

液相³¹P-NMR快速检测鱼子酱中磷脂

张明霞¹, 庞建光², 呼秀智³, 姬红萍⁴

(1.河北工程大学理学院, 河北 邯郸 056038; 2.河北工程大学建筑学院, 河北 邯郸 056038;

3.河北工程大学成人教育学院, 河北 邯郸 056021; 4.河北邯郸县农牧局, 河北 邯郸 056006)

摘 要: 建立液相³¹P-核磁共振光谱法快速检测鱼子酱食品中磷脂的分析方法。样品匀浆后氯仿和甲醇混合溶剂提取其中的全脂, 无需分离直接溶于氘代试剂后进行核磁分析。该方法回收率为96%~102%, 相对标准偏差不超过5%。采用本方法对4种品牌鱼子酱食品检测均发现6种磷脂组分存在, 且圆鳍鱼籽中磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰胆碱总量均占总磷脂量的80%以上, 而鲟鱼籽中磷脂酰肌醇含量远高于圆鳍鱼籽。其他3种磷脂磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂和甘油磷脂酸在2种取材的鱼子酱中含量相差不多。

关键词: ³¹P-核磁共振光谱法; 磷脂; 鱼子酱; 检测

Determination of Phospholipids in Caviar by Solution ³¹P-NMR

ZHANG Mingxia¹, PANG Jianguang², HU Xiuzhi³, JI Hongping⁴

(1. School of Science, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China;

2. School of Architecture, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China;

3. College of Continuing Education, Hebei University of Engineering, Handan 056021, China;

4. Agriculture and Animal Husbandry Bureau of Handan County, Handan 056006, China)

Abstract: An improved method for the determination of phospholipids in caviar by solution ³¹P-nuclear magnetic resonance (³¹P-NMR) was studied. The lipids in the sample were extracted with chloroform and methanol, dissolved in deuterated reagent and then analyzed by ³¹P-NMR without separation. The average recoveries of the established method were 96%–102%, with relative standard deviation (RSD) not exceeding 5%. Phospholipids of 4 commercial brands of caviar were analyzed and the relative distribution of phospholipid components was measured in mole percentage. It was found that phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine accounted for more than 80% of the total phospholipids in lumpfish roe, and phosphatidylinositol content in sturgeon roe was much higher than that of lumpfish roe. The contents of phosphatidylethanolamine, sphingomyelin and phosphatidic acid were similar in both fish roes.

Key words: ³¹P-nuclear magnetic resonance (³¹P-NMR); phospholipids; caviar; determination

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201606027

中图分类号: TS227

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 06-0153-04

引文格式:

张明霞, 庞建光, 呼秀智, 等. 液相³¹P-NMR快速检测鱼子酱中磷脂[J]. 食品科学, 2016, 37(6): 153-156. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201606027. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Mingxia, PANG Jianguang, HU Xiuzhi, et al. Determination of phospholipids in caviar by solution ³¹P-NMR[J]. Food Science, 2016, 37(6): 153-156. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201606027. <http://www.spkx.net.cn>

鱼子酱被称作“黑色软黄金”, 通常指由鲟鱼卵腌渍而成的食品, 但市场上买到的鱼子酱有可能出自圆鳍鱼、鲑鱼、鳕鱼等鱼卵。鱼子酱含有丰富的磷脂、氨基酸、 ω -3系列多不饱和脂肪酸和微量元素等营养成分, 属国内外享有盛名的高档营养食品。鱼子酱中氨基酸和

ω -3系列多不饱和脂肪酸的存在情况已见报道^[1-5], 但磷脂(phospholipids, PLs)存在种类及含量鲜见报道^[6]。而鱼子酱中结合大量二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的PLs, 除具有普通磷脂的活化细胞、防止动脉硬化、改善神经组织等功能外^[7], 还具有独特的生理活性, 如抗心律失常,

收稿日期: 2015-06-29

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(14227201D); 河北省邯郸市科技研究与发展计划项目(1122104039-2)

作者简介: 张明霞(1971—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为活性物质的提取和食品的分析测试。E-mail: zmx0802@163.com

预防冠心病等,故研究建立一套快速、灵敏、准确的鱼子酱中PLs检测方法对此类产品开发利用提供了技术指导。

目前PLs检测国标采用的是钼蓝比色法^[8-10],此法所用仪器价格低,原理简单,但只能检测PLs总量,无法对PLs各组分进行定性定量分析,且非磷脂磷会造成干扰。高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法是国内外分析PLs各组分含量应用最广泛的方法^[6,11-17],王琦等^[6]采用HPLC-蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD)对几种水产品卵及生殖腺中PLs组成进行分析,能同时检测到7种PLs组分存在。但由于HPLC对待测样品纯度要求较高,需经过复杂的样品前处理过程,不利于含量低的样品检测。薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)法也是分析PLs常用的方法^[18-20],其设备简单,操作方便,便于直接观察各PLs组分的存在。双向薄层色谱的应用,更加改善了PLs的分离度^[21],但TLC测量重复性较差,薄层板不能重复使用,且无法实现自动化操作。³¹P-核磁共振光谱(³¹P-nuclear magnetic resonance, ³¹P-NMR)法是近期发展起来新的PLs检测方法,不同PLs组分的磷酸根上所连基团不同,导致不同PLs组分在磁场中的化学位移不同,从而用来分析各种PLs的组成和含量^[22-24],尤其应用于复杂脂类样品,不需要预先分离直接进行分析,同时³¹P-NMR法具有不破坏样品的优点,更适用于生物样品的测定。实验采用液相³¹P-NMR内标法对不同品牌的鱼子酱脂类提取物中PLs进行定性定量分析,可同时检测7种磷脂组分。且本法具有简单、快速、准确度高,减少有机溶剂用量等优点,适应于其他PLs类相关样品的分析检测。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

鱼子酱 市购;氯仿、甲醇(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;氘代氯仿、氘代甲醇 美国CIL公司;标准品:磷脂酰胆碱(phosphatidylcholines, PC)、溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)、鞘磷脂(sphingomyelin, SM)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰甘油(phosphatidyl glycerol, PG)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)、甘油磷脂酸(phosphatidic acid, PA)、辛烷基磷酸胆碱(octylphosphocholine, Cho-8, 内标) 美国Sigma公司。

Bruker AV400核磁共振波谱仪 瑞士Bruker公司; Vortex-genie 2涡旋振荡器 美国Scientific Industries公司; MISTRAL 2000台式离心机 日本Sanyo公司; AB204型电子天平 瑞士Mettler Toledo公司。

1.2 方法

1.2.1 核磁条件的选择

液相³¹P-NMR检测磷的灵敏度较低,为保证低PLs含量的提取液核磁分析得到理想的图谱,通过改变仪器的扫描次数、弛豫时间和脉冲角度降低检出限。本实验采用AV400核磁共振波谱仪,采用标准腔5 mm的BBO探头,观察频率161.98 MHz,谱宽65 789.5 Hz, 90°脉冲角,脉冲宽度17.000 0 μs,采样时间0.498 1 s,延迟时间1.500 0 s,扫描次数2 048,测定温度为296.2 K。以氘代氯仿-氘代甲醇(2:1, V/V)溶液为溶剂溶解脂类,以正辛烷基磷酸胆碱为内标,利用标准品的化学位移对鱼子酱样品中磷谱峰定性分析,对不同磷脂谱峰进行积分,用于定量计算样品中PLs含量。

1.2.2 PLs标准溶液的配制

用分析天平准确称取PLs各标准品,以氯仿-甲醇(2:1, V/V)溶液氘代溶剂溶解配制各单标质量浓度均为5.00 mg/mL的混标贮备液,分别移取不同体积贮备液配成不同质量浓度的工作溶液。内标辛烷基磷酸胆碱同样用氯仿-甲醇(2:1, V/V)溶液氘代溶剂配成1.00 mg/mL储备液。

1.2.3 鱼子酱样品中全脂的提取

准确称取匀浆处理后样品2.0 g于具塞离心管中,全脂提取参照经典方法^[25]进行,加入3 mL氯仿-甲醇(1:2, V/V)溶液,涡旋提取2 min后,加入1 mL氯仿,涡旋提取1 min,最后加入1 mL蒸馏水涡旋振荡30 s, 3 000 r/min离心8 min,转移出下层氯仿层,重复用1 mL氯仿提取2次,合并氯仿层。微氮气流挥干溶剂,加入100 μL内标溶液和500 μL氯仿-甲醇(1:2, V/V)溶液氘代溶剂,涡旋混合5 s,转移到5 mm核磁管中用于³¹P-NMR分析,采用内标法定量。

2 结果与分析

2.1 PLs的³¹P-NMR分离检测

从图1A可以看出,7种PLs的分离效果良好,且内标Cho-8的加入不影响PLs的定性和定量分析。根据图1A中各磷谱峰化学位移可确定6种磷脂的存在,以往有关鱼卵磷脂成分检测的文献^[2,6]报道中只确定5种磷脂,未检测到PA存在。由图1B可看出,此鱼子酱样品PLs中所占比例最大的PC, PE和LPC含量较高, SM、PI和PA含量较低,几种鱼子酱样品均未检测到PG存在。化学位移在-0.84处出现一未知峰,有可能是其他未标定的磷脂谱峰,有待进一步探讨。另外,由于对鱼子酱样品全脂提取时,采用转移出氯仿层,可能会导致在氯仿中溶解度小的磷脂被漏检。

表2 加标回收率和精密度
Table 2 Results of recovery and precision tests

添加量/(mg/g)	PC			LPC			SM			PE			PI			PA		
	0.05	0.25	0.50	0.05	0.25	0.50	0.05	0.25	0.50	0.05	0.25	0.50	0.05	0.25	0.50	0.05	0.25	0.50
测定量/(mg/g)	1	0.047	0.23	0.50	0.049	0.26	0.48	0.048	0.25	0.49	0.048	0.25	0.048	0.24	0.48	0.048	0.27	0.48
	2	0.052	0.24	0.51	0.048	0.25	0.50	0.047	0.23	0.47	0.048	0.24	0.051	0.25	0.49	0.048	0.26	0.51
	3	0.051	0.26	0.52	0.048	0.26	0.49	0.049	0.24	0.50	0.046	0.24	0.052	0.26	0.52	0.047	0.24	0.48
	4	0.049	0.25	0.48	0.047	0.27	0.51	0.052	0.24	0.48	0.048	0.23	0.048	0.23	0.50	0.049	0.27	0.48
	5	0.048	0.24	0.52	0.048	0.24	0.48	0.051	0.26	0.47	0.049	0.23	0.048	0.24	0.48	0.048	0.25	0.49
平均值	0.049	0.24	0.51	0.048	0.26	0.49	0.049	0.24	0.48	0.048	0.24	0.51	0.049	0.24	0.49	0.048	0.26	0.49
加标回收率/%	98	96	101	96	102	98	98	96	101	96	96	102	98	96	98	96	102	98
相对标准偏差/%	4.2	4.7	3.3	1.5	4.4	2.7	4.2	4.8	3.0	2.3	3.5	2.6	4.0	4.8	3.4	1.5	5.0	2.7

注：磷脂中脂肪酸链均按C₁₈计算。

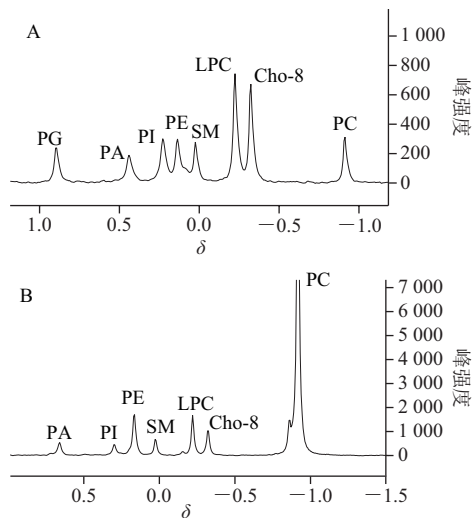


图1 PLs标准品(A)、鱼子酱脂类提取物(B) ³¹P-NMR谱图
Fig.1 ³¹P-NMR spectra of PLs standards (A) and lipids extracted from caviar (B)

2.2 PLs线性方程、相关系数及检出限

本方法在0.05~2.5 mg/mL范围内线性良好,方法检出限采用信噪比不小于3时对应的磷脂溶液质量浓度。各磷脂组分的线性方程、相关系数及检出限见表1,满足微量组分测定的要求。

表1 各磷脂组分的线性方程、相关系数和检出限

Table 1 Regression equations, correlation coefficients and detections limit for PLs

组分	线性方程	相关系数 (R^2)	检出限/(mg/mL)
PC	$Y=2.5001x+0.1355$	0.9898	0.01
LPC	$Y=1.7858x+0.0288$	0.9936	0.02
SM	$Y=2.7314x+0.0513$	0.9952	0.02
PE	$Y=2.2756x+0.1765$	0.9801	0.01
PI	$Y=2.7976x+0.0624$	0.9848	0.01
PA	$Y=2.6843x+0.0266$	0.9928	0.02
PG	$Y=2.8432x+0.0153$	0.9984	0.01

2.3 精密度和回收率结果

在已知PLs含量的鱼子酱样品中添加3个水平的标准品溶液,同1.2.3节方法进行全脂提取,氘代溶剂溶解后进行³¹P-NMR分析,利用线性方程计算各磷脂组分的含

量,平行测定5次,计算其加标回收率和精密度。由表2可以看出,各磷脂化合物在不同水平添加量条件下回收率为96%~102%,相对标准偏差不超过5%,完全满足微量分析对方法准确度的要求。此方法可用于其他相关样品中磷脂的定性和定量分析。

2.4 鱼子酱样品中PLs的检测结果

表3 鱼子酱样品中PLs的检测结果

Table 3 Contents of PLs in caviar determined by ³¹P-NMR

鱼子酱样品	总磷脂中各磷脂组分的含量/%					
	PC	LPC	SM	PE	PI	PA
A (圆鳍鱼籽)	76.9	8.1	2.5	7.6	2.1	2.8
B (圆鳍鱼籽)	74.6	8.9	3.3	8.4	2.8	2.0
C (鲟鱼籽)	68.6	3.4	4.9	8.5	11.8	2.8
D (鲟鱼籽)	69.3	2.9	4.7	8.9	11.3	2.9

从超市选择4种品牌的黑鱼子酱进行测定,结果见表3。几种鱼子酱中均含有丰富的磷脂,圆鳍鱼籽和鲟鱼籽腌渍的鱼子酱所含磷脂种类相同,均能检测到6种磷脂的存在,但各磷脂含量不尽相同。圆鳍鱼籽中PC和LPC总量均占总磷脂量的80%以上,而鲟鱼籽中PI含量远高于圆鳍鱼籽。其他3种磷脂SM、PE和PA在2种取材的鱼子酱中含量相差不多。由于不同磷脂具有不同生理功能,消费者应根据自己的需求选择鱼子酱产品。

3 结论

本实验建立了一套操作简便、回收率高、准确度高的液相³¹P-NMR测定鱼子酱食品中磷脂的方法。采用氯仿和甲醇混合溶剂提取鱼子酱食品中全脂,无需分离,挥干溶剂后溶于氘代氯仿-甲醇(2:1, V/V)溶液中,直接用于液相³¹P-NMR分析。应用本方法对市场上4种品牌的鱼子酱进行检测,均检测到6种磷脂组分(PC、LPC、SM、PE、PI和PA)的存在,但不同取材和不同品牌的鱼子酱中各磷脂含量不尽相同。由于不同磷脂具有不同生理功能,消费者应根据自己的需求选择鱼子酱产品。本方法同样适用于磷脂相关食品的检测分析。

参考文献:

- [1] 高露姣, 夏永涛, 黄艳青, 等. 两种鲟鱼卵的鲜味相关物质含量比较分析[J]. 食品科学, 2012, 33(24): 230-233. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201224048.
- [2] 陈文娟, 陈建福. 大黄鱼鱼卵脂质含量及脂肪酸组成分析[J]. 肉类工业, 2012(4): 21-23. DOI:10.3969/j.issn.1008-5467.2012.04.010.
- [3] LENA B, NILS H, SEBASTIANO B, et al. Marine omega-3 phospholipids: metabolism and biological activities[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(11): 15401-15419. DOI:10.3390/ijms131115401.
- [4] SHIRAI N, HIGUCHI T, SUZUKI H. Analysis of lipid classes and the fatty acid composition of the salted fish roe food products, Ikura, Tarako, Tobiko and Kazunoko[J]. Food Chemistry, 2006, 94(1): 61-67. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.10.050.
- [5] SHIRAI N, HIGUCHI T, SUZUKI H. Effect of lipids extracted from a salted herring roe food product on maze-behavior in mice[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2006, 52(6): 451-456. DOI:10.3177/jnsv.52.451.
- [6] 王琦, 薛长湖, 徐杰, 等. HPLC-ELSD法测定几种水产品卵及生殖腺中磷脂的组成[J]. 分析仪器, 2012, 43(5): 18-22. DOI:10.3969/j.issn.1001-232X.2012.05.005.
- [7] 曹栋, 袁爱泳, 王兴国. 磷脂结构、性质、功能及研究现状[J]. 粮食与油脂, 2004, 18(5): 3-6. DOI:10.3969/j.issn.1008-9578.2004.05.001.
- [8] 葛庆联, 吴敏, 张小燕, 等. 微波消解-可见分光光度法测定禽蛋中卵磷脂含量[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 194-196.
- [9] 袁延强, 侯海荣, 王希敏, 等. 分光光度法测定鲑鱼生殖腺提取物中总磷脂[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 63-65.
- [10] 陈文娟, 陈丽娇, 曾稍稍. 超声波辅助提取大黄鱼卵磷脂的工艺研究[J]. 广东农业科学, 2013, 51(16): 107-110. DOI:10.3969/j.issn.1004-874X.2013.16.035.
- [11] 王秀娣, 李培武, 张文, 等. 超声提取正相高效液相色谱法测定大豆及大豆油中的磷酸甘油酯[J]. 分析测试学报, 2011, 30(5): 527-531. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2011.05.010.
- [12] 孙文华, 杨丽霞, 王涛, 等. HPLC-RI法测静脉脂肪乳注射液中溶血卵磷脂[J]. 科学技术与工程, 2013, 13(26): 7740-7743. DOI:10.3969/j.issn.1671-1815.2013.26.026.
- [13] 刘艳青, 李兆杰, 李国云, 等. 雌、雄皱纹盘鲍内脏脂肪酸及磷脂组成的比较分析[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 184-186. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201310040.
- [14] THAKKAR S K, GIUFFRIDA F, CRISTINA C H. Dynamics of human milk nutrient composition of women from Singapore with a special focus on lipids[J]. American Journal Human Biology, 2013, 25(6): 770-779. DOI:10.1002/ajhb.22446.
- [15] 那海秋, 董宇, 周兆梅, 等. 高效液相色谱法测定大豆磷脂类保健食品中磷脂酰胆碱[J]. 理化检验(化学分册), 2013, 49(6): 728-730.
- [16] FONG B, MA L, NORRIS C. Analysis of phospholipids in infant formulas using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(8): 858-865. DOI:10.1021/jf304877k.
- [17] 周丽, 王兴国, 张康逸, 等. 甘油磷脂酰胆碱的分离纯化研究[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(1): 67-70. DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2012.01.010.
- [18] NZAI J M, PROCTOR A. Phospholipids determination in vegetable oil by thin-thin chromatography and densitometry[J]. Food Chemistry, 1998, 63(4): 571-576. DOI:10.1016/S0308-8146(98)00043-0.
- [19] PETERSON B L, CUMMINGS B S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples[J]. Biomedical Chromatography, 2006, 20: 227-243. DOI:10.1002/bmc.563.
- [20] ANDREW M, MIKHAIL V, EDUARD N. Quantitative analysis of dairy phospholipids by ^{31}P NMR[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2009, 86(6): 757-763. DOI:10.1007/s11746-009-1403-6.
- [21] STEFANIE K, INA E, GERHARD G, et al. Two-dimensional ^{31}P , ^1H NMR spectroscopic profiling of phospholipids in cheese and fish[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61: 7061-7069. DOI:10.1021/jf4021812.
- [22] GARCIA C, LUTZ N W, CONFORT S. Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by ^{31}P NMR: towards specific interest in human health[J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1777-1783. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.05.111.
- [23] MONAKHOVA Y B, KUBALLA T, LEITZ J, et al. NMR spectroscopy as a screening tool to validate nutrition labeling of milk, lactose-free milk, and milk substitutes based on soy and grains[J]. Dairy Science and Technology, 2012, 92(12): 109-120. DOI:10.1007/s13594-011-0050-5.
- [24] LACHENMEIER D W. Identification of imitation cheese and imitation ice cream based on vegetable fat using NMR spectroscopy and chemometrics[J]. International Journal of Food Science, 2013, 2013(5): 1-9. DOI:10.1155/2013/367841.
- [25] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal Biochemistry Physiology, 1959, 37(8): 911-917. DOI:10.1139/o59-099.