

# 核磁共振磷谱法测定乳制品中的磷脂含量

林瑞雪, 李峰, 韦伟, 金青哲, 王兴国

(江南大学食品学院, 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心, 国家功能食品工程技术研究中心, 江苏无锡214122)

**摘要:**为了测定乳制品中的磷脂含量,建立了基于核磁共振磷谱( $^{31}\text{P}$  NMR)的磷脂分析方法,并采用内标法对磷脂进行了定量。利用建立的方法对不同哺乳期母乳(初乳、过渡乳、成熟乳)、奶粉(全脂奶粉、婴幼儿配方奶粉)、富含乳磷脂的乳清蛋白粉、大豆磷脂及鸡蛋磷脂中的磷脂组成及含量进行了分析。结果表明:9种磷脂标准品的检出限范围为48.97~85.76  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,定量限范围为97.94~171.52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,具有合理的加标回收率(83.40%~108.52%)和精密度(相对标准偏差小于15%)。母乳中总磷脂含量平均为19.27 mg/100 mL,随着哺乳期的延长总磷脂含量逐渐降低。不同来源的样品中磷脂的组成有较大差异,母乳中含量最高的磷脂类型为鞘磷脂,其他样品中的磷脂主要类型为磷脂酰胆碱。

**关键词:**  $^{31}\text{P}$  NMR; 母乳脂肪; 婴幼儿配方奶粉; 磷脂; 乳脂肪球膜

中图分类号:TS252.1;O657.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)09-0129-07

## Analysis of phospholipids content in dairy products by $^{31}\text{P}$ NMR

LIN Ruixue, LI Feng, WEI Wei, JIN Qingzhe, WANG Xingguo

(National Engineering Research Center for Functional Food, Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** In order to determine the content of phospholipids in dairy products, a method for the determination of phospholipid was established based on  $^{31}\text{P}$  NMR and the internal standard method was used to quantify the phospholipid. The composition and content of phospholipid in different lactation human milk (colostrum milk, transitional milk, mature milk), milk powder (whole milk powder, infant formula milk powder), whey protein powder rich in lacto-phospholipid, soybean lecithin and egg lecithin were analyzed by this method. The results showed that the limits of detection and quantification of 9 phospholipid standards were 48.97–85.76  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 97.94–171.52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. They also demonstrated reasonable recoveries (83.40%–108.52%) and precision (relative standard deviation < 15%). The average total phospholipid content in human milk was 19.27 mg/100 mL, and it decreased gradually with the extension of the lactation period. The composition of phospholipid varied greatly among samples from different sources. Sphingomyelin was the most abundant type in human milk, while phosphatidylcholine was the main type in other samples.

**Key words:**  $^{31}\text{P}$  NMR; human milk fat; infant formula milk powder; phospholipid; milk fat globule membrane

收稿日期:2021-12-23;修回日期:2022-04-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31701558)

作者简介:林瑞雪(1998),女,在读硕士,研究方向为母乳磷脂分析及营养研究(E-mail) linruixue1998@163.com。

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

母乳是0~6个月婴儿最理想的食物,其脂肪含量为3%~5%,其中98%以上以甘油三酯的形式存在,还有约0.8%的磷脂、0.5%的胆固醇以及其他种类繁多的脂类<sup>[1]</sup>。乳中60%~70%的磷脂存在于乳脂肪球膜上<sup>[2]</sup>,其他的磷脂则存在于水相中,与蛋白质或者膜片段相连<sup>[3-4]</sup>。磷脂是一类含有磷

酸基团的复合脂,是由磷酸及与其相连的取代基团(含氮碱或醇类)构成的亲水头部和由两个脂肪酸构成的疏水尾部组成。磷脂按化学结构可分为两类,一类为甘油磷脂,一类为鞘磷脂(SM)<sup>[5]</sup>。研究表明,乳中的磷脂包括SM、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)和磷脂酰丝氨酸(PS)<sup>[6]</sup>。另外,溶血磷脂也存在于乳磷脂中,溶血磷脂为甘油磷脂被磷脂酶水解后产生的,主要包括溶血磷脂酰胆碱(LPC)、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)等<sup>[7]</sup>。

母乳按泌乳期可分为初乳、过渡乳和成熟乳,分别为产后1~5 d、6~15 d和15 d以上。多数研究表明,母乳的成分会随着泌乳期的延长而发生改变<sup>[8-9]</sup>。关于各类磷脂占总磷脂的比例,较多的为SM(29%~46%)、PC(19%~38%)和PE(10%~36%),其次为PS(4%~18%)和PI(1%~12%)<sup>[6]</sup>。通过比较各类磷脂的含量及比例发现,大部分研究结果显示母乳中的磷脂主要为SM、PC和PE<sup>[10-13]</sup>。近年来,为了更好地模仿母乳中的脂质组成,卵磷脂以及富含乳磷脂的乳清蛋白粉开始被添加到婴儿配方奶粉中<sup>[5, 14]</sup>。但同时分析富含乳磷脂的乳清蛋白粉和卵磷脂中磷脂的文献仍然较少。

核磁共振磷谱(<sup>31</sup>P NMR)法在近年来被应用于磷脂的定性、定量<sup>[10, 15-16]</sup>,不同含磷组分由于磷原子所连接基团不同而具有不同的化学对称性,因此在磁场中出峰的化学位移不同。由于该技术对含磷组分具有强选择性,与高效液相色谱(HPLC)法和薄层色谱(TLC)法相比,该法具备干扰因素少、准确度高、预处理简单快速等优点<sup>[17-18]</sup>,另外图谱上各含磷组分峰面积之比为摩尔比,因此可以利用内标法进行定量检测。

本研究建立了基于<sup>31</sup>P NMR的磷脂分析方法,分析对比了不同哺乳期的母乳、婴幼儿配方奶粉、全脂奶粉、富含乳磷脂的乳清蛋白粉、卵磷脂、鸡蛋磷脂中的磷脂在组成与含量方面的差异,以期为婴幼儿配方奶粉中磷脂来源提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

母乳样本,由无锡市24位健康母亲提供,分别在不同的哺乳时期进行采样,包括初乳23个、过渡乳27个以及成熟乳51个(母乳样品采用电动吸乳器吸取,每次排空单侧乳房的母乳,样品采集后保存至-80℃冰箱中,24 h内进行分析检测);3款添加富含乳磷脂的乳清蛋白粉的婴幼儿配方奶粉(简称

婴配粉),均由相关官方旗舰店购入;2款全脂奶粉,由内蒙古蒙牛乳制品有限公司提供;富含乳磷脂的乳清蛋白粉Lacprodan<sup>®</sup> MFGM-10(M-10),购自丹麦Arla食品配料有限公司;大豆磷脂和鸡蛋磷脂,购自广州海圣生物科技有限公司。

甲醇、氯仿、氢氧化铯等(均为分析纯),上海国药集团化学试剂有限公司;SM、PC、PE、PI、LPE、磷脂酰甘油(PG)和心磷脂(CL)标准品(纯度均大于99%),瑞典Larodan公司;LPC标准品(纯度大于98%),美国Avanti Polar Lipids公司;PS标准品(纯度大于98%)、磷酸三苯酯(TPP)和乙二胺四乙酸(EDTA),美国Sigma公司。

SE812型氮吹仪,上海安谱实验科技股份有限公司;Centrifuge 5810离心机,德国Eppendorf公司;Bruker Avance III 600 MHz核磁共振波谱仪,德国Bruker公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 总脂的提取

采用Folch等<sup>[19]</sup>的方法提取样品的总脂。母乳中总脂的提取:将4.5 mL母乳溶于30 mL氯仿-甲醇(体积比2:1)中,旋涡3 min,而后加入9 mL NaCl,静置分层后,收集下层氯仿层,旋转蒸发去除溶剂后,用乙醚将脂质转移至5 mL离心管中,氮吹至干。将提取的总脂储存在-80℃超低温冰箱直至进一步分析。婴配粉、全脂奶粉及富含乳磷脂的乳清蛋白粉中总脂的提取:称取1 g(精确至0.000 1 g)样品,加入10 mL(65±5)℃的水,充分混合直至试样完全溶解,后续操作同母乳中脂质的提取。

#### 1.2.2 磷脂的测定及分析

样品前处理:称取提取的乳脂样品约200 mg(婴配粉、全脂奶粉和富含乳磷脂的乳清蛋白粉的脂肪样品约80 mg,卵磷脂和鸡蛋磷脂约50 mg)于2 mL离心管中,依次加入0.5 mL甲醇、0.5 mL EDTA-Cs<sup>+</sup>溶液(0.2 mol/mL, pH为8.5)和0.5 mL CDCl<sub>3</sub>溶液(含TPP 112 mg/L),旋涡振荡至所有样品溶解,以4 000 r/min的速度在室温下离心5 min,小心吸取500 μL下层液体至核磁管中,待测。

磷脂的测定:采用<sup>31</sup>P NMR对样品磷脂含量进行测定。仪器探针温度设置为25℃,90°脉冲,采样点数为32 k,弛豫时间和采样时间分别为12.25 s和3.22 s,脉冲宽度为11.66 μs,谱仪频率为161.98 Hz。采用MestReNova仪器软件进行数据分析。

#### 1.2.3 方法学验证

为检验<sup>31</sup>P NMR法的可靠性,对检出限(LOD)、定量限(LOQ)、加标回收率和精密度进行测定。将

磷脂标准品 PG、CL、LPE、PE、SM、PS、LPC、PI 和 PC 分别配制成标准溶液。按一定比例混合为混标后逐级稀释,取信噪比为 3 时对应的质量浓度为检出限,信噪比为 10 时对应的质量浓度为定量限。根据测得的样品中磷脂的含量范围,在同一乳脂样品中分别添加低、中、高水平的磷脂标准品(具体见表 1),对 3 个不同水平的磷脂加标回收率进行研究。

表 1 磷脂加标回收率测试实验的添加量水平  $\mu\text{g}$

磷脂	低水平	中水平	高水平
PG	150	250	350
CL	100	200	300
LPE	100	200	300
PE	150	250	350
SM	150	250	400
PS	50	150	250
LPC	100	200	300
PI	150	250	350
PC	150	250	350

另制备一个不含混标的空白样,加标后对加标样品进行常规前处理后进样分析,通过对样品重复检测得出方法的精密度,日内精密度由样品平行检测 5 次计算所得,日间精密度通过连续 5 日检测同一样品计算所得。

#### 1.2.4 统计学分析

所有样品平行测定 3 次,结果以“平均值  $\pm$  标准差”表示。采用 IBM SPSS Statistics 26 对数据进行统计分析,分析方法为单因素方差分析法

表 2 9 种磷脂标准品的检出限、定量限、加标回收率、精密度

磷脂	LOD/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	LOQ/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	加标回收率/%			精密度/%	
			低水平	中水平	高水平	日内	日间
PG	85.31	170.62	101.18 $\pm$ 5.60	105.05 $\pm$ 10.26	99.85 $\pm$ 9.31	1.45	4.33
CL	75.19	150.38	97.90 $\pm$ 3.55	103.26 $\pm$ 0.91	108.52 $\pm$ 4.37	1.05	2.64
LPE	85.76	171.52	102.43 $\pm$ 1.37	99.01 $\pm$ 3.28	98.68 $\pm$ 2.44	2.11	2.85
PE	50.28	100.56	99.28 $\pm$ 8.44	105.37 $\pm$ 9.73	99.64 $\pm$ 1.47	4.09	6.13
SM	60.62	121.24	103.53 $\pm$ 10.99	93.09 $\pm$ 9.37	105.08 $\pm$ 12.89	5.38	8.01
PS	69.46	138.92	95.67 $\pm$ 0.05	99.33 $\pm$ 1.54	100.18 $\pm$ 18.60	3.14	5.11
LPC	57.14	114.28	98.56 $\pm$ 0.21	99.82 $\pm$ 0.54	101.34 $\pm$ 2.01	0.31	4.23
PI	67.24	134.48	83.40 $\pm$ 9.37	91.53 $\pm$ 9.88	98.79 $\pm$ 8.27	4.78	8.13
PC	48.97	97.94	90.89 $\pm$ 3.31	94.12 $\pm$ 7.36	105.41 $\pm$ 5.39	4.02	7.84

由表 2 可见,9 种磷脂标准品的检出限范围为 48.97 ~ 85.76  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,定量限范围为 97.94 ~ 171.52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,显示本方法具有良好的灵敏度。低、中、高水平的加标回收率平均值范围为 83.40% ~ 108.52%,在 80% ~ 120% 之间,表明具有良好的回收率,可满足样品测定的需求。9 种磷脂标准品的日内精密度(相对标准偏差)在 0.31% ~ 5.38% 之

(ANOVA)的 Duncan 检验。同时,采用 Origin 2021 绘制图形,采用 SIMCA 14.1 进行主成分分析(PCA)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 磷脂的定性与定量

磷脂的化学位移( $\delta$ )是相对内标 TPP 的化学位移( $\delta = -17.8$ )而定,以各种磷脂标准品的化学位移来定性样品中的各磷脂峰,见图 1。

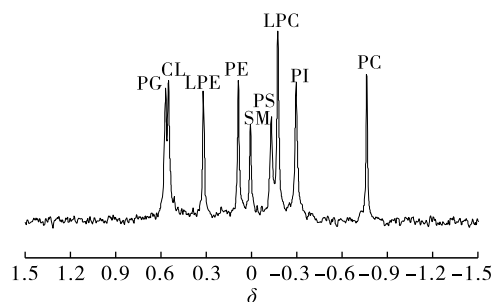


图 1 9 种磷脂混合标准品的 $^{31}\text{P}$  NMR 图谱

由图 1 可见,9 种磷脂混标具有较好的分离度, $^{31}\text{P}$  NMR 谱图中从高场到低场的峰分别代表 PG、CL、LPE、PE、SM、PS、LPC、PI 和 PC。图谱中各峰的面积之比是各组分的摩尔比,再通过各组分的相对分子质量将摩尔比换算成质量比,即可通过添加内标量来计算各磷脂组分含量。

### 2.2 方法学验证

分别验证了 9 种磷脂标准品的检出限(LOD)、定量限(LOQ)、加标回收率、精密度,结果如表 2 所示。

间,日间精密度(相对标准偏差)在 2.64% ~ 8.13% 之间,均小于 15%,表明本方法满足样品中磷脂定量的要求。

### 2.3 不同哺乳期母乳中的磷脂含量

使用本方法对不同哺乳期母乳中的磷脂含量进行测定,结果如表 3 所示。

表3 不同哺乳期母乳中的磷脂含量

磷脂	初乳( $n=23$ )	过渡乳( $n=27$ )	成熟乳( $n=51$ )	平均值
PE	$5.68 \pm 1.50^a$	$5.46 \pm 1.28^{ab}$	$4.88 \pm 1.16^b$	$5.34 \pm 0.42$
SM	$6.97 \pm 1.79^a$	$6.62 \pm 1.80^a$	$6.42 \pm 1.42^a$	$6.67 \pm 0.28$
PS	$1.01 \pm 0.31^a$	$0.92 \pm 0.24^{ab}$	$0.78 \pm 0.27^b$	$0.90 \pm 0.11$
PI	$0.82 \pm 0.34^a$	$0.75 \pm 0.29^{ab}$	$0.62 \pm 0.22^b$	$0.73 \pm 0.10$
PC	$6.36 \pm 1.73^a$	$5.73 \pm 1.38^a$	$4.78 \pm 0.87^b$	$5.63 \pm 0.80$
合计	$20.84 \pm 5.35^a$	$19.49 \pm 4.73^{ab}$	$17.48 \pm 3.47^b$	$19.27 \pm 1.69$

注:同行不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )

由表3可知,母乳中共测定出5种磷脂,分别为PE、SM、PS、PI和PC,初乳、过渡乳、成熟乳中总磷脂含量分别为20.84、19.49、17.48 mg/100 mL,随着哺乳时间的延长,母乳中磷脂含量显著降低。母乳的平均总磷脂含量为19.27 mg/100 mL,这与之前的研究结果相近(16.8~22.3 mg/100 mL)<sup>[12]</sup>。个体磷脂含量方面,母乳中含量最高的磷脂为SM,平均含量为6.67 mg/100 mL,不同哺乳期间差异不显

著( $p > 0.05$ );其次是PC和PE,平均含量分别为5.63 mg/100 mL和5.34 mg/100 mL;含量最低的是PS和PI,平均含量分别为0.90 mg/100 mL和0.73 mg/100 mL。

#### 2.4 奶粉中的磷脂含量

使用本方法对2款全脂奶粉和3款婴配粉中磷脂含量进行检测,结果如表4所示。

表4 奶粉中的磷脂含量

磷脂	全脂奶粉1	全脂奶粉2	婴配粉1	婴配粉2	婴配粉3
PE	$2.25 \pm 0.04$	$1.85 \pm 0.00$	$2.95 \pm 0.14$	$2.11 \pm 0.39$	$4.78 \pm 0.18$
SM	$2.58 \pm 0.07$	$1.16 \pm 0.09$	nd	nd	$2.34 \pm 0.06$
PS	nd	nd	$0.63 \pm 0.55$	$0.72 \pm 0.06$	$0.84 \pm 0.35$
PI	$0.22 \pm 0.22$	nd	nd	$0.30 \pm 0.51$	nd
PC	$3.96 \pm 0.09$	$1.98 \pm 0.02$	$4.24 \pm 0.54$	$3.95 \pm 0.64$	$7.08 \pm 0.03$
总磷脂	$9.01 \pm 0.20$	$4.99 \pm 0.11$	$7.82 \pm 1.03$	$7.08 \pm 0.31$	$15.04 \pm 0.44$

注:nd表示未检出。下同

由表4可知,奶粉中共测定出PE、SM、PS、PI和PC 5种磷脂,不同奶粉中的磷脂含量与组成存在较大差别,5款奶粉总磷脂含量为4.99~15.04 mg/100 mL,略低于Claumarchirant等<sup>[14]</sup>的研究结果,这可能是奶粉的配料及加工方式不同导致的。婴配粉3中的总磷脂含量最高,可达15.04 mg/100 mL,与母乳的总磷脂含量19.27 mg/100 mL较为接近,主要是因为其配料中添加了富含乳磷脂的乳清蛋白粉。母乳中含量最高的SM仅在2款全脂奶粉和婴配粉3中检出,且含量在1.16~2.58 mg/100 mL之间,远低于母乳中SM的含量(6.67 mg/100 mL)。婴配粉1和婴配粉2中未检出SM的原因可能是所添加的乳清蛋白粉的组成与婴配粉3所添加的乳清蛋白粉不同,其中SM的含量低于检出限所致。

#### 2.5 富含乳磷脂的乳清蛋白粉和大豆磷脂、鸡蛋磷脂中的磷脂含量

采用本方法对富含乳磷脂的乳清蛋白粉、大豆磷脂、鸡蛋磷脂中磷脂含量进行检测,<sup>31</sup>P NMR谱图

如图2所示。

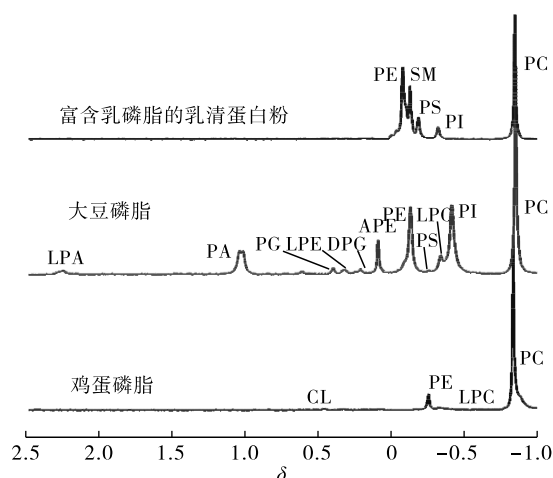


图2 富含乳磷脂的乳清蛋白粉、大豆磷脂、鸡蛋磷脂的<sup>31</sup>P NMR谱图

由图2可见,3种样品中共检出13种磷脂,根据磷脂标准品图谱及文献[20-21],对13种磷脂进行鉴定,种类分别为PC、PI、LPC、PS、PE、SM、N-磷脂酰乙醇胺(APE)、双磷脂酰甘油(DPG)、LPE、

PG、磷脂酸(PA)、溶血磷脂酸(LPA)、CL。通过内标TPP,对这13种磷脂含量进行计算,结果如表5所示。

表5 乳清蛋白粉、大豆磷脂、鸡蛋磷脂中的磷脂含量 %

磷脂	乳清蛋白粉	大豆磷脂	鸡蛋磷脂
LPA	nd	1.04 ± 0.05	nd
PA	nd	6.31 ± 0.32	nd
CL	nd	nd	0.66 ± 0.00
PG	nd	1.18 ± 0.05	nd
LPE	nd	0.73 ± 0.05	nd
DPG	nd	0.96 ± 0.02	nd
APE	nd	1.88 ± 0.44	nd
PE	2.28 ± 0.43	7.03 ± 0.12	1.86 ± 0.17
SM	1.65 ± 0.18	nd	nd
PS	0.78 ± 0.21	1.28 ± 0.58	nd
PI	0.71 ± 0.07	13.22 ± 0.56	nd
LPC	nd	4.43 ± 0.06	0.72 ± 0.09
PC	2.54 ± 0.09	17.06 ± 0.71	43.25 ± 1.72
合计	7.95 ± 0.13	55.12 ± 2.96	46.49 ± 1.98

由表5可知,乳清蛋白粉与大豆磷脂、鸡蛋磷脂在磷脂含量和组成上差异较大。在磷脂种类上,乳清蛋白粉中共检出5种磷脂,分别是PE、SM、PI、PS和PC。大豆磷脂中共检出11种磷脂,种类最多,分

别是LPA、PA、PG、LPE、DPG、APE、PE、PS、PI、LPC和PC,未检出母乳中含量较高的SM,并且存在部分溶血磷脂,如LPC、LPE和LPA。Kato等<sup>[22]</sup>利用<sup>31</sup>P NMR法在大豆磷脂中共检出9种磷脂,分别是PC、PE、PI、PA、PG、PS、2-LPC、2-LPE、2-LPA,未检出APE和DPG,本研究的测定方法鉴定出了更多的磷脂种类。本研究中鸡蛋磷脂中共检出4种磷脂,种类最少,分别是PC、LPC、PE和CL。鸡蛋磷脂中含量最高的磷脂为PC,其次为PE,母乳中存在的SM、PS、PI均未检出。Sotirhos等<sup>[23]</sup>利用<sup>31</sup>P NMR法对鸡蛋磷脂进行分析,检出PC、LPC、SM、PE、CL、LPE和PA。本研究中,大豆磷脂、鸡蛋磷脂、乳清蛋白粉的总磷脂含量分别为55.12%、46.49%、7.95%,虽然乳清蛋白粉的总磷脂含量低于大豆磷脂和鸡蛋磷脂的,但高于奶粉(4.99~15.04 mg/100 mL)的,这表明它们在生产过程中成功对磷脂进行了富集。乳清蛋白粉、大豆磷脂和鸡蛋磷脂中含量最高的磷脂均为PC,含量分别是2.54%、17.06%和43.25%,这与之前报道<sup>[20-24]</sup>中的研究结果一致。

## 2.6 不同来源的磷脂组成差异

对比不同来源的磷脂组成及相对含量,结果如表6所示。

表6 不同来源的磷脂组成及相对含量

磷脂	母乳	全脂奶粉1	全脂奶粉2	婴配粉1	婴配粉2	婴配粉3	乳清蛋白粉	大豆磷脂	鸡蛋磷脂
LPA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.89	nd
PA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	11.45	nd
CL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.42
PG	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.14	nd
LPE	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.32	nd
DPG	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.74	nd
APE	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.41	nd
PE	27.71	24.97	37.07	37.72	29.80	31.78	28.64	12.75	4.00
SM	34.61	28.63	23.25	nd	nd	15.56	20.73	nd	nd
PS	4.67	nd	nd	8.06	10.17	5.59	9.80	2.32	nd
PI	3.79	2.44	nd	nd	4.24	nd	8.92	23.98	nd
LPC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8.04	1.55
PC	29.22	43.95	39.68	54.22	55.79	47.07	31.91	30.95	93.03

由表6可知,母乳中磷脂含量最高的为SM,占总磷脂的34.61%,其次为PC和PE,分别占总磷脂的29.22%和27.71%,最少的为PS和PI,分别占总磷脂的4.67%和3.79%,这与之前的研究结果<sup>[25]</sup>相近。因为母乳中SM含量最高,所以在比较不同磷脂来源的样品时SM的含量尤其令人关注。由表6可知,全脂奶粉及婴配粉中磷脂含量最高的均为PC,占总磷脂的39.68%~55.79%,但仅在全脂奶粉及婴配粉3中检出SM,占总磷脂的15.56%~

28.63%,低于母乳中SM的相对含量(34.61%)。乳清蛋白粉中SM占总磷脂的20.73%,虽然略低于母乳中SM的相对含量,但大豆磷脂和鸡蛋磷脂中并未检出SM,这表明乳清蛋白粉或许可以作为食品中SM的良好来源。

采用主成分分析方法对不同哺乳期的母乳、奶粉和乳清蛋白粉中磷脂组成的差异性进行分析,结果如图3所示。

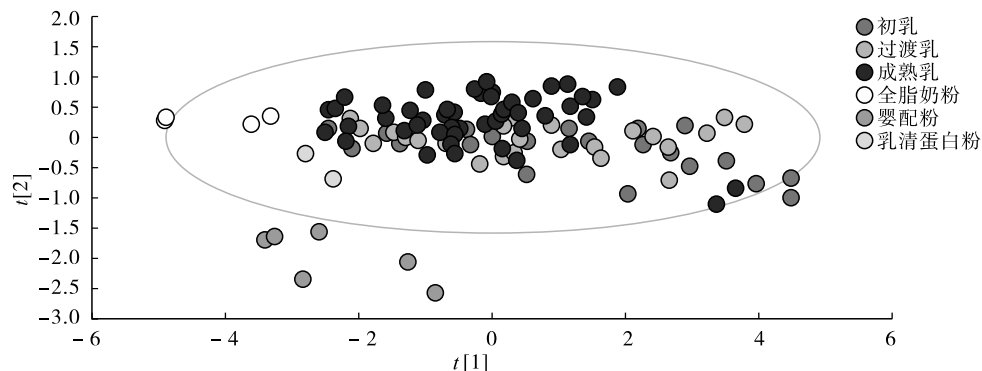


图3 母乳、奶粉、乳清蛋白粉 PCA 图

由图3可以看出,初乳大致分布在第四象限和PC1轴附近,过渡乳分布在PC1轴附近,成熟乳分布在第一、二象限,全脂奶粉分布在PC1负轴最左侧,婴配粉在95%置信区间之外,乳清蛋白粉分布在第三象限。结果表明不同哺乳期的母乳在磷脂组成上差异性不大,婴配粉与母乳在磷脂组成上的差异性要比全脂奶粉和乳清蛋白粉与母乳之间的差异性更大,印证了前面论述的结果。

### 3 结论

本研究建立了基于 $^{31}\text{P}$  NMR法测定乳制品中磷脂含量的分析方法,并进行了方法学验证。所建立的方法可以满足对母乳、婴幼儿配方奶粉以及乳制品中磷脂定量的需求。研究发现,婴幼儿配方奶粉、全脂奶粉中的磷脂含量为4.99~15.04 mg/100 mL,均低于母乳中的磷脂含量(19.27 mg/100 mL),且仅有1款市售添加乳清蛋白粉的婴幼儿配方奶粉中检出母乳中含量最高的SM。除此之外,还对婴幼儿配方奶粉中常添加的富含乳磷脂的乳清蛋白粉、大豆磷脂、鸡蛋磷脂的磷脂含量与组成进行了研究,结果发现,大豆磷脂和鸡蛋磷脂的总磷脂含量远高于富含乳磷脂的乳清蛋白粉,大豆磷脂的磷脂种类最丰富,在富含乳磷脂的乳清蛋白粉中检出少量的SM。不同来源的磷脂在磷脂种类和含量上各有差异,进一步研究不同磷脂组分的生理功能和通过不同来源的磷脂制备模拟母乳脂肪球的结构是未来研究的关键内容。

### 参考文献:

[1] 雷守成,田金凤,孙卓然,等.呼和浩特市母乳中磷脂含量及影响因素分析研究[J]. 中国乳品工业,2020, 48(12): 24-27.  
 [2] KEENAN T W. Historical perspective: milk lipid globules and their surrounding membrane: a brief history and perspectives for future research [J]. J Mammary Gland Biol, 2001, 6(3): 365-371.  
 [3] HUANG T C, KUKSIS A. A comparative study of the

lipids of globule membrane and fat core and of the milk serum of cows[J]. Lipids, 1967, 2(6): 453-460.

- [4] PATTON S, KEENAN T W. The relationship of milk phospholipids to membranes of the secretory cell [J]. Lipids, 1971, 6(1): 58-61.  
 [5] 郑姗,于景华,刘晓辉,等. 乳脂肪球膜中的脂类及其在婴儿配方乳粉中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2019, 42(3): 34-38.  
 [6] 张雪,杨洁,韦伟,等. 乳脂肪球膜的组成、营养及制备研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 292-302.  
 [7] 王紫薇,罗洁,彭海鑫,等. 乳脂肪球膜的研究进展[J]. 中国奶牛, 2014(18): 34-39.  
 [8] SALA-VILA A, CASTELLOTE A I, RODRIGUEZ-PALMERO M, et al. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): changes during lactation[J]. Nutrition, 2005, 21(4): 467-473.  
 [9] ZOU X Q, GUO Z, HUANG J H, et al. Human milk fat globules from different stages of lactation: a lipid composition analysis and microstructure characterization [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(29): 7158-7167.  
 [10] GARCIA C, LUTZ N W, CONFORT-GOUNY S, et al. Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by  $^{31}\text{P}$  NMR: towards specific interest in human health [J]. Food Chem, 2012, 135(3): 1777-1783.  
 [11] MA L, MACGIBBON A, MOHAMED H, et al. Determination of phospholipid concentrations in breast milk and serum using a high performance liquid chromatography-mass spectrometry-multiple reaction monitoring method [J]. Int Dairy J, 2017, 71: 50-59.  
 [12] WEI W, YANG J, YANG D, et al. Phospholipid composition and fat globule structure I: comparison of human milk fat from different gestational ages, lactation stages, and infant formulas [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(50): 13922-13928.  
 [13] WEI W, JIN Q Z, WANG X G. Human milk fat substitutes: past achievements and current trends [J]. Prog Lipid Res, 2019, 74: 69-86.

- [14] CLAUMARCHIRANT L, CILLA A, MATENCIO E, et al. Addition of milk fat globule membrane as an ingredient of infant formulas for resembling the polar lipids of human milk[J]. *Int Dairy J*, 2016, 61: 228–238.
- [15] BETTJEMAN B I, HOFMAN K A, BURGESS E J, et al. Seafood phospholipids: extraction efficiency and phosphorous nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^{31}\text{P}$  NMR) profiles[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2018, 95(7): 779–786.
- [16] YANG Y, HISERODT R, LI J. Rapid identification and relative quantification of the phospholipid composition in commercial lecithins by  $^{31}\text{P}$  NMR[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2017, 94(7): 885–892.
- [17] GLONEK T.  $^{31}\text{P}$  Nuclear magnetic resonance phospholipid analysis of anionic – enriched lecithins[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1998, 75(5): 569–573.
- [18] FONG B, MA L, NORRIS C. Analysis of phospholipids in infant formulas using high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(4): 858–865.
- [19] FOLCH J, LEES M, STANLEY G H 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] VDIEHI W K. High resolution NMR spectroscopy [J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2001, 103(12): 830–834.
- [21] MONAKHOVA Y B, DIEHL B. Automated multicomponent phospholipid analysis using  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy: example of vegetable lecithin and krill oil[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(30): 7891–7900.
- [22] KATO T, NISHIMIYA M, KAWATA A, et al. Quantitative  $^{31}\text{P}$  NMR method for individual and concomitant determination of phospholipid classes in polar lipid samples [J]. *J Oleo Sci*, 2018, 67(10): 1279–1289.
- [23] SOTIRHOS N, HERSLIF B, KENNE L. Quantitative analysis of phospholipids by  $^{31}\text{P}$  – NMR[J]. *J Lipid Res*, 1986, 27(4): 386–392.
- [24] YAO L, JUNG S.  $^{31}\text{P}$  NMR phospholipid profiling of soybean emulsion recovered from aqueous extraction [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(8): 4866–4872.
- [25] ZOU X, HUANG J, JIN Q, et al. Lipid composition analysis of milk fats from different mammalian species: potential for use as human milk fat substitutes [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(29): 7070–7080.
- 
- (上接第30页)
- [22] SUN W W, SHI B W, XUE C H, et al. The comparison of krill oil extracted through ethanol – hexane method and subcritical method [J]. *Food Sci Nutr*, 2019, 7(2): 700–710.
- [23] WANG L L, YANG F, RONG Y L, et al. Effects of different proteases enzymatic extraction on the lipid yield and quality of Antarctic krill oil [J]. *Food Sci Nutr*, 2019, 7(1): 2224–2230.
- [24] 谢丹. 精炼及储藏对菜籽油品质的影响[D]. 江苏无锡: 江南大学, 2012.
- [25] LU F, BRUHEIM I, HAUGSGJERD B O, et al. Effect of temperature towards lipid oxidation and non – enzymatic browning reactions in krill oil upon storage [J]. *Food Chem*, 2014, 157: 398–407.
- [26] CUI L, MCCLEMENTS D J, DECKER E A. Impact of phosphatidylethanolamine on the antioxidant activity of  $\alpha$  – tocopherol and trolox in bulk oil [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(12): 3288–3294.
- [27] CUI L, DECKER E A. Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants? [J]. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(1): 18–31.
- [28] LU F, BRUHEIM I, JACOBSEN C. New parameters for evaluating the quality of commercial krill oil capsules from the aspect of lipid oxidation and non – enzymatic browning reactions [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2015, 117(8): 1214–1224.
- [29] HIDALGO F J, NOGALES F, ZAMORA R. Determination of pyrrolized phospholipids in oxidized phospholipid vesicles and lipoproteins [J]. *Anal Biochem*, 2004, 334(1): 155–163.
- [30] LU H, BRUHEIM I, JACOBSEN C. Oxidative stability and non – enzymatic browning reactions in Antarctic krill oil (*Euphausia superba*) [J]. *Lipid Technol*, 2014, 26(5): 111–114.
- [31] ULUATA S, DURMAZ G, MCCLEMENTS D J, et al. Comparing DPPH fluorescence and UV based methods to assess oxidation degree of krill oil – in – water emulsions [J/OL]. *Food Chem*, 2020, 339: 127898 [2021–07–31]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127898>.
- [32] MOSCA M, CUOMO F, LOPEZ F, et al. Role of emulsifier layer, antioxidants and radical initiators in the oxidation of olive oil – in – water emulsions [J]. *Food Res Int*, 2013, 50(1): 377–383.
- [33] TIKEKAR R V, JOHNSON A, NITIN N. Fluorescence imaging and spectroscopy for real – time, in – situ characterization of interactions of free radicals with oil – in – water emulsions [J]. *Food Res Int*, 2011, 44(1): 139–145.