

乳及乳制品中磷脂检测技术研究进展

李子豪¹, 张璐^{1*}, 何强¹, 孔祥虹¹, 任佳琦¹, 邹阳¹,
李莹¹, 施妍婧¹, 王爽²

(1. 西安海关技术中心, 西安 710068; 2. 西安海关, 西安 710061)

摘要: 乳及乳制品作为人们日常消费的商品, 其营养价值十分丰富, 其中以乳脂为代表的一大类营养成分起到重要作用。磷脂作为乳脂重要组成成分, 具有多种生理功能, 与人类健康、疾病密切相关, 在国内外广受关注。磷脂组学是通过定性及定量分析磷脂化合物从而开展相关研究的学科, 而磷脂分析技术是实现磷脂组学研究的关键步骤。基于此, 本文综述了磷脂的分类、结构、作用及检测方法 4 个方面, 对磷脂的分类和结构做了详细介绍, 对磷脂的功能作用进行了总结论述, 对磷脂的分析检测方法进行了查新及对比研究, 最后展望了乳及乳制品中磷脂类化合物的检测发展趋势, 并阐述了乳及乳制品中磷脂学研究的意义, 即建立乳及乳制品中以磷脂为标示物的指纹图谱便于真假鉴别, 以及缩小婴幼儿配方乳粉与母乳之间的差异以减少对母乳的依赖。

关键词: 磷脂; 乳及乳制品; 检测技术

Research progress of detection technique of phospholipids in milk and milk products

LI Zi-Hao¹, ZHANG Lu^{1*}, HE Qiang¹, KONG Xiang-Hong¹, REN Jia-Qi¹, ZOU Yang¹,
LI Ying¹, SHI Yan-Jing¹, WANG Shuang²

(1. Xi'an Customs Technology Center, Xi'an 710068 China; 2. Xi'an Customs District People's Republic of China, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT: As a kind of daily consumption goods, the milk and milk products contains rich nutrition, what's more, the representative milk fat play an important part. Phospholipids, the important constituents of milk fat, have many different physiological functions and are closely related to human health and diseases, and the phospholipids are brought into focus around the world. Phospholipidomics is a discipline to carry out related research through qualitative and quantitative analysis of phospholipid compounds, and phospholipid analysis technology is the key step to realize the research of phospholipid proteomics. Based on this, this paper summarized the classification, structure, function and detection methods of phospholipids, introduced the classification and structure of phospholipids in detail, summarized and discussed the function of phospholipids, made novelty search and comparative study on the analysis and detection methods of phospholipids, and finally looked forward to the development trends of detection of phospholipid compounds in milk and dairy products, and expounded the significance of phospholipid research in milk and dairy products, that is, establishing fingerprints of milk and dairy

基金项目: 海关总署科技计划项目(2021HK209)、陕西省重点研发计划项目(2017NY-165)、陕西省科技创新基金项目(2017KTPT-06)

Fund: Supported by the Technology Project Foundation of Customs (2021HK209), the Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2017NY-165), and the Technology Innovation Project Foundation of Shaanxi Province (2017KTPT-06)

***通信作者:** 张璐, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为乳制品中特征营养成分鉴定。E-mail: lindazhanglu@126.com

***Corresponding author:** ZHANG Lu, Master, Senior Engineer, Xi'an Customs Technology Center, No.10, Hanguang North Road, Beilin District, Xi'an 710068, China. E-mail: lindazhanglu@126.com

products with phospholipids as markers to facilitate the identification of true and false, and reducing the difference between infant formula milk powder and breast milk to reduce the dependence on breast milk.

KEY WORDS: phospholipids; milk and milk products; detection technique

0 引言

磷脂是生物体不可或缺的物质,其在细胞膜合成、细胞间信号传导、大脑发育、婴幼儿成长过程能量获得等方面具有重要的作用^[1-4]。此外磷脂还具有调节人体代谢、增强免疫功能的作用,其在降低胆固醇、防止动脉硬化、预防心血管疾病等方面效果显著^[5-7]。鉴于磷脂在生理学上的重要作用,磷脂研究已成为科学领域的关注热点之一,特别是对不同乳及乳制品中的磷脂的分型及含量情况较为关注。据报道,乳中脂肪主要以脂肪球呈现,而磷脂主要存在于乳脂球膜(milk fat globule membrane, MFGM)中,乳脂球膜能够延缓甘油三酯的合成,阻止其发生酶解反应,进而防止乳制品发生酸败或变质;母乳中的鞘磷脂则是构成神经鞘的关键物质之一,对婴儿的大脑生长和智力发育有着密切的联系^[4]。不同乳及乳制品中磷脂含量及类型有所差异,另外随着人们对磷脂的深入了解,发现同类磷脂化合物中包含不同脂肪酸链的分子,磷脂分子理论总数超过 1000 种^[8]。如何实现乳制品中不同磷脂化合物的鉴别及含量测定成为了科学界关注的焦点问题。

随着科技的发展,对磷脂的分析手段不断更新。从液相色谱法^[9-12]到液相色谱-三重四极杆串联质谱法^[13-17],再到高效液相色谱-高分辨质谱法^[18-23]等,反映了磷脂分析技术的不断发展。本文拟从乳及乳制品中磷脂的结构、分类、功能及检测技术等方面进行归纳总结,对磷脂检测技术的发展进行展望,为磷脂组学研究发展新技术、新方法提供具有价值的参考。

1 磷脂结构及分类

磷脂(phospholipids, PL)是一类含有磷酸基团的脂类物质,属于极性脂类。根据其主链结构分为鞘磷脂(sphingophospholipid)与甘油磷脂(glycerophospholipids)两大类。甘油磷脂(图 1A)主要是由极性部分(头部)和非极性部分(尾部)组成,根据其头部极性基团的不同可以细分为磷脂酰胆碱(phosphatidylcholines, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamines, PE)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserines, PS)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositols, PI)、磷脂酰甘油(phosphatidyl glycerols, PG)、甘油磷脂酸(phosphatidic acid, PA)等。甘油磷脂的尾部是非极性基团,主要是由 1 至 2 条不同碳原子数的脂肪酸链构成。甘油磷脂是机体含量最多的一类磷脂,它除了构成生物

膜外,还是胆汁和膜表面活性物质等的成分之一,并参与细胞膜对蛋白质的识别和信号传导。鞘磷脂(sphingomyelin, SM)的结构与甘油磷脂相似(图 1B),但与甘油磷脂不同,鞘磷脂分子中与脂肪酸链相连的是鞘氨醇(sphingosine, Sph),这种结构称为神经酰胺(ceramide, Cer),是构成鞘磷脂的基本结构。鞘磷脂是细胞膜的主要组成成分,其代谢产物如 Cer、Sph、1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是具有生物活性的信号分子,可作为第一和(或)第二信使调控细胞的生命活动,如细胞的生长、分化、衰老和凋亡等许多重要的信号转导过程。

2 乳及乳制品中磷脂的功能

乳及乳制品除可提供优质蛋白外,其乳脂球膜含有的磷脂、鞘磷脂(神经节苷脂、神经鞘磷脂、甘油磷脂)等营养成分^[24],可协助肠道黏膜形成保护屏障,抵御外来致病微生物,同时通过产生具有杀菌或免疫刺激活性的多肽、参与 T 细胞增殖和代谢等途径,对机体免疫功能起到调节作用。

2.1 对大脑发育的作用

尽管乳及乳制品中磷脂含量有限,但对人体大脑的发育有着重要作用,尤其是对婴儿大脑的认知和发育起着至关重要的作用。大脑中的各个细胞通过乙酰胆碱来传递信息,而 PC 则是乙酰胆碱的前体。PC 会促进合成用于脑部发育的乙酰胆碱、提高脑细胞活性、加快脑神经传递速度。已有研究表明,在婴儿发育初期补充富含磷脂的乳脂球膜,能显著提高其在 12 月龄时的认知能力^[25],是婴儿大脑发育时期不可或缺的物质。磷脂中另一重要成分—SM 参与人体细胞主要活动,是乙酰胆碱的主要来源之一,乙酰胆碱中 PC 与 SM 占磷脂组成的 20%。研究表明补充外源性 PC 及 SM 可使大脑和神经系统健康完善,提高记忆力^[26],具有强大功效。TANAKA 等^[27]对比两组低体重早产儿采用不同喂养方式后的大脑发育情况,其中喂养含 SM 的强化乳称为强化组,喂养普通乳称为对照组,追踪研究后发现,强化组婴儿大脑发育程度均优于对照组。PS 是大脑细胞膜的活性物质,负责调控脑细胞功能,由于其具有舒缓血管的作用,可以增加脑部供血,从而增强大脑记忆力。有研究表明,PS 对阿尔茨海默病有着减轻症状的作用。鉴于磷脂对婴儿大脑发育的重要功能,婴幼儿配方乳粉的开发应尽可能缩小与母乳的差异性,尤其是磷脂种类和含量的差异性,通过对母乳中磷脂的研究,也会有助于婴儿配方乳粉的研制。

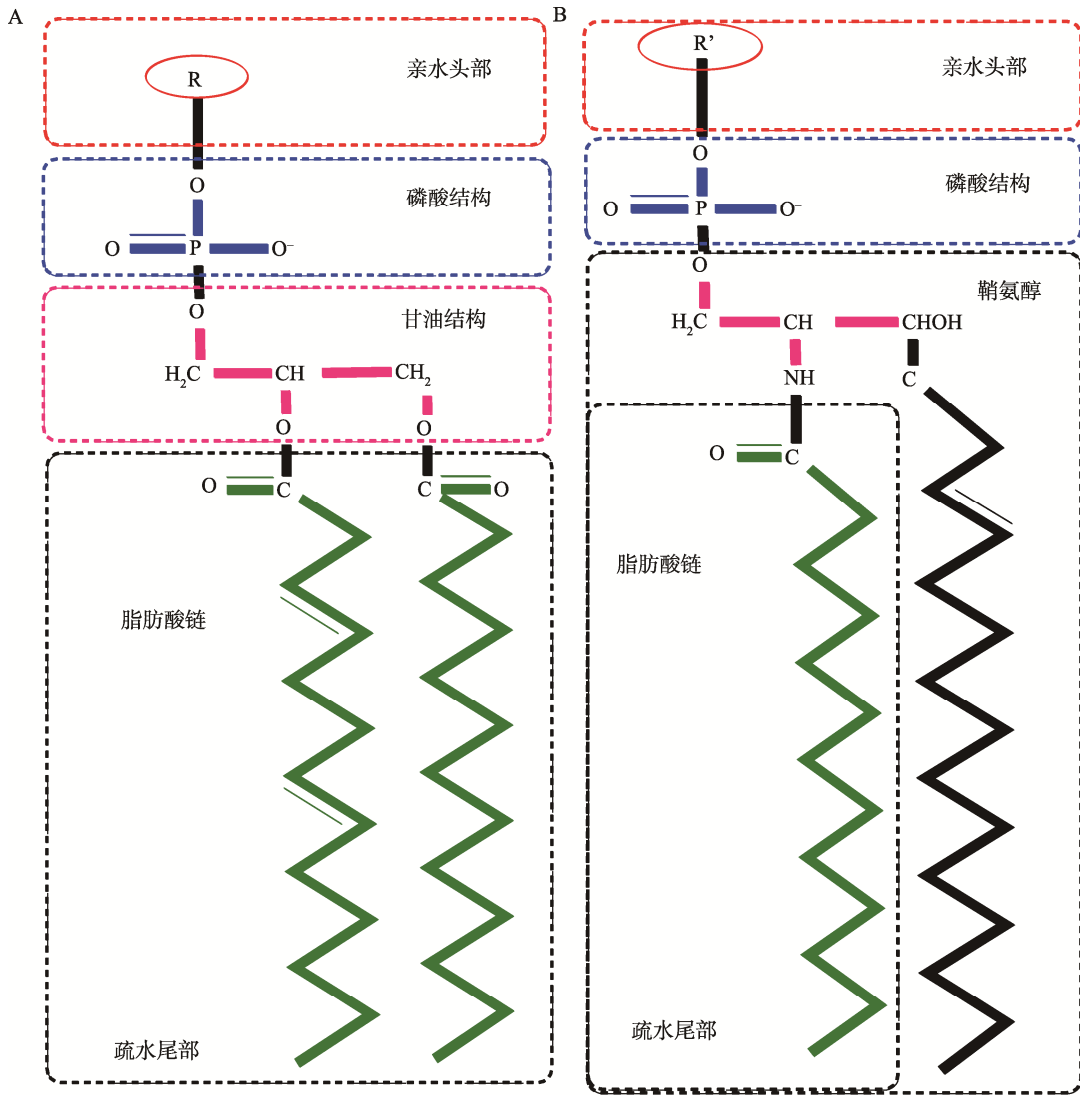


图 1 甘油磷脂骨架(A)与鞘磷脂骨架(B)
Fig.1 Structures of glycerophospholipids (A) and sphingomyelin (B)

2.2 调节脂肪的功能

磷脂对脂肪的调节和运输有重要作用。磷脂可以吸收脂肪并储存脂肪酸,同时可以改善脂肪的吸收方式,防止固醇类物质的积累,保持血管畅通,从而可预防心脑血管疾病^[28]。研究发现磷脂能够显著降低人体中胆固醇、甘油三酯^[29],有助于将脂肪转化为更容易转移和运输的脂滴,便于脂肪酶与脂滴结合,从而提高脂肪酸的转化效率和利用率。

2.3 延缓细胞的衰老

磷脂是生物膜的主要组成成分,参与细胞的生长发育活动。研究表明,磷脂可以修补损伤的细胞,增加脂肪酸不饱和度,完善细胞膜的功能,延缓细胞衰老^[6],还可以提高细胞的代谢功能,防止脂肪变质。全令君等^[30]通过试验发现,磷脂的破坏会导致以此为骨架的乳脂球膜损坏,

进而加快乳及乳制品的变质速度。

3 磷脂的检测方法

目前针对磷脂类物质的分析检测技术可分为 5 类,分别为比色法、薄层色谱法、液相色谱法、色谱-串联质谱法及核磁共振法,本文将分别讨论不同检测技术的应用情况及优缺点。

3.1 比色法

比色法鉴于其成本低廉、测定结果相对准确的特点,目前仍然作为一种经典的分析方法被使用。胡淑红等^[31]建立了使用钼蓝比色法测定蛋白乳清粉中总磷脂含量的方法,该方法采用甲醇-三氯甲烷提取,乳粉样品经高温灼烧后使用比色法测定总磷的含量,然后将结果乘以换算系数得到乳粉中总磷脂的含量。比色法作为一种传统的分析方法,其优点在于成本低廉、普适性强、定性结果较为准确,

但其只能测定总磷脂的含量,无法对磷脂的组成类别和含量进行进一步分析,另外由于其机制为通过测定磷的含量来计算磷脂的含量,若样品中含有其他磷化合物,那么有可能会被一同转化为磷脂而被引入计算,造成结果不准确。由于技术原理的原因导致比色法在测定磷脂方面存在一些限制,目前不是主流磷脂学分析的主流手段。

3.2 薄层色谱法

薄层色谱法(thinlayer chromatography, TLC)也称薄层层析法,是利用不同化合物对吸附剂的吸附能力不同,使得化合物彼此分离。薄层层析法作为最早测定磷脂的方法之一,适用于多种磷脂的分离及定量,目前仍然广泛应用。薄层色谱法的优点是操作简单、灵敏度高、成本投入较少等,缺点是自动化水平较低、预处理阶段较为烦琐、点样操作经验性强、人工操作因素对检测结果的影响较大。早在 1983 年,CHRISTIE^[32]就利用了薄层色谱法对乳中包含磷脂在内的脂质物质进行了研究,较早地发现了不同动物的乳中脂类物质组成差异较大,而不同乳中的部分磷脂却具有相似的结构。SÁNCHEZ-JUANES 等^[33]在 2009 年使用一种改进型高效薄层色谱法(high performance thinlayer chromatography, HPTLC)技术开展了生牛乳中磷脂组分分析,揭示了生牛乳中主要磷脂成分,并得出 PL 在牛乳中的分布相似,但含有 PL 的脂肪酸却各不相同的结论;近些年来随着检测技术的发展和仪器设备的革新,薄层色谱法已经慢慢淡出人们的视野,在磷脂类化合物分析方面已经较少使用,取而代之的则是精密度更高、自动化程度更强的仪器,例如高效液相色谱、质谱、核磁共振等仪器。

3.3 高效液相色谱法

高效液相色谱法是目前分析化合物应用最为广泛的方法之一。与前述方法相比,其能够更加精细分离各种类别的磷脂,更加适合不同类别、不同磷脂分子的分离。GB/T 35867—2018《粮油检验 卵磷脂中磷脂含量的测定 高效液相色谱蒸发光散射检测法》中使用正相色谱体系测定卵磷脂中磷脂。梁雪等^[9]建立了高效液相色谱-蒸发光散射法测定母乳及牛乳中的 PE、PI、PS、PC、SM 5 种磷脂含量的方法,结果表明该方法快速可靠。周芳梅等^[12]使用固相萃取-高效液相色谱-蒸发光散射法测定了 6 种乳粉及乳饮料中的磷脂酰丝氨酸,该方法灵敏度高、准确度高、重复性满足要求。要爽^[34]建立了高效液相色谱法测定牛奶中 PC 的方法,该方法采用氯仿-甲醇作为提取溶剂,利用 C₁₈ 柱进行分离,采用紫外检测器于 190~400 nm 波长进行扫描,结果表明该方法准确度高,适用于牛奶中 PC 含量的测定。高效液相色谱法作为一种稳定性强的分析方法,目前也经常被用来检测分析磷脂化合物,虽然部分磷脂化合物具有高灵敏度,但也存在一定的局限性,如分析时间通

常较长、目标物受基质干扰情况较为严重、对于化学性质相近或类似的磷脂化合物则无法分离、测定 PE 的含量时,使用高效液相色谱法测定出的结果有可能是几种磷脂化合物的总含量等,此时就需要引入其他手段来进行检测。

3.4 色谱-串联质谱法

色谱-质谱分析方法目前技术成熟,按分离模式可分为气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)和液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS),这类方法具有高灵敏度、分析速度快、鉴定能力强的特点,在磷脂定量和鉴定方面有着比其他分析方法更强的优势,可实现对不同磷脂化合物的定量定性分析。

气相色谱-串联质谱法用于检测易挥发性或经过衍生后易挥发的化合物,常见用于脂肪酸的定量分析检测,对于结构更加复杂且不易挥发的磷脂化合物,目前暂无使用 GC-MS/MS 研究磷脂分类的报道。

液相色谱-串联质谱法是目前磷脂化合物分析的主要方法。该技术将液相色谱和质谱相结合,利用两者优势,可以实现磷脂化合物的定性定量分析。LINDAHL 等^[35]利用液相色谱-串联质谱法建立了母乳中的 31 种磷脂化合物定量分析的方法,该方法利用 Waters HILIC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)分离,多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式质谱扫描实现了多种磷脂化合物同时定量分析。FONG 等^[13]利用液相色谱-串联质谱法建立了婴儿配方乳粉中包括 SM 在内的共 5 种磷脂化合物的检测方法,该方法利用 APS-2 Hypersil 亲水性色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm)分离,母离子和中性丢失两种方式结合的质谱扫描,实现了 5 种磷脂化合物的检测。REIS 等^[17]利用超高效液相色谱-串联质谱法对乳脂中的卵磷脂、鞘磷脂及磷脂酰乙醇胺 3 种磷脂化合物进行分析,该方法采用 Shimadzu C8 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm)分离,采用母离子和中性丢失相结合的质谱扫描方式,实现了乳脂中 3 种磷脂化合物的检测。

基质辅助激光解吸电离质谱法(matrix assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, MALDI-MS)是一种新型快速鉴定化合物的技术,常与飞行时间质谱法(time of flight-mass spectrometry, TOF-MS)联合使用,凭借 MALDI 的快速引入样品与 TOF 快速筛查分析的特点,该方法适合于乳制品中掺假的鉴定工作^[36]。MALDI-MS 具有快速灵敏、操作便捷、重复性好、适用高通量样品的特点,未来可向便携式方向发展,可应用于现场打假等场景。但使用 MALDI-MS 时为了更加准确地定性与定量,必须选择合适的基质来辅助样品的电离,且由于电离方式的局限性,对某些不易电离的磷脂进行定量分析较为困难^[37],希望在未来能够攻克这一难题,打破局限性,使 MALDI-MS 发挥更大的作用。

近些年来利用高分辨质谱法定量和鉴定乳及乳制品中的磷脂受到关注, 通过对不同乳品^[38-39]中磷脂组成的差异分析, 形成不同乳品中磷脂组分数数据库, 建立乳品中磷脂的指纹图谱, 在乳品打假、掺假鉴定、婴幼儿配方奶粉的开发方面均有极其重要的作用。曹雪等^[19]利用超高效液相色谱-串联四极飞行时间质谱法(ultra performance liquid chromatography-triple-time of flight-mass spectrometry, UPLC-Triple-TOF-MS/MS)对巴氏杀菌乳中的磷脂成分进行分析鉴定, 最终共鉴定出磷脂成分 68 种; LIU 等^[14]使用亲水作用-线性离子阱轨道阱组合式质谱法(hilic-linear ion trap quadrupole-orbitrap, Hilic-LTQ-Orbitrap)建立了牛乳中共 70 种磷脂化合物的定量方法, 同时利用 Orbitrap 质谱的快速筛查能力对 32 批牛乳中的关键磷脂化合物进行比对, 为研究牛乳中脂质组学提供了参考; ALI 等^[40]使用超高效液相色谱-串联四极飞行时间质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)对牛、骆驼等 5 种不同动物乳中的磷脂组成和含量进行了研究分析, 该方法采用亲水相互作用色谱柱进行分离, 结果共发现 22 种 PC 化合物和 15 种 PE 化合物及其他磷脂化合物, 这为分析不同动物乳中磷脂的差异情况做了基础性研究; 何杨波等^[18]利用 UPLC-Triple-TOF-MS/MS 对东北地区人乳中的磷脂成分进行了分析研究, 结果共发现了人乳中 60 种磷脂化合物, 且不同地区人乳中磷脂差异无显著差异, 而其他地区人乳

中磷脂的差异需要进一步研究; WANG 等^[23]使用 UPLC-Q-TOF-MS 对母乳、牛乳和羊乳中的磷脂进行了种类分析, 结果发现牛乳、羊乳中磷脂组成与母乳中有显著性差异, 此结果证实了通过研究磷脂的差异来鉴别不同乳及乳制品的可行性。GALLIER 等^[41]使用基质辅助激光解吸电离-串联四极飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, MALDI-Q-TOF-MS)成功鉴别出羊乳粉中 45 种特征磷脂, 且快速鉴定出了掺假的羊乳粉, 说明磷脂可以作为特征标记物来实现乳品打假的效果。CALVO 等^[42]利用基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对牛奶、巧克力牛奶和黄油中的磷脂种类进行了差异化鉴别, 结果发现共 3 大类 24 种磷脂化合物存在差异, 对后期建立磷脂组学数据库起到重要的推动作用。张宏达等^[43]基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(ultra high performance liquid chromatography-quadrupole time-of flight-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS)对母乳、牛乳及羊乳中的脂质组分对比研究, 发现牛乳与母乳的磷脂组成与含量存在显著差异, 而羊乳与母乳的磷脂差异相对较小, 这揭示了不同乳中磷脂组成的差异情况, 丰富了我国乳品研究数据库, 同时也为婴幼儿配方乳粉的开发工作提供参考依据。表 1 列出了部分使用液相色谱-串联质谱法测定磷脂的方法。

表 1 采用液相色谱-串联质谱法测定乳及乳制品中磷脂的方法汇总表
Table 1 Summary of method for determination of phospholipids in milk and milk power by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

乳品基质	分析方法	流动相组成	色谱柱类型	离子源	扫描模式
婴幼儿配方乳粉	HPLC-MS	/	APS-2 Hypersil hydrophilic	ESI	MRM、Neutral loss ^[13]
婴幼儿配方乳粉	HPLC-MS	三氯甲烷、甲醇、乙酸铵	Polaris 3 Si	ESI	MRM ^[24]
牛乳	UPLC-MS	乙腈(含乙酸铵)、甲醇(含乙酸铵)	Kinetex HILIC	ESI	Full Scan、Product ion ^[16]
牛乳	UPLC-MS	甲醇水、异丙醇	C8 Shimadzu column	ESI	Precursor ion、Product ion、Neutral loss ^[17]
母乳	HPLC-MS/MS	/	APS-2 Hypersil hydrophilic	ESI	Precursor ion、Neutral loss ^[15]
母乳	HPLC-MS/MS	甲酸铵、乙腈	Waters HILIC	ESI	MRM ^[35]
牛乳	LC-MS	乙腈(含甲酸水)、乙酸铵	Luna HILIC	HESI	Full scan、ddMS ² ^[14]
驴乳	UPLC-Triple-TOF-MS/MS	乙腈+碳酸氢铵+水、乙腈+碳酸氢铵+异丙醇	Phenomen Kinetex C ₁₈	ESI	Full scan-IDA-MS ² ^[22]
牛乳	UPLC-Triple-TOF-MS/MS	水+甲醇+乙腈、异丙醇+乙腈	Waters ACQUITY UPLC®BEH C ₁₈	ESI	Full scan-IDA-MS ² ^[19]
母乳等	UPLC-Q-TOF-MS	乙腈(含碳酸氢铵)、乙腈+甲酸水(含碳酸氢铵)	Phenomen Kinetex C ₁₈	ESI	Full scan、MS ² ^[23]
母乳	UPLC-Triple-TOF-MS/MS	水+甲醇+乙腈(含乙酸铵)、异丙醇+乙腈(含乙酸铵)	Waters ACQUITY UPLC®BEH C ₁₈	ESI	Full scan、MS ² ^[18]

注: 高效液相色谱-质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS); 超高效液相色谱-质谱法(ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS); 液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry); Neutral loss: 中性丢失; Full Scan: 全扫描; Product ion scan: 子离子扫描; Precursor ion: 母离子扫描; ddMS²: 数据依赖性质谱二级扫描(data-dependent MS/MS); Full scan-IDA-MS²: 全扫描-触发信息依赖性采集-质谱二级扫描(Full scan-information dependent acquisition-MS/MS); /为未报道。

3.5 核磁共振法

核磁共振磷谱 (^{31}P -NMR) 也可用于磷脂化合物的测定。 ^{31}P -NMR 的原理是利用不同磷脂分子中的磷原子会呈现出不同的旋转位移, 然后通过核磁共振来甄别不同的磷脂化合物^[44]。与 MS 分析相比, ^{31}P -NMR 更适合于鉴定复杂基质中的多种磷脂化合物, 借助其较高的灵敏度及较快的分析速度, 适用于大批量样品的连续进样分析。与 MS 不同的是, ^{31}P -NMR 的定量分析不需要参考物质及绘制标准曲线, 只需要对照谱库即可完成分析。 ^{31}P -NMR 的缺点在于普及率不高且过于昂贵、仪器设备维护成本较高、对操作人员的技术能力要求相对较高。

通过查阅相关研究能够发现, 乳及其制品中磷脂测定分析手段快速发展。虽然早期人们使用比色法、TLC 等手段进行分析, 存在诸多缺点, 但也同时为后期相关研究奠定了基础。TLC 作为 UPLC 的前身, 会逐渐被 UPLC 所替代。UPLC 目前是磷脂分析的主流检测方法之一, 具备快速、准确、稳定的特点, 搭配不同类型的检测器实现不同磷脂化合物的高灵敏度检测, 其经济成本与产出效用比最高, 适合于企业单位大规模固定项目的检测, 能够满足批量抽检的样品检测。如果需要对磷脂进行更加细致的分析工作以及其他前瞻性科研工作, 那么 MS 联用法将是最好的选择。可以看到 MS 作为一种检测器, 其前端可以搭配 LC 或 MALDI, 能够实现磷脂化合物的总量或分量的测定, 以及分子类型定性和结构分析。低分辨质谱可以一针进样, 同时对几十种甚至上百种磷脂化合物定性和定量, 高分辨质谱搭配标准谱库则可以实现目标磷脂化合物的快速鉴定或未知物的快速筛查, 满足脂质组学的需求。如果有条件, ^{31}P -NMR 法也是一种不错的选择方案, 其精度与 MS 法相媲美, 在不考虑成本核算的条件下, 适用于多种磷脂化合物的鉴定工作。根据不同检测方法的特点, 结合实际情况选择最佳的分析手段是结果可靠性的保证, 值得注意的是, 不同检测方法得到结果的差异性原因暂时无定论, 这可作为磷脂分析学后期的研究方向之一。

相关研究表明, 不同动物乳中磷脂存在差异。KLEIN 等^[45]对比了牛乳中乳脂的差异, 发现牛乳中甘油磷酸胆碱与磷酸胆碱可以作为奶牛患酮症的参考指标, 通过研究这两项指标的差异情况就能够及时发现奶牛患病情况, 进一步及时采取措施防止损失扩大; GARCIA 等^[46]采用 ^{31}P -NMR 法对牛乳、人乳、马乳、骆驼乳中的磷脂进行了对比研究, 结果发现人乳和骆驼乳中鞘磷脂和缩醛磷脂含量高于牛乳和马乳, 这两种磷脂对细胞活性起到重要作用, 对影响大脑的记忆力具有重要作用。ANDREOTTI 等^[47]使用 ^{31}P -NMR 对比了牛乳和水牛乳中磷脂差异, 结果显示这两种乳中磷脂的组成基本相同。MURGIA 等^[48]对羊乳和牛乳中磷脂进行了对比研究, 其中使用了新的溶剂体系—二

甲基甲酰胺/三乙基胺/盐酸胍, 结果表明新的方法可以显著提高图谱分辨率, 增强信号的稳定性。张雪等^[49]总结了人乳中的磷脂存在差异的原因, 除了地域差异及个体差异, 不同泌乳期的磷脂含量也是不同的, 此外磷脂含量高低也与检测方法有关, 虽然不同方法经验证后均能达到满意的效果, 但不同检测方法之间的横向对比相关研究相对较少, 胡雪等^[50]经统计数据后也得出相同结论, 不同文献所报道的磷脂含量数据差异较大, 数据间难以比较分析。

4 结束语

综上所述, 乳及乳制品中磷脂的结构组成、含量差异、来源分析、功能作用、检测技术等逐渐成为各领域的研究热点。高通量、高载量的筛查技术将成为未来磷脂解析的主流手段。通过研究不同乳及乳制品中的磷脂差异, 为未来构建乳及乳制品相关指纹图谱库提供了前瞻性的研究基础, 指纹图谱的建立会有效遏制乳品造假的行为, 从而提升我国乳及乳制品产品质量; 此外目前由于母乳不足或母亲用药导致无法正常喂养的情况逐渐增多, 婴幼儿配方乳粉成为首选替代品而受到青睐, 通过研究母乳及其他动物乳中磷脂类型及含量的差异, 为婴幼儿配方乳粉的研究和开发提供良好数据支持及研究方向, 在设计婴幼儿配方乳粉时尽量模拟母乳成分组成, 努力实现婴幼儿配方乳粉与母乳之间的“零差异”。

参考文献

- [1] 陈琼华, 梅美珍, 陈建智, 等. 生物化学(第3版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.
CHEN QH, MEI MZ, CHEN JZ, *et al.* Biological chemistry (3rd edition) [M]. Beijing: People Health Press, 1995.
- [2] 王光慈. 食品营养学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
WANG GC. Food nutrition [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001.
- [3] 顾瑞霞. 乳与乳制品的生理功能特性[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
GU RX. Physiological and functional characteristics of milk and dairy products [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2000.
- [4] 郭本恒. 乳品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
GUO BH. Dairy chemistry [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2001.
- [5] 李龙柱, 张富新, 贾润芳, 等. 不同哺乳动物乳中主要营养成分比较的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 396–400.
LI LZ, ZHANG FX, JIA RF, *et al.* Research progress of comparison of major nutritional components for different mammalian milk [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(19): 396–400.
- [6] 邱冀, 孟阳, 赵铎, 等. 不同哺乳动物乳中主要营养成分研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2021, 44(3): 50–54.
QIU J, MENG Y, ZHAO Y, *et al.* A review on the major nutritional components in milks of humans and domesticated mammals [J]. J Dairy Sci Technol, 2021, 44(3): 50–54.
- [7] 陈金玉, 张鑫, 吴祖芳, 等. EGCG 磷脂复合物抗氧化活性的研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(5): 137–143.

- CHEN JY, ZHANG X, WU ZF, *et al.* Antioxidant activity of (-)-epigallocatechin gallate-phospholipid complex [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2015, 31(5): 137–143.
- [8] 朱超, 梁琼麟, 王义明, 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.
- ZHU C, LIANG QL, WANG YM, *et al.* Advance in analysis and detection technologies for phospholipidomics [J]. *Chin J Anal Chem*, 2016, 44(6): 984–993.
- [9] 梁雪, 田芳, 蔡小堃, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定母乳及牛乳中5种磷脂质量浓度[J]. *中国乳品工业*, 2021, 49(7): 52–56.
- LIANG X, TIAN F, CAI XK, *et al.* Determination of five phospholipids in human milk and cow milk by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering [J]. *Chin Dairy Ind*, 2021, 49(7): 52–56.
- [10] FRANCESCA G, CRISTINA CH, EMMANUELLE B, *et al.* Temporal changes of human breast milk lipids of Chinese mothers [J]. *Nutrients*, 2016, 8(11): 715.
- [11] MARCEL B, BRIGITTE F, CLAUDIA C, *et al.* Quantification of phospholipids in infant formula and growing up milk by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector [J]. *J AOAC Int*, 2010, 93(3): 948–955.
- [12] 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.
- ZHOU FM, CHEN XJ, LUO XB, *et al.* Determination of phosphatidylserine in milk and dairy products by SPE-HPLC [J]. *China Food Addit*, 2021, 32(7): 127–131.
- [13] 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.
- [14] LIU ZQ, MOATE P, COCKS B, *et al.* Comprehensive polar lipid identification and quantification in milk by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 978–979: 95–102.
- [15] LIN M, MACGIBBON AKH, MOHAMED HJBJ, *et al.* Determination of phosphor-lipid 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.
- [16] TRENNERY VC, AKBARIDOUST G, PLOZZA T, *et al.* Ultra-high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry characterisation of milk polar lipids from dairy cows fed different diets [J]. *Food Chem*, 2013, 141(2): 1451–1460.
- [17] REIS MG, HARRIS P, BERRY C, *et al.* Tracking changes in volatile components and lipids after homogenisation and thermal processing of milk [J]. *Int Dairy J*, 2020, 103: 104624.
- [18] 何扬波, 龙明秀, 刘宁, 等. UPLC-Triple-TOF-MS/MS 法分析中国东北地区人乳磷脂的组成[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(7): 270–279.
- HE YB, LONG MX, LIU N, *et al.* UPLC-Triple-TOF-MS/MS analysis of the phospholipid composition of human milk from the northeast regions of China [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2017, 33(7): 270–279.
- [19] 曹雪, 任皓威, 王筱迪, 等. 基于 UPLC-Triple-TOF MS/MS 对巴氏杀菌乳中磷脂成分的分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 181–189.
- CAO X, REN HW, WANG XD, *et al.* Identifying and quantifying phospholipids in pasteurized milk using UPLC-Triple-TOF MS/MS [J]. *Food Sci*, 2021, 42(4): 181–189.
- [20] RICHTER G, SCHÖBER C, ROSMARIE S, *et al.* Comparison of the positive and negative ion electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectra of the reaction products of phosphatidylethanolamines and hypochlorous acid [J]. *Anal Biochem*, 2008, 376(1): 157–159.
- [21] LIU HY, GUO XQ, ZHAO QY, *et al.* Lipidomics analysis for identifying the geographical origin and lactation stage of goat milk [J]. *Food Chem*, 2020, 309: 125765.
- [22] LI MH, LI WX, WU JR, *et al.* Quantitative lipidomics reveals alterations in donkey milk lipids according to lactation [J]. *Food Chem*, 2020, 310: 125866.
- [23] WANG L, LI XD, LIU L, *et al.* Comparative lipidomics analysis of human, bovine and caprine milk by UHPLC-Q-TOF-MS [J]. *Food Chem*, 2020, 310: 125865.
- [24] IT A, PF A, LE Y, *et al.* Quantification of glycerophospholipids and sphingomyelin in human milk and infant formula by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer detector [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1072: 235–243.
- [25] 解庆刚, 李雪, 许英伟, 等. 磷脂促进婴儿大脑发育研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2018, 46(1): 33–36.
- XIE QG, LI X, XU YW, *et al.* Research progress of phospholipids in promoting infant brain development [J]. *China Dairy Ind*, 2018, 46(1): 33–36.
- [26] 胡小中. 磷脂酰胆碱的生理功能和作用机理[J]. *粮油食品科技*, 2011, 19(4): 42–44.
- HU XZ. Physiological function of phosphatidylcholine and its possible mechanism of action [J]. *Sci Technol Cere Oils Foods*, 2011, 19(4): 42–44.
- [27] TANAKA K, HOSOKAWA M, KUDO N, *et al.* The pilot study: Sphingomyelin-fortified milk has a positive association with the neurobehavioural development of very low birth weight infants during infancy, randomized control trial [J]. *Brain Dev*, 2013, 35(1): 45–52.
- [28] 王玉, 于雪, 张闻多, 等. 血清卵磷脂胆固醇酰基转移酶活性与冠心病的关系[J]. *中国心血管杂志*, 2019, 24(3): 205–208.
- WANG Y, YU X, ZHANG WD, *et al.* Association between lecithin: Cholesterol acyltransferase activity and coronary artery disease [J]. *Chin J Cardiovasc Med*, 2019, 24(3): 205–208.
- [29] 唐传核. 植物功能性食品[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- TANG CH. *Plant-functional foods* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [30] 全令君, 潘明慧, 艾娜丝, 等. MFGM 磷脂对乳品品质的影响[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(9): 308–315.
- TONG LJ, PAN MH, AI NS, *et al.* Effect of MFGM phospholipid on dairy quality [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2019, 19(9): 308–315.
- [31] 胡淑红, 王荣艳. 富含乳脂肪球膜蛋白乳清粉中总磷脂的含量测定方法研究[J]. *中国乳业*, 2020, (8): 73–76.
- HU SH, WANG RY. Determination of total phospholipid in whey powder rich in milk fat globule membrane protein [J]. *China Dairy*, 2020, (8): 73–76.
- [32] CHRISTIE WW. The composition and structure of milk lipids [J]. Springer Netherlands, 1983. DOI: 10.1007/978-94-010-9231-9_1
- [33] SÁNCHEZ-JUANES F, ALONSO JM, ZANCADA L, *et al.* Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes [J]. *Int Dairy J*, 2009, 19(5): 270–278.
- [34] 要爽. 高效液相色谱法测定牛奶中磷脂酰胆碱的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(14): 4722–4725.
- YAO S. Determination of phosphatidylcholine in milk by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(14): 4722–4725.

- [35] LINDAHL IEI, ARTEGOITIA V, DOWNEY E, *et al.* Quantification of human milk phospholipids: The effect of gestational and lactational age on phospholipid composition [J]. *Nutrients*, 2019, 11(2): 222.
- [36] TZOMPA-SOSA DA, MEURS PP, VAN VHJF. Triacylglycerol profile of summer and winter bovine milk fat and the feasibility of triacylglycerol fragmentation [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2018, 120(3): 1700291.
- [37] LIU ZQ, SIMONE R, BEN C. Milk lipidomics: What we know and what we don't [J]. *Prog Lipid Res*, 2018, 71: 70–85.
- [38] 李璞钰, 剧柠, 罗玉龙, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术分析原料乳冷藏过程中脂类代谢组学[J]. *食品科学*, 2021, 42(20): 120–127.
- LI PY, JU N, LUO YL, *et al.* Lipidomic analysis of raw milk during refrigerated storage using ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2021, 42(20): 120–127.
- [39] 章丽, 高洁, 刘松雁, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱鉴定嗜热链球菌发酵乳中脂质构成[J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 197–205.
- ZHANG L, GAO J, LIU SY, *et al.* Analysis of the lipid composition of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* using ultra-high performance liquid chromatography quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2021, 42(4): 197–205.
- [40] ALI AH, 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, (1): 143–154.
- [41] GALLIER S, GRAGSON D, CABRAL C, *et al.* Composition and fatty acid distribution of bovine milk phospholipids from processed milk products [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(19): 10503–10511.
- [42] CALVO MV, MARTÍN-HERNÁNDEZ MC, GARCÍA-SERRANO AM, *et al.* Comprehensive characterization of neutral and polar lipids of buttermilk from different sources and its milk fat globule membrane isolates [J]. *J Food Compost Anal*, 2020, 86: 103386.
- [43] 张宏达, 王立娜, 张宇, 等. 基于脂质组学对母乳、牛乳及羊乳脂质的差异分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(4): 207–213.
- ZHANG HD, WANG LN, ZHANG Y, *et al.* Comparative lipidomic analysis of human, bovine and caprine milk [J]. *Food Sci*, 2020, 41(4): 207–213.
- [44] 刘纯友, 马美湖, 王庆玲, 等. 核磁共振技术在食品脂质研究中的应用新进展[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(12): 342–346.
- LIU CY, MA MH, WANG QL, *et al.* New advances of application of nuclear magnetic resonance technology in food lipid research [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2017, 38(12): 342–346.
- [45] KLEIN MS, BUTTCHEREIT N, MIEMCZYK SP, *et al.* NMR metabolomic analysis of dairy cows reveals milk glycerol-phosphocholine to phosphocholine ratio as prognostic biomarker for risk of ketosis [J]. *J Proteome Res*, 2011, 11(2): 1373–1381.
- [46] GARCIA C, LUTZ NW, 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.
- [47] ANDREOTTI G, TRIVELLONE E, MOTTA A. Characterization of buffalo milk by ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *J Food Compost Anal*, 2006, 19(8): 843–849.
- [48] MURGIA S, MELE S, MONDUZZI M. Quantitative characterization of phospholipids in milk fat via ^{31}P NMR using a monophasic solvent mixture [J]. *Lipids*, 2003, 38(5): 585–591.
- [49] 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.
- ZHANG X, YANG J, WEI W, *et al.* Recent advances in composition, nutrition and preparation of milk fat globule membrane [J]. *Food Sci*, 2019, 40(1): 292–302.
- [50] 胡雪, 段国霞, 刘丽君, 等. 乳及乳制品中磷脂的含量、功能、分离及检测技术研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 350–361.
- HU X, DUAN GX, LIU LJ, *et al.* Recent progress in content, functionality, isolation and quantification of phospholipids in milk and milk products [J]. *Food Sci*, 2021, 42(19): 350–361.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



李子豪, 工程师, 主要研究方向为乳制品营养成分分析。
E-mail: 450570470@qq.com



张璐, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为乳制品中特征营养成分鉴定。
E-mail: lindazhanglu@126.com