

超临界流体色谱-四极杆飞行时间质谱快速分析 牛奶与羊奶中的甘油三酯组分

涂安琪, 杜振霞

(北京化工大学分析测试中心, 北京 100029)

摘要:建立了超临界流体色谱-四极杆飞行时间质谱(SFC-Q-TOF-MS)联用技术快速分离及识别牛奶与羊奶中复杂甘油酯成分。采用 BEH 2-EP 色谱柱,以甲醇-乙腈-甲酸(50 : 50 : 0.1, V/V/V)为流动相,共分离并识别了 55 种甘油三酯和 16 种甘油二酯。实验结果表明,牛奶脂与羊奶脂有相似的甘油三酯组成系列,但是甘油三酯相对含量差异较大,羊奶中不饱和脂肪酸构成的甘油三酯含量更高。利用主成分分析(PCA)法对两类样品进行统计学分析,明显区分了牛奶和羊奶样品,并找出了二者的主要差异性物质。该方法快速有效、绿色环保,有利于全面了解牛奶脂与羊奶脂中甘油酯的组成,也可快速判断奶源类型提供技术支持。

关键词:超临界流体色谱;四极杆-飞行时间质谱;甘油三酯;主成分分析;牛奶;羊奶

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2017)02-0217-10

doi:10.7538/zpxb.youxian.2016.0045

Rapid Determination of Triacylglycerols in Cow Milk and Goat Milk Using Supercritical Fluid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry

TU An-qi, DU Zhen-xia

(Analysis and Testing Center of Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Triacylglycerol (TAG) is the main component in milk fat, which determines the quality of milk fat. TAG composition in milk is varied among different species, diet and lactation stages. In this work, method of supercritical fluid chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (SFC-Q-TOF-MS) was developed for determination of complex acylglycerols in cow milk and goat milk. Milk fat was extracted with *n*-hexane. The instrumental conditions was as follows: the stationary phase was BEH 2-EP column, the mixture of methanol/acetonitrile/formic acid (50 : 50 : 0.1, V/V/V) was chosen as the mobile phase additive, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 50 °C, automatic back pressure regulator was

收稿日期:2016-03-28;修回日期:2016-05-17

作者简介:涂安琪(1991—),女(汉族),湖南衡阳人,硕士研究生,分析化学专业。E-mail: anqitu@163.com

通信作者:杜振霞(1968—),女(汉族),河北石家庄人,教授,从事液相色谱-质谱联用技术研究。E-mail: duzx@mail.buct.edu.cn

网络出版时间:2016-09-01;网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20160901.1538.016.html>

1.1×10^4 kPa, the injection volume was 1 μ L. The separation method was utilized to analyze commercial cow milk samples and goat milk samples. Further identification of TAG compounds was based on the exact mass information of quasi-molecular ions, and the fragment ions were provided by Q-TOF-MS. A total of 55 triacylglycerols (TAGs) and 16 diacylglycerols (DAGs) were separated and identified within 25 min, including some pairs of TAG isomers, such as P-M-Co and P-P-Bu, showing the fast and excellent separation of SFC. The SFC-MS data showed that there were four important TAG series existed in cow and goat milk fat, including P(O)-X-Bu, P-P-X, O-X-O and O-P-X, indicating the high amount of saturated fatty acid in cow and goat milk fat. Although there were similar main TAG series in cow milk and goat milk samples, the concentration of unsaturated fatty acid in goat milk was relatively higher than cow milk, showing that goat milk may be more suitable for manufacture infant formula. Furthermore, principal component analysis (PCA) was applied to process the multidimensional data in order to better differentiating cow milk and goat milk, and cow milk samples and goat milk samples were classified clearly in the score plot of PCA. Major differences were obtained, including some long chain TAGs and medium chain TAGs. The SFC-MS method is high-throughput and environment friendly, providing an alternative approach besides LC/MS and GC/MS for TAGs analysis in food or biological samples, and might has a prospective future in the lipidomics. Since pressure drop in SFC system is much smaller than liquid chromatography, which is beneficial for combining several columns in series, more attention might be concentrated on the development of 2-dimensional SFC system in the future in order to obtain a better separation.

Key words: supercritical fluid chromatography; quadruple time-of-flight mass spectrometry; triacylglycerol; principal component analysis; cow milk; goat milk

哺乳动物乳汁是非常复杂的食物基质,含有多种营养物质,如碳水化合物、蛋白质、脂质等^[1]。物种、基因、环境条件及哺乳周期都会影响这些营养物质的化学组成^[2]。甘油三酯(Triacylglycerols, TAG)是酶催化下一分子甘油与三个脂肪酸分子酯化的产物,是乳汁中含量最高的脂类组分,占总脂肪的98%以上,其组成影响奶制品的物理性质和营养价值^[3]。但由于脂肪酸的碳数、双键数和构型的区别,使得自然界存在的脂肪酸种类繁多,而且当游离脂肪酸酯化到甘油分子骨架的不同位置,即 sn -1位、 sn -2位和 sn -3位,会形成位置异构体。因此,天然油脂中的甘油酯组成非常复杂,且结构类似,所以对TAG的分析具有很大的挑战性。

目前,国内外分析TAG的方法有气相色谱法和高效液相色谱法等。Silva等^[4]采用气相色谱法测定了巴西人乳脂组成,并通过饮

食习惯解释了多地人乳脂差异的原因。Lisa等^[5]通过串联两根ODS色谱柱至总柱长45 cm,以乙腈-异丙醇为流动相,在无水反相色谱-大气压化学电离质谱联用的条件下,测定了植物油中13种甘油三酯组成,具有很高的分辨率,共识别出264种TAG。虽然气相色谱法与高效液相色谱法在分析各种基质中的TAG组成方面取得了很多进展,但仍存在一些局限,如采用气相色谱法分析TAG时需要对分析物进行衍生化,操作复杂费时,且只能得到TAG的脂肪酸组成,而不能得到脂肪酸酯化位置的信息;而高效液相色谱法分析复杂的TAG成分通常需要较长的运行时间(一般长达60~200 min)。

超临界流体色谱以超临界流体(通常为超临界CO₂)作为流动相,现代的超临界流体色谱允许加入少量有机溶剂作为改性剂,以增强流动相的极性与洗脱能力。与常规液相色

谱相比,超临界流体色谱具有独特的优势和性能:一方面,超临界流体的黏度接近于气体,拥有很高的扩散系数,允许大流速而不会引起过大的压降,可保证分析效率;另一方面,超临界流体在密度与溶解力上与液体性质类似,对分析物具有较好的溶解性和转移能力,可保证超临界流体色谱卓越的分离能力^[6];此外,超临界 CO₂ 是一种绿色安全的试剂,可大幅减少有机溶剂所带来的环境污染及健康危害,近年来得到了广泛关注。Lee 等^[7]以反相 ODS 色谱柱为固定相,分离了不同大豆样品中的甘油三酯,并通过变换单重四极杆质谱锥孔电压进行定性分析,在 8 min 内识别了 18 种甘油三酯,并在后续研究中表明超临界色谱也可以分离甘油三酯的位置异构体^[8]。

本实验拟采用超临界流体色谱-四极杆飞行时间质谱分离检测牛奶和羊奶中的甘油三酯,并根据实验结果对这两种哺乳动物乳汁的 TAG 组成特点进行归纳总结,利用主成分分析法进行统计学分析,希望得到两类样品主要的差异性物质,以进一步了解牛奶和羊奶脂肪组成的区别。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

超高效液相色谱、Xevo® G2-S 四极杆飞行时间质谱仪:美国 Waters 公司产品;GP225D 电子天平:德国 Sartorius 公司产品。

高纯二氧化碳:纯度≥99.999%,北京如源如泉科技有限公司产品;甲醇、乙腈:质谱纯,美国 Fisher 公司产品;正己烷:色谱纯,美国 Fisher 公司产品;甲酸:色谱纯,美国 Tedia 公司产品;牛奶样品与羊奶样品:均购自北京当地超市。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 Acquity UPC² BEH-2EP 色谱柱(100 mm×3.0 mm×1.7 μm),柱温 50 ℃,背压 1.1×10⁴ kPa;流动相:A 为超临界 CO₂,B 为甲醇-乙腈-甲酸溶液(50:50:0.1, V/V/V);梯度洗脱程序:0~2 min 保持 0.1%B,之后 4 min 内由 0.1%B 线性升至 1%B,再在 3 min 内线性升至 2%B,保持 6 min,接下来的

5 min 内由 2%B 线性升至 7%B,再在 4 min 内线性升至 20%B,在 0.5 min 内返回初始流动相比 0.1%B,并保持 1 min;流速 1.0 mL/min;样品进样量 1 μL;整个分析过程持续 25 min。

1.2.2 质谱条件 电喷雾电离源正离子模式(ESI⁺),在 MS^E 模式下采集 m/z 50~2 000 范围内的物质;去溶剂气为氮气,流速 800 L/h;去溶剂温度 450 ℃;源温 120 ℃;毛细管电压 3.0 kV;锥孔气流速 20 L/h;锥孔电压 25 V;碰撞气为氩气;低碰撞能量 4 eV,高碰撞能量 20~60 eV;数据采集软件为 Waters UNIFI。

本实验采用的 MS^E 采集模式可以实现一针进样后同时提供两个质谱扫描模块。第一个质谱扫描功能采用较低的碰撞能量,从而提供前驱离子的精确质量信息;在第二个质谱扫描模块中采取从低到高变化的碰撞能量,能够提供丰富的碎片离子信息。

1.3 样品前处理

准确量取 1 mL 牛奶或羊奶样品至 10 mL 塑料离心管中,加入 2 mL 正己烷萃取剂,于室温下涡旋离心 2 min,然后以 8 000 r/min 离心 10 min,静置分层,取上清液,过 0.22 μm 尼龙滤膜,滤液置于样品瓶中,待测。

1.4 统计学分析

实验检测了 12 个样品,包括 8 个牛奶样品与 4 个羊奶样品。将所得的液相色谱-质谱数据进行主成分分析(PCA)。首先,用 Markerlynx v4.1 预处理软件自动检测 SFC-Q-TOF-MS 原始数据每个峰的保留时间与质荷比数据;然后,通过峰对齐将各样品的数据汇总在单个矩阵中,并标记各变量的相对强度。处理过程的参数如下:质量窗口 20 mDa,保留时间窗口 0.30 min,强度阈值 50 000 counts,5%峰高的峰宽 1.00 s,除燥程度 6.00。将处理好的数据导出为 Excel 格式,接着导入 SIMCA-P 10.0 做主成分分析。

2 结果与讨论

2.1 甘油三酯的识别

由于天然油脂中的甘油三酯成分过于复杂,采用标准品定性既不实际也不经济。因此,本实验对甘油三酯的定性分析主要依靠 Q-TOF-MS 提供的精确质量数与丰富的碎片

信息。在 MS^E 采集模式中,根据低能模式下给出的前体离子 $[M+NH_4]^+$ 的精确质量数推断其分子式,再通过高能模式下给出的碎片离子 $[M+H-FA]^+$ 识别甘油骨架上所结合的 3 个脂肪酸。TAG 根据脂肪酸的简写而命名,按照脂肪酸分子在 *sn*-1、*sn*-2、*sn*-3 的顺序进行排列。但由于非手性方法无法区分 *sn*-1 和 *sn*-3 的对映异构体,所以将它们视为相同,并以分子质量减小的顺序排列。例如,酯化了 1 个棕榈酸(P)和 2 个油酸(O),且 1 个油酸位于 *sn*-2 位的甘油三酯,该化合物被称为 O-O-P,而不是 P-O-O。

据文献报道^[9-10],*sn*-1、*sn*-3 位的酰基链比 *sn*-2 位的更易断裂,从而产生不同强度的碎片离子,这有助于确定位于 *sn*-2 位的酰基类型。保留时间为 13.17 min 色谱峰的低能和高能质谱图示于图 1。由低能图(图 1a)可知,准分子离子 $[M+NH_4]^+$ 的质荷比为 878.817 9,对应的 TAG 分子式为 $C_{55}H_{104}O_6$,误差为 0.23×10^{-6} ;由高能图(图 1b)可知,3 个碎片离子分别为 m/z 605.551 0、579.534 9、577.518 4,对应于 $[S-O]^+$ 、 $[S-P]^+$ 和 $[O-P]^+$,其相对丰度分

别为 90.03%、100% 和 64.12%。由较低强度的 $[S-O]^+$ 可知,棕榈酸(P)占据了 *sn*-2 位,所以可认为该甘油三酯是 S-P-O。该方法还可用于识别其他乳品色谱峰的 TAG 组成,其结果列于表 1。可见,各物质的质荷比误差基本在 5×10^{-6} 以下,定性的准确度较高。同时,该方法还可以在较短的时间内,部分分离一些同分异构体对,本实验共有 13 对同分异构 TAG 被分离,其中大部分得到了准确的识别。如根据碎片离子可以区分 P-M-Co(9.62 min)和 P-P-Bu(9.74 min),其质谱图示于图 2。需要说明的是,与二维液相色谱-质谱法相比,在本实验中部分甘油三酯不能达到基线分离,然而该方法能够在较短的时间内达到较为满意的分离度,对于快速、高通量的分析而言具有较大优势。

由于使用极性柱的超临界流体色谱分离机理类似于正相色谱,所以甘油二酯(Diacylglycerol, DAG)在甘油三酯之后流出,其识别与甘油三酯类似。首先,由准分子离子 $[M+Na]^+$ 的精确质量数计算出 DAG 分子式,由碎片离子 $[M+H-FA]^+$ 识别甘油骨架上 2 个相关的脂肪酸。例如,某色谱峰的准分子离子 $[M+Na]^+$ m/z 619.523 8 对应的分子式为 $C_{37}H_{72}O_5$ 。两个碎片离子分别为 m/z 339.288 7 和 313.272 4,计算得出该 DAG 分子是 1,3-SP 或 1,2-SP。本实验识别的所有 DAG 列于表 2。由于该方法并不能得到 DAG 酰基的位置,所以在后续研究中有必要对其进行进一步确认。

2.2 不同哺乳动物乳汁中的甘油三酯组成

牛奶、羊奶中甘油三酯成分的基峰色谱图分别示于图 3、图 4,对比可见,羊奶的成分较牛奶更为复杂。图中一些色谱峰虽然仅有 1 个准分子离子峰,但由于存在同分异构体导致碎片离子过多而无法判别其结构,因此,从两图中共鉴定出 55 种 TAG。在已识别的 TAG 中,属于牛奶脂肪组分的有 48 种,酰基链总碳数在 26~54 范围之间,双键数从 0~4 个不等;属于羊奶脂肪组分的有 53 种,酰基链总碳数在 22~54 范围之间,双键数从 0~5 个不等。牛奶脂中 TAG 酰基链总碳数主要集中在 34~42;而羊奶脂中 TAG 酰基链总碳数较均匀地分布于 28~52,其短链甘油三酯和长链甘油三

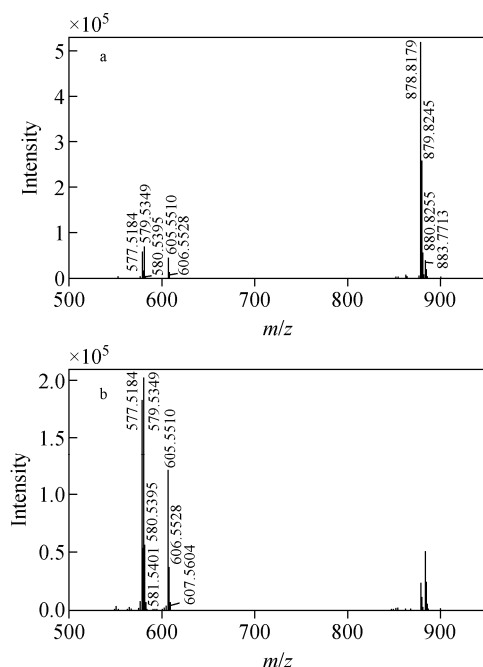


图 1 S-P-O 甘油三酯的低能质谱图(a)和高能质谱图(b)

Fig. 1 Mass spectrogram of S-P-O under low collision energy (a) and high collision energy (b)

表1 牛奶与羊奶中的甘油三酯组成
Table 1 TAG composition of cow milk and goat milk

序号	t_R/min	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	$[\text{M}+\text{H}-\text{FA}]^+$			分子式	误差/ 10^{-6}	ACN	DB	TAG	牛奶	羊奶
			1	2	3							
1	6.26	460.3577				$\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_6$	-0.82	22	0	MIX	✓	✓
2	6.39	460.3621				$\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_6$	-0.15	22	0	MIX	✓	✓
3	6.89	488.395	355.2810	327.2541	299.2173	$\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{O}_6$	0.49	24	0	C-Cy-Co	✓	✓
4	7	488.395	383.3133	299.2137		$\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{O}_6$	0.49	24	0	C-C-Bu	✓	✓
5	7.17	516.4288	383.3133	327.2541		$\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{O}_6$	4.65	26	0	C-C-Co	✓	✓
6	7.35	516.4288	411.3477	383.3093	243.152	$\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{O}_6$	4.65	26	0	P-Co-Bu	✓	✓
7	7.76	544.4574	411.3477	383.3093	369.1189	$\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{O}_6$	-0.55	28	0	MIX	✓	✓
			355.2848	327.2504								
8	7.93	544.4574	439.3763	383.3053	355.2771	$\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{O}_6$	-0.55	28	0	P-Cy-Bu	✓	✓
			299.2137	271.1817						M-C-Bu	✓	✓
9	8.09	542.4410	437.3641	409.3263	243.1488	$\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{O}_6$	0.58	28	1	O-Co-Bu	✓	✓
10	8.25	572.4876	439.3806	411.3435	383.3133	$\text{C}_{33}\text{H}_{62}\text{O}_6$	-2.45	30	0	MIX	✓	✓
			355.2848	327.2504								
11	8.39	572.4876	467.4087	383.3133	299.2137	$\text{C}_{33}\text{H}_{62}\text{O}_6$	-2.45	30	0	P-C-Bu	✓	✓
12	8.52	570.4736	465.395	409.3304	271.1817	$\text{C}_{33}\text{H}_{60}\text{O}_6$	0.35	30	1	O-Cy-Bu	✓	✓
13	8.73	600.5195	467.4087	411.3477	327.2504	$\text{C}_{35}\text{H}_{66}\text{O}_6$	-1.33	32	0	P-Co-C	✓	✓
14	8.84	600.5195	495.4427	383.3093	327.2467	$\text{C}_{35}\text{H}_{66}\text{O}_6$	-1.33	32	0	P-La-Bu	✓	✓
15	8.97	598.5068	493.4239	409.3304	299.2137	$\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_6$	3.51	32	1	O-C-Bu	✓	✓
16	9.16	628.5497	495.4382	439.3763	411.3435	$\text{C}_{37}\text{H}_{70}\text{O}_6$	-3.02	34	0	MIX	✓	✓
			383.3133	355.2848								
17	9.3	628.5497	523.4741	383.3133	355.2848	$\text{C}_{37}\text{H}_{70}\text{O}_6$	-3.02	34	0	P-M-Bu	✓	✓
18	9.42	626.5366	521.455	409.3304	327.2504	$\text{C}_{37}\text{H}_{68}\text{O}_6$	0.96	34	1	O-La-Bu	✓	✓
19	9.5	642.5661	537.4898	383.3133	369.2957	$\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{O}_6$	-0.62	35	0	P-Pe-Bu	✓	✓
20	9.62	656.5852	523.4694	411.3477	383.3133	$\text{C}_{39}\text{H}_{74}\text{O}_6$	3.50	36	0	P-M-Co	✓	✓
21	9.74	656.5852	551.5034	383.3133		$\text{C}_{39}\text{H}_{74}\text{O}_6$	3.50	36	0	P-P-Bu	✓	✓
22	9.89	654.5694	549.4884	409.3304	355.2848	$\text{C}_{39}\text{H}_{72}\text{O}_6$	3.21	36	1	O-M-Bu	✓	✓
23	10.06	684.6168	551.5034	411.3477		$\text{C}_{41}\text{H}_{78}\text{O}_6$	3.80	38	0	P-P-Co	✓	✓
24	10.2	684.6114	579.5349	411.3477	383.3133	$\text{C}_{41}\text{H}_{78}\text{O}_6$	-4.09	38	0	S-P-Bu	✓	✓
		682.6012	549.4884	437.3641	383.3133	$\text{C}_{41}\text{H}_{76}\text{O}_6$	3.81	38	1	O-M-Co	✓	✓
25	10.34	682.6012	577.5184	409.3304	383.3133	$\text{C}_{41}\text{H}_{76}\text{O}_6$	3.81	38	1	O-P-Bu	✓	✓
26	10.52	712.6447	579.5349	551.5034	439.3806	$\text{C}_{43}\text{H}_{82}\text{O}_6$	-1.12	40	0	S-P-Co	✓	✓
			411.3477							P-P-Cy	✓	✓

续表 1

序号	t_R/min	$[M+NH_4]^+$	$[M+H-FA]^+$			分子式	误差/ 10^{-6}	ACN	DB	TAG	牛奶	羊奶
			1	2	3							
27	10.69	710.6319	577.5184	437.3641	411.3477	$C_{43}H_{80}O_6$	2.81	40	1	O-P-Co	✓	✓
28	10.84	710.6319	605.5510	411.3477	409.3304	$C_{43}H_{80}O_6$	2.81	40	1	S-Bu-O	✓	✓
29	11.00	708.6110	603.5349	409.3304		$C_{43}H_{78}O_6$	-4.52	40	2	O-Bu-O	✓	✓
30	11.09	740.6783	551.5034	467.4087		$C_{45}H_{84}O_6$	2.03	42	0	P-P-C	✓	✓
31	11.19	738.6596	605.551	439.3763		$C_{45}H_{82}O_6$	0.89	42	1	O-S-Co		✓
32	11.22	738.6651	577.5184	465.3950	439.3806	$C_{45}H_{82}O_6$	5.28	42	1	O-P-Cy	✓	
33	11.41	736.6436	603.5349	437.3641		$C_{45}H_{80}O_6$	-2.58	42	2	O-Co-O	✓	✓
34	11.52	768.7083	579.5349	551.5034	523.4694	$C_{47}H_{90}O_6$	0.26	44	0	MIX		✓
			495.4427	467.4087								
35	11.71	768.7083	551.5034	523.4741	495.4427	$C_{47}H_{90}O_6$	0.26	44	0	P-P-La	✓	
36	11.87	766.6913	577.5184	493.4239	467.4087	$C_{47}H_{88}O_6$	-1.57	44	1	O-P-C	✓	✓
37	12.17	764.6770	603.5349	575.5054	491.4093	$C_{47}H_{86}O_6$	3.47	44	2	O-Cy-O	✓	✓
			467.4087	465.395						L-C-P		✓
38	12.41	796.7394	551.5034	523.4741		$C_{49}H_{94}O_6$	0.00	46	0	P-P-M	✓	✓
39	12.61	794.7263	577.5184	549.4884	521.4596	$C_{49}H_{92}O_6$	3.15	46	1	O-P-La	✓	✓
			495.4427							O-M-M	✓	✓
40	12.88	792.7100	603.5399	493.4285		$C_{49}H_{90}O_6$	2.40	46	2	O-C-O	✓	✓
41	13.17	824.7731	579.5349	551.5034	523.4741	$C_{51}H_{98}O_6$	2.91	48	0	S-M-P	✓	✓
42	13.38	822.7542	577.5184	549.4884	523.4694	$C_{51}H_{96}O_6$	-1.09	48	1	O-M-P	✓	✓
43	13.73	820.7378	603.5349	521.4550		$C_{51}H_{94}O_6$	-1.95	48	2	O-La-O	✓	✓
44	14.06	852.8019	579.5349	551.5034		$C_{53}H_{102}O_6$	-0.12	50	0	S-P-P	✓	✓
45	14.32	850.7847	577.5184	551.5034		$C_{53}H_{100}O_6$	-2.00	50	1	O-P-P	✓	✓
46	14.62	848.77	603.5349	549.4884		$C_{53}H_{98}O_6$	-0.82	50	2	O-M-O	✓	✓
47	15.01	880.8316	607.5654	579.5349		$C_{55}H_{106}O_6$	-1.93	52	0	S-P-S	✓	✓
		846.7576	601.5171	549.4884	547.4722	$C_{53}H_{96}O_6$	3.66	50	3	O-M-L		✓
48	15.32	878.8179	605.551	579.5349	577.5184	$C_{55}H_{104}O_6$	0.23	52	1	S-P-O	✓	✓
49	15.64	876.8065	603.5349	577.5184		$C_{55}H_{102}O_6$	5.13	52	2	O-P-O	✓	✓
50	16.14	874.7914	601.5171	577.5184	575.5054	$C_{55}H_{100}O_6$	5.72	52	3	O-P-L	✓	✓
51	16.43	906.8498	607.5654	605.551		$C_{57}H_{108}O_6$	0.88	54	1	S-S-O	✓	✓
52	16.72	904.8373	605.556	603.5399		$C_{57}H_{106}O_6$	4.42	54	2	O-S-O	✓	✓
53	17.21	902.8209	603.5399			$C_{57}H_{104}O_6$	3.54	54	3	O-O-O	✓	✓
54	17.82	900.8068	603.5349	601.5221		$C_{57}H_{102}O_6$	5.33	54	4	O-O-L	✓	✓
55	18.19	898.7887	603.5349	601.5171	599.5027	$C_{57}H_{100}O_6$	2.56	54	5	L-O-Ln		✓

注:ACN 表示酰基链总碳数;DB 表示双键数;MIX 表示多种 TAG

酯含量较牛奶脂更为显著,也是由于羊奶中长链甘油三酯(如 O-P-L, O-S-O, O-O-O)明显多于牛奶,意味着羊奶中的不饱和脂肪酸(如油酸、亚油酸)含量更高。膳食中的不饱和脂肪酸有调节血糖、血脂等作用^[11],适当摄取有利于人体健康。人乳脂中也含有较高含量的不饱和脂肪酸(>50%)^[12],这说明羊奶较牛奶更适于作为婴幼儿配方奶粉的原料。

牛奶与羊奶中的主要 TAG 成分相似,饱和脂肪酸构成的 TAG 占较大比例,其次为单

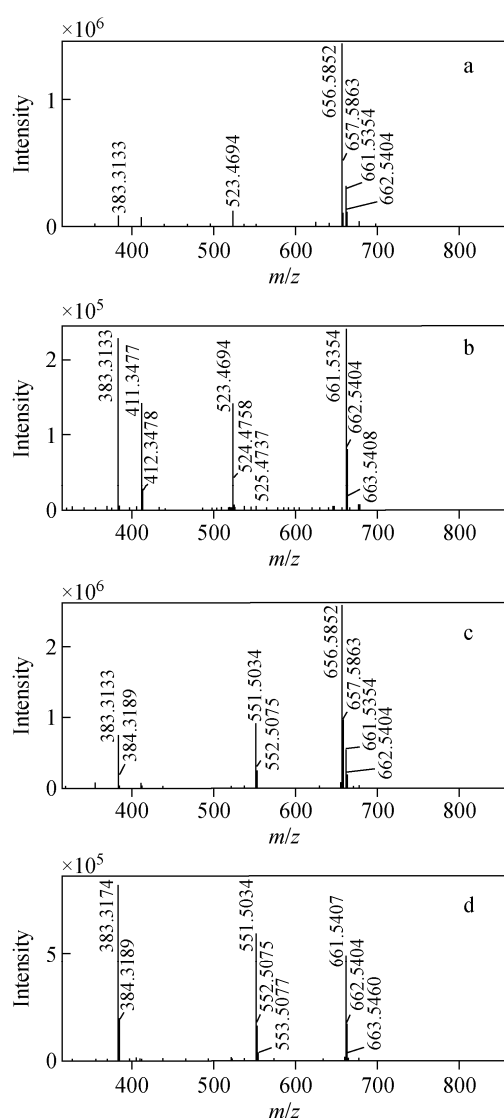
不饱和脂肪酸,仅有少量的多不饱和脂肪酸,这一点与文献^[13]描述相符。同时,本实验在牛奶脂和羊奶脂中还发现了 4 个重要系列的 TAG 组分,可以很好地描述牛奶和羊奶的 TAG 组成。第一系列可表示为 P(O)-X-Bu, 即 P 与 Bu 或 O 与 Bu 占据了甘油分子的 *sn*-1、*sn*-3 位,*sn*-2 位从 Co 至 P 变化。第二系列的跨度较第一系列更广,可表示为 P-P-X, X 为 Bu 到 S 中任一饱和脂肪酸,也包括单不饱和脂肪酸 O。第三系列与第二系列类似,可表述为 O-X-O, 其中 X 为 Bu 到 S 中除 Ln 外的任一脂肪酸。第四系列可表述为 O-P-X, X 为 Bu 到 S 中除 Ln 外的任一脂肪酸。这些特征 TAG 系列表明,与食用油^[14-15]和人乳脂^[16]相比,牛奶与羊奶中均含有较高含量的短链脂肪酸 Bu 与 Co,尤其是 Bu 倾向于占据甘油分子的外部位置(*sn*-1、*sn*-3 位),不饱和脂肪酸 O 也倾向于占据外部位置,内部位置(*sn*-2 位)一般由碳链长短不一的饱和脂肪酸所占据。

通过质谱数据共识别出 16 种 DAG,牛奶成分仅有其中的 12 种,而羊奶成分占有全部,且羊奶中的 DAG 含量高于牛奶。

2.3 主成分分析

由于多维数据的复杂性,仅仅依靠简单的比较不能完全揭示样品组之间的差异。本实验应用主成分分析(Principal component analysis, PCA)法处理复杂的 SFC-MS 数据,以达到“降维”的目的。以各主要色谱峰的保留时间与强度为变量进行 PCA 分析,得到了第一、二主成分得分图与载荷图,示于图 5。由 PCA 模型得分图可见,羊奶样品与牛奶样品较好地分布在两个区域,表明它们之间存在较明显的差异。

载荷图表示的是对得分图中区分有贡献的变量,距离原点越远说明该物质在决定样品区分中的作用越大。据此可知,区分羊奶样品的几个重要指标是 O-P-O、O-P-C、O-P-L、O-S-O 和 P-Co-C,表明这些较长链的 TAG 是羊奶与牛奶的显著差异成分;区分牛奶样品的几个重要指标分别是 P-P-Co、O-P-Co、O-M-Co、O-Bu-O 及 O-P-P,主要是 O、P 与短中链脂肪酸所构成的 TAG。



注: a. P-M-Co 的低能质谱图; b. P-M-Co 的高能质谱图;

c. P-P-Bu 的低能质谱图; d. P-P-Bu 的高能质谱图

图 2 同分异构体 P-M-Co 和 P-P-Bu 的质谱图

Fig. 2 Mass spectrogram of isomers of P-M-Co and P-P-Bu

表2 牛奶与羊奶中的甘油二酯组成

Table 2 DAG composition of cow milk and goat milk

序号	t_R / min	$[M+Na]^+$	$[M+H-FA]^+$		分子式	误差/ 10^{-6}	ACN	DB	DAG	牛 奶	羊 奶
			1	2							
56	19.81	591.4989	313.2724		$C_{35}H_{68}O_5$	5.07	32	0	1,3-PP/1,2-PP	✓	✓
57	20.05	589.4815	339.2850	285.2531	$C_{35}H_{66}O_5$	-2.88	32	1	1,3-OM/1,2-OM	✓	✓
58	20.49	619.5288	341.3030	313.2724	$C_{37}H_{72}O_5$	2.58	34	0	1,3-SP/1,2-SP	✓	✓
59	20.66	617.5099	339.2887	313.2724	$C_{37}H_{70}O_5$	-2.59	34	1	1,3-OP/1,2-OP	✓	✓
60	20.9	615.4993	337.2729	313.2724	$C_{37}H_{68}O_5$	5.52	34	2	1,3-LP/1,2-LP	✓	✓
61	20.97	647.5571	341.3068		$C_{39}H_{76}O_5$	1.24	36	0	1,3-SS/1,2-SS	✓	✓
62	21.07	645.5397	341.3030	339.2887	$C_{39}H_{74}O_5$	-4.80	36	1	1,3-SO/1,2-SO	✓	✓
		591.4989	313.2724		$C_{35}H_{68}O_5$	5.07	32	0	1,2-PP/1,3-PP	✓	✓
63	21.23	643.5254	339.2887		$C_{35}H_{72}O_5$	0.00	36	2	1,3-OO/1,2-OO	✓	✓
64	21.44	619.5288	341.3068	313.2724	$C_{37}H_{72}O_5$	2.58	34	0	1,2-SP/1,3-SP	✓	✓
65	21.54	617.5150	339.2887	313.2724	$C_{37}H_{70}O_5$	5.67	34	1	1,2-OP/1,3-OP	✓	✓
66	21.68	615.4943	337.2729	313.2760	$C_{37}H_{68}O_5$	-2.60	34	2	1,2-LP/1,3-OP	✓	✓
67	21.74	647.5571	341.3068		$C_{39}H_{76}O_5$	1.24	36	0	1,2-SS/1,3-SS	✓	✓
68	21.83	645.5397	341.3030	339.2887	$C_{39}H_{74}O_5$	-4.80	36	1	1,2-SO/1,3-SO	✓	✓
69	21.93	643.5254	339.2887		$C_{39}H_{72}O_5$	0.00	36	2	1,2-OO/1,3-OO	✓	✓
70	22.09	641.5143	339.2850	337.2729	$C_{39}H_{70}O_5$	4.36	36	3	1,2-OL/1,3-OL	✓	✓

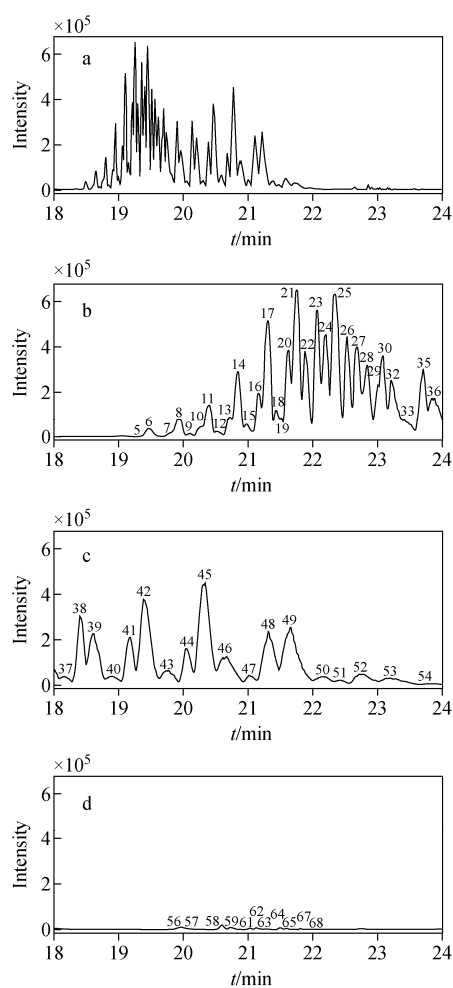


图3 牛奶中甘油三酯成分的基峰色谱图(a)及放大图(b~d)

Fig. 3 Base peak chromatogram (a) and enlargements chromatogram (b-d) of triacylglycerols in cow milk

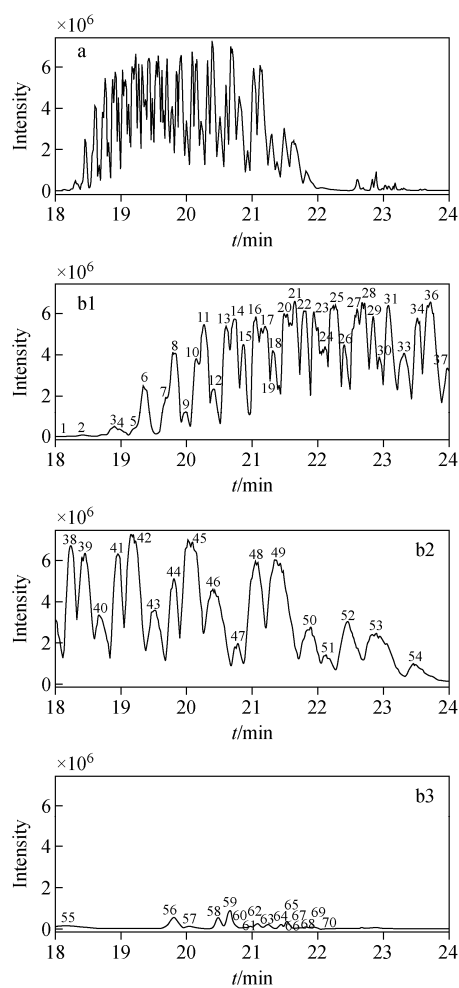


图4 羊奶中甘油三酯成分的基峰色谱图(a)及放大图(b1~b3)

Fig. 4 Base peak chromatogram (a) and enlargements chromatogram (b1-b3) of triacylglycerols in goat milk

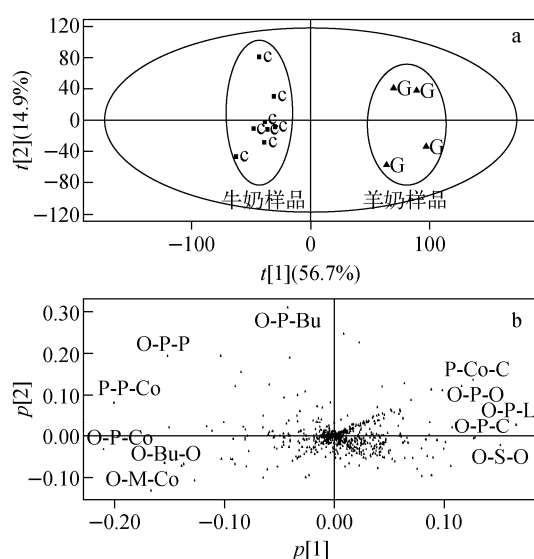


图5 主成分分析得分图(a)与载荷图(b)
Fig. 5 Score plot (a) and loading plot (b)
of principal component analysis

3 结论

采用超临界流体色谱-四极杆飞行时间质谱法检测了牛奶与羊奶中甘油酯组成,在25 min内分离并识别了55种甘油三酯与16种甘油二酯。结合主成分分析法对复杂的多维数据集进行了分析,明显地区分了牛奶与羊奶样品,并找出了二者的主要差异物质。该方法简便快速,可全面分析牛奶脂与羊奶脂中的甘油酯组成,同时也可作为常规分析手段来研究其他基质,如人乳脂、食用油中的甘油酯成分等。

参考文献:

- [1] TEN-DOMÉNECH I, BELTRÁN-ITURAT E, HERRERO-MARTÍNEZ J M, et al. Triacylglycerol analysis in human milk and other mammalian species: small-scale sample preparation, characterization, and statistical classification using HPLC-ELSD profiles[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(24): 5 761-5 770.
- [2] KANWAL R, AHMED T, MIRZA B. Comparative analysis of quality of milk collected from buffalo, cow, goat and sheep of Rawalpindi/Islamabad region in Pakistan[J]. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2004, 3(3): 300-305.
- [3] BECCARIA M, SULLINI G, CACCIOLA F, et al. High performance characterization of triacylglycerols in milk and milk-related samples by liquid chromatography and mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1 360(19): 172-187.
- [4] SILVA M H L, SILVA M T C, BRANDÃO S C C, et al. Fatty acid composition of mature breast milk in Brazilian women[J]. 2005, 93(2): 297-303.
- [5] LÍSA M, HOLČAPEK M. Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2008, 11(1 198/1 199): 115-130.
- [6] KALÍKOVÁ K, ŠLECHTOVÁ T, VOZKA J, et al. Supercritical fluid chromatography as a tool for enantioselective separation: A review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 821(22): 1-33.
- [7] LEE J W, UCHIKATA T, MATSUBARA A, et al. Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry to lipid profiling of soybean[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(2): 262-268.
- [8] LEE J W, NAGAI T, GOTOH N, et al. Profiling of regioisomeric triacylglycerols in edible oils by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 966(1): 193-199.
- [9] BERNAL J L, MARTÍN M T, TORIBIO L. Supercritical fluid chromatography in food analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1 313(25): 24-36.
- [10] LÍSA M, VELÍNSKÁ H, HOLČAPEK M. Regioisomeric characterization of triacylglycerols using silver-ion HPLC/MS and randomization synthesis of standards[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(10): 3 903-3 910.
- [11] 王炜,张伟敏. 单不饱和脂肪酸的功能特性[J]. *中国食物与营养*, 2005, (4): 44-46.
WANG Wei, ZHANG Weimin. The functional feature of monounsaturated fatty acid[J]. *Food and Nutrition in China*, 2005, (4): 44-46 (in Chinese).
- [12] SALA-VILA A, CASTELLOTE A I, RODRIGUEZ-PALMEROM, et al. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain):

- Changes during lactation[J]. Nutrition, 2005, 21 (4): 467-473.
- [13] RUSSOM, CICHELOF, RAGONESEC, et al. Profiling and quantifying polar lipids in milk by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering and mass spectrometry detection[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(13): 4 617-4 626.
- [14] WEI F, JI S X, HU N, et al. Online profiling of triacylglycerols in plant oils by two-dimensional liquid chromatography using a single column coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1 312(18): 69-79.
- [15] LÍSA M, HOLČAPEK M, BOHÁČ M. Statistical evaluation of triacylglycerol composition in plant oils based on high-performance liquid chromatography- atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry data[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57 (15): 6 888-6 898.
- [16] LINDERBORG K M, KALPIO M, MÄKELÄ J, et al. Tandem mass spectrometric analysis of human milk triacylglycerols from normal weight and overweight mothers on different diets[J]. Food Chemistry, 2014, 146(3): 583-590.
- *****

2017 第十一届中国科学仪器发展年会(ACCSI2017)第二轮通知

自 2006 年,“中国科学仪器发展年会”(ACCSI)已成功举办十届。每年一届的 ACCSI 旨在促进中国科学仪器行业“政、产、学、研、用、资”等各方的有效交流,力求对中国科学仪器的最新进展进行较为全面的总结,力争把最新的有关政策、最前沿的行业市场信息、最新的技术发展趋势在最短的时间内呈现给各位参会代表,被誉为科学仪器行业的“达沃斯论坛”。

“中国科学仪器发展年会”作为科学仪器行业最高级别的行业峰会,凭借产业大会优势,通过高端演讲、主题报告、行业大数据发布、高层对话等环节,以独特视角探索科学仪器在生命科学、环境、食品、新材料、新能源等行业的最新技术应用与市场机会,为科学仪器行业决策者提供前瞻性、战略性、全局性的思考蓝本,受到行业内专业人士高度关注,也得到广大行业群体的高度评价与赞扬。

一、会议时间:2017 年 4 月 24—25 日

二、会议地点:南京国际青年会议酒店

三、组织机构:

主办单位:中国仪器仪表行业协会;中国仪器仪表学会;仪器信息网(www.instrument.com.cn)

协办单位:中国仪器仪表学会分析仪器分会;南京市产品质量监督检验院;首都科技条件平台;我要测网(www.woyaoce.cn);仪品汇(www.yph.cn)

支持单位:南京新港国家高新技术产业园;北京科学仪器装备协作服务中心;中国生物检测监测产业技术创新战略联盟;北京材料分析测试服务联盟;中国出入境检验检疫协会;上海化学试剂产业技术创新战略联盟;《化学试剂》;科研用试剂产业技术创新战略联盟

四、主要参会对象

业界专家\学者、实验室主任、技术负责人、研发负责人、采购负责人、QC 负责人、QA 负责人、仪器企业及上下游企业董事长、总经理、总工、市场总监、研发总监、销售总监、行业协会、学会、主管政府领导、投融资机构、金融机构负责人、媒体等

五、会议注册及报名

报名网址:<http://www.instrument.com.cn/accsi/2017/Register.html>

(注:本届年会概不接受现场报名缴费)

六、年会咨询热线

年会赞助:齐先生 15810355513,010-51654077-8023,qshb@instrument.com.cn

报名参会:杜女士 13671073756,010-51654077-8055,accsi@instrument.com.cn