弱阴离子交换作用, 是分离极性与非极性物质的有效工具, 因此本研究选择 NH₂ 固相萃取柱用于分离磷脂和非磷脂组分。然而, 在 SPE 过程中, 保留和洗脱效果均受目标化合物、吸附剂和溶剂 3 种因素的影响, 即溶剂体系配比需根据目标物和 SPE 小柱类型进行调整。为了达到最佳的淋洗分离和洗脱效果, 本研究使用 18 种脂质标准品(4 种甘油酯类、7 种鞘脂类和 7 种甘油磷脂类), 参考周芳梅等^[17] 所用 SPE 淋洗、洗脱溶剂, 以脂质标准品的回收率为考察指标对淋洗、洗脱溶剂进行优化, 结果如图 3 所示。

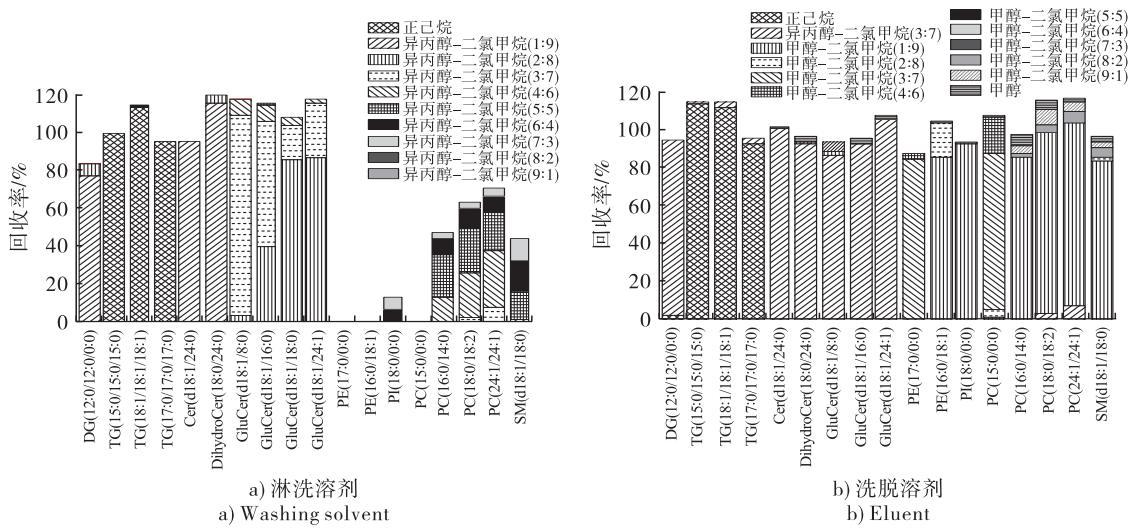


图 3 脂质标准品在不同淋洗溶剂和洗脱溶剂中的回收率

Fig. 3 Effect of washing solvent and eluent on recovery of lipid standards

不同溶剂配比所得混合溶剂体系的极性不同, 因此当使用混合溶剂体系对 SPE 小柱一次淋洗和

洗脱时,每种混合溶剂体系都有可能淋洗或洗脱下一部分标准品,即以纵坐标的柱状堆叠形式呈现回收率。正己烷是常见的极性最小的溶剂之一,在使用正己烷淋洗时,NH₂固相萃取柱固定相能与极性脂质形成氢键而保留,并根据相似相溶的原理将非极性脂质淋洗下来。由图 3a 可知,3 种甘油三酯标准品在正己烷相中被淋洗下来(回收率 95.70% ~ 114.10%),1 种甘油二酯和 6 种鞘脂在异丙醇-二氯甲烷(体积比 3:7)相中被淋洗下来(回收率 83.70% ~ 119.90%)。鞘脂和甘油磷脂是脂质八大分类中的两种,且鞘脂中的鞘磷脂又属于磷脂。尽管脂质结构复杂多样,但是相同种类脂质具有相似的结构和极性特征,鞘磷脂与鞘脂中的其他类别脂质(如神经酰胺)的极性差异小于鞘磷脂与不同脂质大类的极性差异。在 SPE 分离过程中,随着异丙

醇在淋洗溶液中比例的增加,磷脂标准品会被逐渐淋洗下来。因此,基于本实验所用标准品,异丙醇-二氯甲烷(体积比 3:7)是淋洗非磷脂组分而保留磷脂的最大极性配比溶剂,能够有效实现鞘脂内鞘磷脂与神经酰胺亚类间的分离。由图 3b 可知,在依次使用不同甲醇与二氯甲烷配比溶剂洗脱后,所有磷脂标准品在甲醇与二氯甲烷溶剂体系中均被洗脱下来(回收率 87.82% ~ 116.81%)。但由于不同磷脂分子极性不同且 7 种磷脂标准品不能涵盖所有磷脂的极性范围,因此选择极性最大的甲醇为洗脱溶剂。

2.2.2 淋洗和洗脱溶剂用量

不同用量淋洗溶剂(正己烷、异丙醇-二氯甲烷)和洗脱溶剂对应的淋洗(非磷脂)和洗脱(磷脂)组分的相对回收率如图 4 所示。

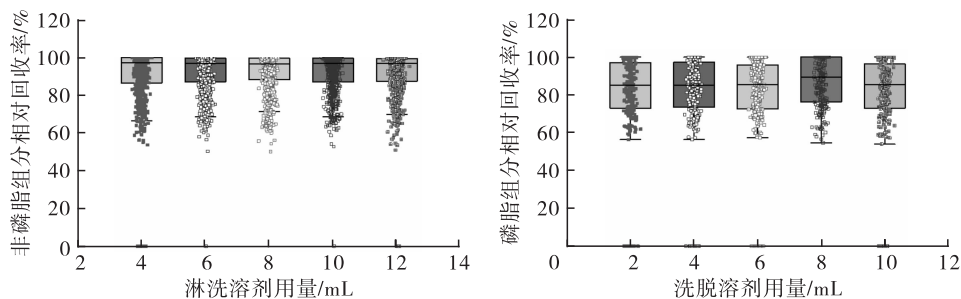


图 4 不同淋洗溶剂和洗脱溶剂用量下相应组分的相对回收率

Fig. 4 Effect of washing solvent and eluent volume on relative recovery of relative components

由图 4 可知,不同用量淋洗溶剂和洗脱溶剂间非磷脂组分和磷脂组分的相对回收率无显著差异。淋洗能力会影响洗脱效果,而洗脱效果可直接用磷脂回收率反映。鉴于图 4 是淋洗、洗脱的独立优化实验,结合两者的 SPE 操作对磷脂回收率的影响仍不清楚。因此,选用 2 mL 甲醇作洗脱溶剂,考察不同用量淋洗溶剂淋洗过后的洗脱组分相对回收率,结果如图 5 所示。

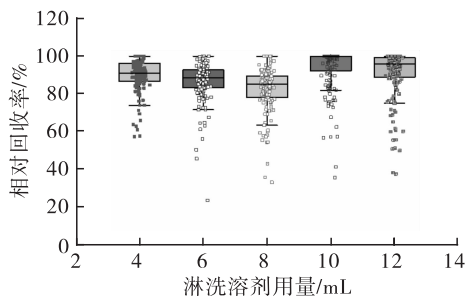


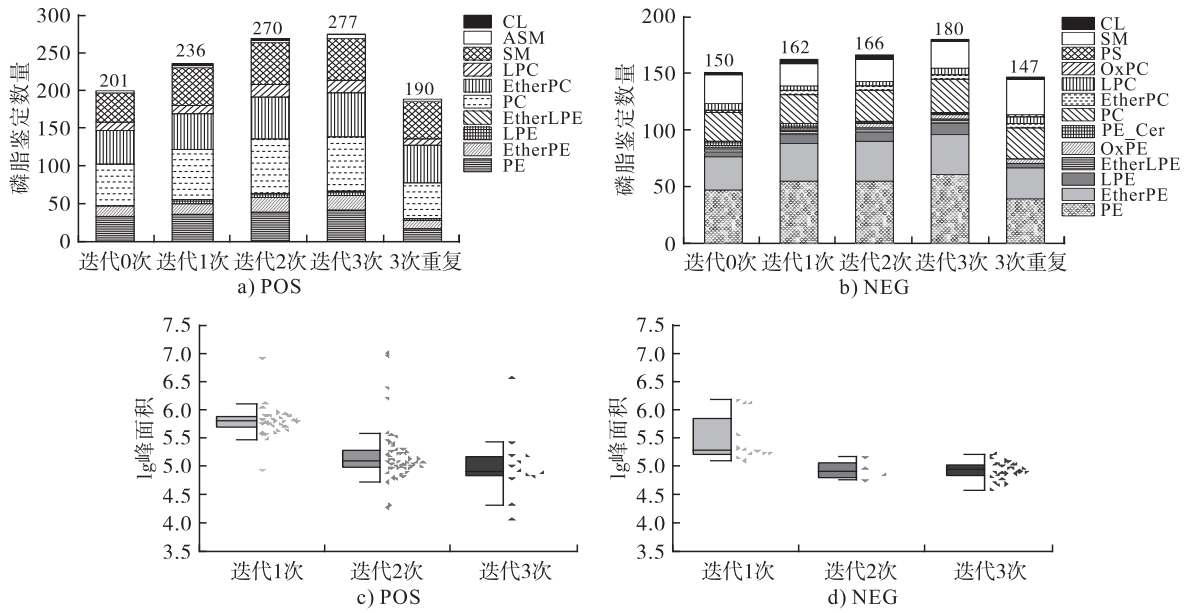
图 5 不同淋洗溶剂用量下洗脱组分的相对回收率

Fig. 5 Effect of washing solvent volume on relative recovery of elute components

由图 5 可知,经 10 mL 正己烷和 10 mL 异丙醇-二氯甲烷(体积比 3:7)淋洗后,磷脂的相对回收率更高更稳定,最终选择 10 mL 正己烷、10 mL 异丙醇-二氯甲烷(体积比 3:7)和 2 mL 甲醇进行淋洗和洗脱操作。

2.3 MS 采集迭代次数的优化

为了增加磷脂鉴定的数量,提升 HILIC-QTOF-MS 的数据挖掘能力,本研究采用 IE 采集模式。IE 模式可以在连续进样中选择前 n 个丰度最高的母离子进行碎裂,并在下一次采集时将以上在特定保留时间窗口下的 n 个母离子排除,从而扩大脂质覆盖率^[18-19]。由于高丰度母离子的迭代排除,理论上能够获得样品中更多的信息,尤其是对于样品中的低丰度脂质。正、负离子模式下不同迭代次数的磷脂鉴定数量与峰面积见图 6。其中图 6c 和图 6d 为连续迭代采集下每新增 1 次迭代采集鉴定到的新增磷脂峰面积。



注:ASM. 酰基鞘磷脂;LPC. 溶血磷脂酰胆碱;EtherPC. 醚键磷脂酰胆碱;EtherLPE. 醚键溶血磷脂酰乙醇胺;LPE. 溶血磷脂酰乙醇胺;EtherPE. 醚键磷脂酰乙醇胺;OxPC. 氧化磷脂酰胆碱;PE_Cer. 神经酰胺磷酸乙醇胺;OxPE. 氧化磷脂酰乙醇胺

Note:ASM. Acylsphingomyelin; LPC. Lysophosphatidylcholine; EtherPC. Ether - linked phosphatidylcholine; EtherLPE. Ether - linked lysophosphatidylethanolamine; LPE. Lysophosphatidylethanolamine; EtherPE. Ether - linked phosphatidylethanolamine; OxPC. Oxidized phosphatidylcholine; PE_Cer. Ceramide phosphoethanolamine; OxPE. Oxidized phosphatidylethanolamine

图 6 正、负离子模式下不同迭代次数对磷脂鉴定数量与峰面积的影响

Fig. 6 Effect of iteration numbers on identified number and peak area of phospholipids in positive and negative ion modes

由图 6a 和图 6b 可知,在 0、1、2、3 次迭代和重复 3 次采集的实验中,正、负离子模式下,1 次 IE 采集(迭代 0 次)与常规连续 3 次采集(3 次重复)的磷脂鉴定数量相近,相较于常规连续 3 次采集,1 次 IE 采集的磷脂鉴定数量在正、负离子模式下分别增加了 5.79% 和 2.04%。但实验发现,磷脂鉴定数量随着迭代次数的增加而增加。正离子模式下连续 4 次 IE 采集(迭代 3 次),与常规连续 3 次采集相比,获得的磷脂鉴定数量增加了 45.79%,负离子模式下增加了 22.45%。这表明 IE 采集加深了低丰度磷脂的挖掘能力。由图 6c 和图 6d 可知:正离子模式下鉴定到的新增磷脂峰

面积随迭代次数增加呈下降趋势,相较于迭代 1 次采集所得峰面积,迭代 3 次采集能在峰面积减小近 90% 的情况下定性磷脂;负离子模式下,迭代 2 次和迭代 3 次所得新增磷脂峰面积也小于迭代 1 次的。综合考虑磷脂鉴定数量与鉴定峰面积,最终选择 3 次迭代方法采集样品 MS/MS 信息。

2.4 巴氏杀菌乳中磷脂 MS 分析与鉴定

为评估样品制备程序的重现性和方法的可靠性,在 4 种巴氏杀菌乳的 6 个平行样品中抽取等量体积并混合均匀制备 6 个质控(QC)样品,对其数据进行 PCA,结果如图 7 所示。

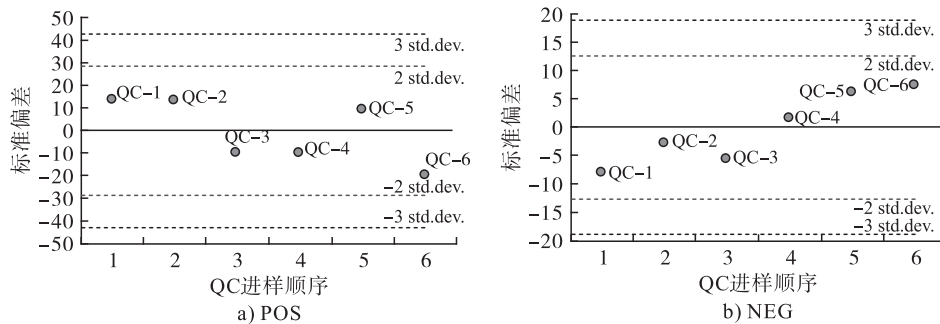


图 7 QC 样品正、负离子模式下的 PCA - X 的得分图

Fig. 7 Scores of PCA - X for QC samples in positive and negative ion modes

由图 7 可知,正、负离子模式下所有 QC 样品的 PCA - X 得分在两个标准差内,说明实验重复

性好。

选取具有代表性的磷脂亚类对其 MS 进行分

析鉴定。PE (16:0/18:1) 在正、负离子模式下的 MS/MS 图如图 8 所示。

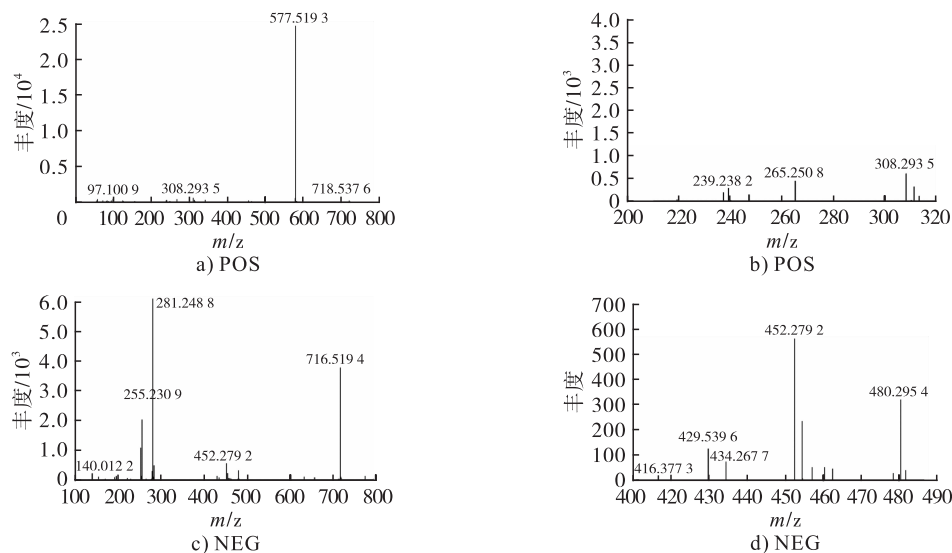


图 8 PE (16:0/18:1) 在正、负离子模式下的 MS/MS 图

Fig. 8 MS/MS of PE (16:0/18:1) in positive and negative modes

PE 在加氢(质子化)或加钠的形式下均会掉落磷酸乙醇胺头基,产生 $[M + H - C_2H_8NO_4P]^+$ 或 $[M + Na - C_2H_8NO_4P]^+$ 的主要离子信号,可用于 PE 鉴别。本实验的流动相为含有 0.2% 甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵溶液的乙腈-水溶液,因此正离子模式下母离子主要以 $[M + H]^+$ 的形式存在。如图 8a 和图 8b 所示,分别检测到 m/z 577.5193 高丰度离子峰、 m/z 718.5376、 m/z 239.2382、 m/z 265.2508 等多个低丰度离子峰。由于质子化 PE 中的伯氨基所带电荷不如质子化 PC 中季铵根稳定,磷酸乙醇胺质子化能力较弱,因此 MS 图中磷酸乙醇胺离子丰度低,而从母离子上中性丢失磷酸乙醇胺形成的 $[M + H - C_2H_8NO_4P]^+$ 具有高丰度信号, m/z 577.5193 与 m/z 718.5376 符合此 MS 碎裂模式。此外,正离子模式下 PE 碎裂还可产生脂肪酰基链相关的弱阳离子峰 $[R_xCO]^+$,经检索发现 m/z 239.2382 和 m/z 265.2508 两个弱阳离子峰,分别符合棕榈酸和油酸的 $[R_xCO]^+$ 形式,因此可初步推断该物质所属类别为 PE,且具有棕榈酸和油酸两条酰基链。为进一步确定酰基链的连接位置(sn-1、sn-2),分析了负离子模式下的 MS/MS 图。负离子模式下,PE 去离子化效率高,容易产生母离子 $[M - H]^-$,对应于 m/z 716.5194,如图 8c 所示。此外观测到的碎片离子 m/z 255.2309 和 m/z 281.2488 可推测为棕榈酸根阴离子和油酸根阴离子,与正离子模式下的推测相对应。由于 sn-2 位脂肪酸丢失形成的碎片

离子空间位阻更小,因此相较于 sn-1 位,碎片离子 $[R_2CH_2COO]^-$ 具有更高的相对丰度。本实验检测到的 m/z 281.2488 的丰度高于 m/z 255.2309,因此推测油酸连接在 sn-2 位,棕榈酸连接在 sn-1 位。此外还在 m/z 400~500 内发现并推测出了中性丢失脂肪酸及其烯酮形式的离子碎片,如图 8d 所示, m/z 434.2677 对应于母离子中性丢失油酸形成的离子碎片 $[M - H - R_xCH_2COOH]^-$, m/z 452.2792 对应于母离子中性丢失油酸的烯酮形式形成的离子碎片 $[M - H - R_xCH=C=O]^-$ 。因此,综合正、负离子模式 MS/MS 图,该磷脂分子结构鉴定为 PE(16:0/18:1)。

SM(18:1;O2/18:0)在正、负离子模式下的 MS/MS 图如图 9 所示。

如图 9a 和图 9b 所示,正离子模式下检测到离子碎片 m/z 731.6074、 m/z 713.5956、 m/z 264.2818 和 m/z 184.0733。首先依据 m/z 184.0733 推测该物质所属类别为 PC 或 SM,其次依据 SM 的特征碎片 m/z 264.2818 排除 PC 类别,且确定其长链碱基(SPB)结构为 SPB 18:1;O2。因此,可推测上述 4 种离子分别对应于母离子 $[M + H]^+$ 、 $[M + H - H_2O]^+$ 、 $[C_{15}H_{29}CH=C(NH_2)CH_2]^+$ 和 SM 特征碎片磷酸胆碱基团,且该磷脂分子为 SM(18:1;O2/18:0)。此外,在正离子模式下还检测到离子碎片 m/z 753.5889,依据母离子 $[M + H]^+$,可推测 m/z 753.5889 是 SM(18:1;O2/18:0)加钠形式的母离子。图 9c 还包括中、高丰度子离子 m/z 694.5141、

m/z 570.520 8, 分别对应于母离子中性丢失三甲胺和磷酸胆碱, 低丰度子离子 m/z 548.542 0 可推断为母离子中性丢失磷酸胆碱和一分子甲醛, 并进一步失去一分子水产生低丰度碎片 m/z 530.529 7。进一步通过负离子模式下的 MS/MS 图确证 SM 结构, 如图 9d 和图 9e 所示, 检测到的 m/z 775.597 1 对应于 SM (18:1; O2/18:0) 的母离子 $[M +$

$HCOO]^-$, 高丰度离子峰 m/z 715.574 3 是 SM 分子丢失甲基后形成高丰度碎片 $[M - CH_3]^-$, m/z 168.043 3 是磷酸胆碱基团, m/z 449.314 7 对应于鞘胺醇骨架结构碎片离子。因此, 综合正、负离子模式 MS/MS 图, 该磷脂分子结构鉴定为 SM (18:1; O2/18:0)。

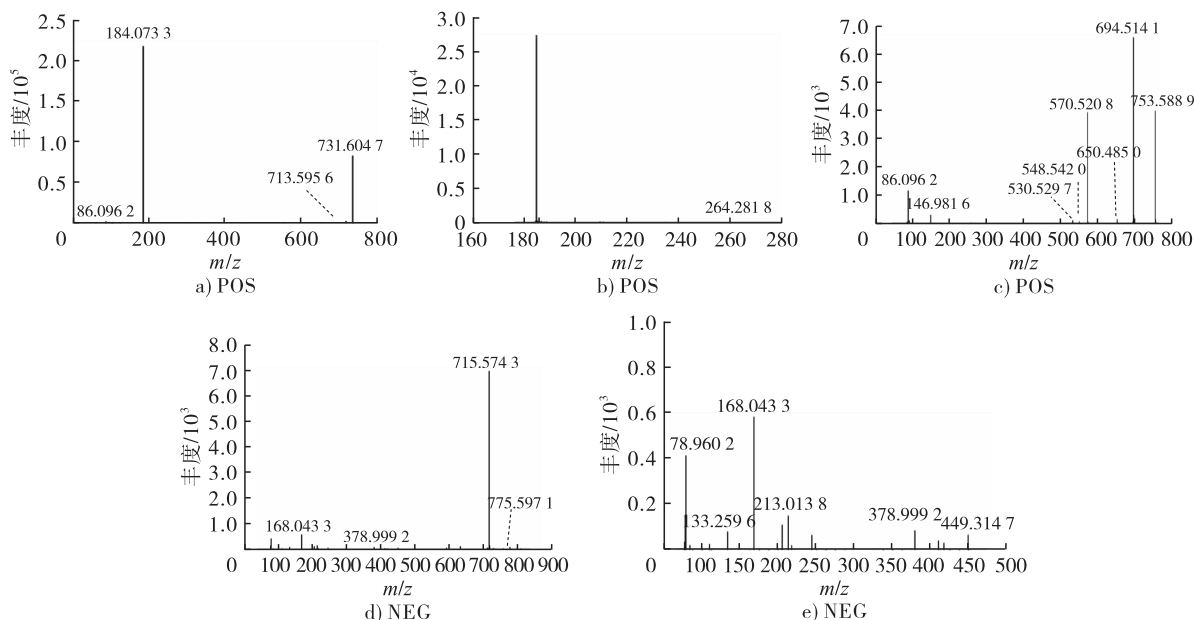


图 9 SM (18:1; O2/18:0) 在正、负离子模式下的 MS/MS 图

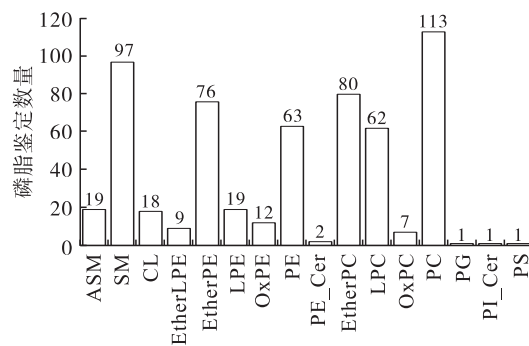
Fig. 9 MS/MS of SM (18:1; O2/18:0) in positive and negative modes

相同亚类的磷脂具有相似的裂解规律, 除了 PE 和 SM, 正离子模式下 PC 和 LPC 的质子化分子离子裂解产生的 m/z 184.07 磷酸胆碱高丰度碎片, LPE 的质子化分子离子中性丢失磷酸乙醇胺产生的高丰度碎片 $[M + H - 141]^+$ 可作为特征碎片。负离子模式下 PS 的去质子化分子离子丢失极性头基丝氨酸产生的碎片 $[M - H - 87]^-$, PI 的去质子化分子离子裂解产生的碎片 m/z 241.1 等有助于磷脂的定性。

按照上述 MS 分析鉴定, 在 4 种哺乳动物巴氏杀菌乳中共鉴定出的磷脂数量如图 10 所示。

由图 10 可知, 在 4 种哺乳动物巴氏杀菌乳中共鉴定出涵盖 7 个亚类 16 个类别的 580 个磷脂分子, 包括 116 个鞘磷脂、18 个心磷脂、181 个磷脂酰乙醇胺、262 个磷脂酰胆碱、1 个磷脂酰甘油、1 个磷脂酰肌醇和 1 个磷脂酰丝氨酸。其中 PC、PE 和 SM 是 4 种哺乳动物巴氏杀菌乳中的主要磷脂, 占全部磷脂分子的 96.38%, 涵盖 12 个类别的 559 个磷脂分子。Wei 等^[8] 在母乳、牛乳、山羊乳、牦牛乳和驴乳等 5 种乳中共鉴定到 167 个磷脂分子。Song 等^[10] 在 486 份母乳样品中对 258 个磷脂分子

进行了定性定量分析。Liu 等^[20] 对市售乳进行分析, 共鉴定到 514 个极性脂质 (其中包括 454 个磷脂分子)。相较于上述几项研究, 本研究为巴氏杀菌乳磷脂鉴定提供了更全面的数据。



注: PI-Cer. 神经酰胺磷脂酰肌醇

Note: PI-Cer. Ceramide phosphoinositol

图 10 巴氏杀菌乳磷脂鉴定数量

Fig. 10 Identified number of pasteurized milk phospholipids

3 结论

本研究基于 SPE-HILIC-QTOF-MS 对 4 种哺乳动物巴氏杀菌乳进行磷脂分析鉴定。从骆驼、山羊、水牛和奶牛 4 种巴氏杀菌乳中共鉴定到涵盖

7 个亚类的 580 个磷脂分子。本研究确定了一套基于液态乳的磷脂分析鉴定策略,并提供了目前关于巴氏杀菌乳磷脂组成更为全面的数据集,为进一步分析乳品磷脂组成提供了一定科学支撑,但不足之处在于存在低丰度磷脂鉴定方面的短板,后续研究应着重低丰度磷脂的挖掘并进行磷脂结构与生物学意义的研究,寻找不同乳品间的生物标志物,挖掘其潜在生物价值。

参考文献:

- [1] BRINK L R, LÖNNERDAL B. Milk fat globule membrane: The role of its various components in infant health and development[J/OL]. *J Nutr Biochem*, 2020, 85: 108465 [2024-01-21]. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108465>.
- [2] SCHIPPER L, BARTKE N, MARINTCHEVA - PETROVA M, et al. Infant formula containing large, milk phospholipid-coated lipid droplets and dairy lipids affects cognitive performance at school age[J/OL]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1215199 [2024-01-21]. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1215199>.
- [3] SCHVERER M, DONOSO F, MITCHELL A, et al. Dietary milk phospholipids attenuate chronic stress-induced changes in behavior and endocrine responses across the lifespan[J/OL]. *Mol Nutr Food Res*, 2022, 66(3): e2100665 [2024-01-21]. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100665>.
- [4] TEOH O H, LIN T P, ABRAHAMSE - BERKEVELD M, et al. An infant formula with large, milk phospholipid-coated lipid droplets supports adequate growth and is well-tolerated in healthy, term Asian infants: A randomized, controlled double-blind clinical trial[J/OL]. *Nutrients*, 2022, 14(3): 634 [2024-01-21]. <https://doi.org/10.3390/nu14030634>.
- [5] 农业农村部市场预警专家委员会. 中国农业展望报告(2019—2029)[R]. 北京:农业农村部, 2019.
- [6] HEMSTRÖM P, IRGUM K. Hydrophilic interaction chromatography[J]. *J Sep Sci*, 2006, 29(12): 1784-1821.
- [7] ALI A H, ZOU X, HUANG J, et al. Profiling of phospholipids molecular species from different mammalian milk powders by using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry[J]. *J Food Compos Anal*, 2017, 62: 143-154.
- [8] WEI W, LI D, JIANG C, et al. Phospholipid composition and fat globule structure II: Comparison of mammalian milk from five different species[J/OL]. *Food Chem*, 2022, 388: 132939 [2024-01-21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132939>.
- [9] MOU B, YANG W, SONG S, et al. Phospholipidomics of bovine milk subjected to homogenization, thermal treatment and cold storage[J/OL]. *Food Chem*, 2022, 381: 132288 [2024-01-21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132288>.
- [10] SONG S, LIU T T, LIANG X, et al. Profiling of phospholipid molecular species in human breast milk of Chinese mothers and comprehensive analysis of phospholipidomic characteristics at different lactation stages[J/OL]. *Food Chem*, 2021, 348: 129091 [2024-01-21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129091>.
- [11] GILES C, TAKECHI R, LAM V, et al. Contemporary lipidomic analytics: Opportunities and pitfalls[J]. *Prog Lipid Res*, 2018, 71: 86-100.
- [12] XU T, HU C, XUAN Q, et al. Recent advances in analytical strategies for mass spectrometry-based lipidomics[J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1137: 156-169.
- [13] POSTLE A D, WILTON D C, HUNT A N, et al. Probing phospholipid dynamics by electrospray ionisation mass spectrometry[J]. *Prog Lipid Res*, 2007, 46(3/4): 200-224.
- [14] FOLCH J, LEES M, SLOANESTANLEY G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. *J Biol Chem*, 1957, 226(1): 497-509.
- [15] GARCIA C, LUTZ N W, CONFORT - GOUNY S, et al. Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by ^{31}P NMR: Towards specific interest in human health[J]. *Food Chem*, 2012, 135(3): 1777-1783.
- [16] GIL A, ZHANG W, WOLTERS J C, et al. One-vs-two-phase extraction: Re-evaluation of sample preparation procedures for untargeted lipidomics in plasma samples[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(23): 5859-5870.
- [17] 周芳梅, 陈晓嘉, 罗小宝, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定乳及乳制品中磷脂酰丝氨酸[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(7): 127-131.
- [18] KOELMEL J P, LI X, STOW S M, et al. Lipid annotator: Towards accurate annotation in non-targeted liquid chromatography high-resolution tandem mass spectrometry (LC-HRMS/MS) lipidomics using a rapid and user-friendly software[J/OL]. *Metabolites*, 2020, 10(3): E101 [2024-01-21]. <https://doi.org/10.3390/metabo10030101>.
- [19] KOELMEL J P, KROEGER N M, GILL E L, et al. Expanding lipidome coverage using LC-MS/MS data-dependent acquisition with automated exclusion list generation[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28(5): 908-917.
- [20] LIU Z, LI C, PRYCE J, et al. Comprehensive characterization of bovine milk lipids: Phospholipids, sphingolipids, glycolipids, and ceramides[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(24): 6726-6738.