

水产加工副产物中磷脂和鱼油的分离及脂质组学研究

崔益玮¹, 李诗言^{1,2}, 王珏¹, 宋恭帅¹,
王扬², 戴志远¹, 沈清^{1*}

(1. 浙江工商大学海洋食品研究院, 浙江 杭州 310012;

2. 浙江省水产质量检测中心, 浙江 杭州 310023)

摘要: 为更好地对水产加工副产物进行加工利用, 本实验建立了从水产加工副产物中同时提取制备磷脂和鱼油的方法, 并分别利用多维度串联质谱鸟枪法和气相色谱法对样品的磷脂和鱼油的脂肪酸化合物进行脂质组学研究。利用改进Folch法和丙酮沉淀法制备得到副产物中的磷脂和鱼油, 比较了5种不同萃取液的提取效率, 其中CH₂Cl₂-MeOH (1:2, V/V)混合液同时提取磷脂和鱼油效果最佳, 提取率分别为0.97%和28.05%。鱼油经甲酯化反应, 以正己烷为溶剂直接进样, 利用气相色谱法分析脂肪酸甲酯成分, 磷脂样品采用流动注射直接进样, 经三重四级杆质谱母离子扫描(PreIS)和中性质量丢失扫描(NLS)对磷脂分子实现源内分离鉴定和定量分析。结果显示, 鱼油中主要含有油酸、亚油酸、棕榈酸等23种脂肪酸, 其中不饱和脂肪酸占75.97%; 磷脂样品中共检出磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和磷脂酰丝氨酸4类共69种磷脂分子, 并测出了许多含有DHA、EPA链的磷脂, 如16:0/20:5、16:0/22:6、18:1/22:6、18:0/22:6、20:0/22:6等。研究表明, 该方法能同时提取磷脂和鱼油, 并且前处理简单、提取效率高, 能够实现对资源的合理利用。

关键词: 鱼油; 磷脂; 水产加工副产物; 气相色谱法; 串联质谱法; 脂质组学

中图分类号: Q 545; TS 254.9

文献标志码: A

根据联合国粮食及农业组织的统计, 到2012年, 中国已成为过去十年中水产养殖总量和捕捞量增长最快的国家, 其中水产总量已达到3.86亿t, 远高于世界上其他国家^[1]。但同时, 发展迅猛的水产行业也导致了惊人的水产加工副产物的浪费。因此, 如何较好地利用水产加工副产物成为了一个亟待解决的问题。

鱼类脂肪中含有丰富的磷脂和鱼油。磷脂是一类含有磷酸根的脂质的总称, 广泛存在于各种生物体内^[2-3], 因其化学成分复杂而具有多重营养作用。磷脂是组成动物脑、神经组织、骨髓和内脏等机体器官不可缺少的结构性物质; 卵磷脂作为神经递质乙酰胆碱的前体物质, 能够促进动物生长发育; 作为组成生物膜

的重要成分, 磷脂可加强器官组织功能, 提高机体免疫力; 磷脂还能促进酯类的消化、吸收、转运以及合成, 在防止脂肪肝的同时改善机体对于维生素A的吸收^[4]。鱼油是 ω -3型多不饱和脂肪酸(ω -3PUFA)的良好来源, 其中二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)是2种对人体非常重要的多不饱和脂肪酸^[5], 有预防和治疗心血管疾病^[6]、防癌抗癌^[7]、抗炎症^[5]、健脑^[8]、明目^[9]、免疫调节^[10]等功能。

目前, 磷脂常用的提取方法主要有Bligh-Dyer法、Folch法、MTBE法^[11]以及超临界CO₂萃取法^[12]等。邹舟等^[13]利用Bligh-Dyer法提取鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)各部位组织中的磷脂; 叶彬清^[12]利用超临界CO₂萃取法从秋刀鱼(*Cololabis saira*)

收稿日期: 2017-03-15 修回日期: 2017-04-19

资助项目: 国家自然科学基金(31601542); 浙江省自然科学基金(LQ16C200001); 浙江省重点研发项目(2017C03041)

通信作者: 沈清, E-mail: leonqshen@163.com

内脏中先后萃取了甘油三酯和卵磷脂。鱼油的提取方法主要包括蒸煮法、压榨法和淡碱水解法^[14],此外陈欣等^[15]采用超声波的方法提取了鲤体内(*Cyprinus carpio*)的鱼油;许艳萍等^[14]则用超临界CO₂流体萃取技术萃取大黄鱼(*Larimichthys crocea*)鱼卵中的鱼油。但上述的各种方法都只能单独提取磷脂或鱼油,不能做到对二者的同时提取,且有些方法操作较为繁琐、耗时长、提取率低、提取物质量差、易污染环境。

本研究利用改进后的Folch法结合丙酮沉淀法对水产加工副产物进行提取,不仅对副产物进行了二次利用,还能同时提取其中的磷脂及鱼油,在很大程度上简化了实验步骤,且提取率较高,并达到了保护生态环境的目的。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料与试剂

水产加工副产物(舟山奥旭鱼油制品有限公司);37种脂肪酸甲酯混标标准品(纯品,上海安谱实验科技股份有限公司);磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和磷脂酰丝氨酸标准品(纯度97%,Avanti Polar Lipids, Inc.);MeOH为色谱纯(德国Merck公司);CH₂Cl₂、CH₃COCH₃、EtOH等均为分析纯(国药试剂公司)。

1.2 实验仪器与设备

4000 QTRAP串联四极杆质谱配ESI离子源(美国AB Sciex公司);7890A气相色谱仪(美国Agilent公司);落地式高速冷冻离心机(美国Thermo公司);超纯水系统(法国Milli-Q公司);其他为实验室常用仪器和设备。

1.3 实验方法

磷脂与鱼油粗提取 利用改进的Folch法和丙酮沉淀法进行磷脂与鱼油的粗提取。将水产加工副产物匀浆,称取10 g初样品。在初样品中加入30 mL CH₂Cl₂-MeOH (2 : 1, V/V)混合液,振荡混匀,再加入10 mL超纯水,以10 000 r/min高速冷冻离心10 min。使用移液器转移出最下层清液,在剩余的上清液和固形物中再次加入20 mL CH₂Cl₂,进行二次提取,重复提取3次后将4次萃取的下清液合并。

称取旋转蒸发瓶空瓶重量,将合并后的下清液移入瓶中,使用旋转蒸发仪在40 °C使CH₂Cl₂

蒸发,再次称取该瓶重量并与之前重量相减即为提取所得脂质混合物(包括磷脂、游离脂肪酸、甘油酯等脂质)重量。待脂质混合物冷却后,在其中加入提前预冷的CH₃COCH₃ 100 mL,振荡萃取后移入已称量的离心瓶中,以8000 r/min冷冻离心6 min,将上清液移入新的已称量的旋转蒸发瓶中,再次称量离心瓶并减去空瓶质量即得到磷脂重量。使用旋转蒸发仪在35 °C使上清液中的CH₃COCH₃蒸发,再次称量旋转蒸发瓶并减去空瓶重量即为鱼油(包括游离脂肪酸、甘油酯等脂质,下同)的重量。

将得到的磷脂及鱼油的重量与初样品的重量相比,可分别得出磷脂与鱼油的提取率。

脂肪酸甲酯化 将0.1 g鱼油与2 mL的NaOH-MeOH溶液(0.5 mol/L)混合后振荡摇匀,在65 °C的水浴锅中加热30 min,取出后冷却至室温,再加入2 mL的BF₃-MeOH溶液,振荡混匀,在65 °C水浴锅中继续加热3 min,取出并冷却至室温,加入2 mL正己烷提取,同时加入2 mL饱和NaCl溶液水洗,取出上清液后在其中加入1/10体积无水硫酸钠去除溶液中痕量的水,取上清液用于气相色谱分析。

气相色谱条件 色谱柱:HP-88毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.2 μm);载气:高纯氮气;恒流:0.65 mL/min;进样量:1 μL;分流比:40 : 1;进样口温度:250 °C;升温程序:初温50 °C,保持2 min,以4 °C/min升至220 °C并维持15 min。

质谱条件 针泵注射进样器流速:5 μL/min。质谱扫描范围:m/z为450~950。对不同种类的磷脂在母离子和中性丢失2种扫描模式下进行检测,并通过多通道检测(MCA)累加谱图,选定m/z 184为子离子,经母离子扫描(PrelS)磷脂酰胆碱;选定141 u为中性丢失碎片,经中性质量丢失扫描(NLS)得到磷脂酰乙醇胺;选定m/z 241为子离子,经PrelS扫描磷脂酰肌醇;选定87 u为中性丢失碎片,经NLS扫描磷脂酰丝氨酸^[16],得到各个磷脂类谱图。正负离子模式下离子喷雾电压分别为5.5和4.5 kV。离子源温度:450 °C。雾化气:35 psi;气帘气:20 psi。去簇电压:100 V;碰撞电压:40 V。磷脂分子通过LipidView 1.1(美国AB Sciex公司)质谱库鉴定,部分脂质使用多维谱法进行鉴定,具体步骤:选定磷脂脂肪酸链碎片为特征子离子进行PrelS扫描,如m/z 255

(C16:0)、m/z 283(C18:0)、m/z 301(C20:5)、m/z 303(C20:4)、m/z 327(C22:6)等, 得到特定脂肪酸链磷脂谱图, 通过与磷脂类谱图对比, 若某一离子峰同时出现在2张特定脂肪酸链磷脂谱图和1张磷脂类谱图中, 即可判定该磷脂分子结构。

数据处理分析 磷脂与鱼油粗提取实验中, 所得的6组平行数据用Excel进行标准差分析, 并用Origin软件作图。气相色谱及质谱分析中均使用归一化法进行定量分析。

2 结果

2.1 磷脂与鱼油粗提取条件优化

将初样品中的30 mL CH_2Cl_2 -MeOH (2 : 1, V/V)混合液换成等体积的 CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 2, V/V)混合液、 CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 1, V/V)混合液、MeOH和EtOH分别提取, 所得结果见图1。

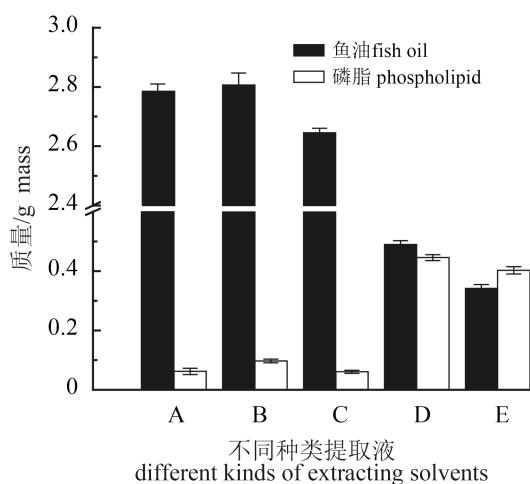


图1 不同种类萃取液所提取的鱼油及磷脂质量

A. CH_2Cl_2 -MeOH (2 : 1, V/V)混合液; B. CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 2, V/V)混合液; C. CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 1, V/V)混合液; D. MeOH; E. EtOH, 下同

Fig. 1 The mass of fish oil and phospholipid extracted from different kinds of extracts

A. the mixture of CH_2Cl_2 -MeOH (2 : 1, V/V); B. the mixture of CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 2, V/V); C. the mixture of CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 1, V/V); D. MeOH; E. EtOH, the same below

将图1中不同种类萃取液所提取的鱼油及磷脂的重量与初样品重量相比, 可得出A~E 5种萃取液鱼油提取比分别为 $27.91\% \pm 0.18\%$ 、 $28.05\% \pm 0.37\%$ 、 $26.52\% \pm 0.12\%$ 、 $4.90\% \pm 0.11\%$ 、 $3.43\% \pm 0.11\%$; 磷脂提取比分别为 $0.62\% \pm 0.10\%$ 、 $0.97\% \pm 0.06\%$ 、 $0.61\% \pm 0.05\%$ 、 $4.46\% \pm 0.09\%$ 、 $4.03\% \pm 0.11\%$ 。

比较5种不同种类萃取液对于鱼油及磷脂的提取效率。结果显示, 在鱼油的提取方面, CH_2Cl_2 -MeOH混合溶液提取率可达 $26.52\% \sim 28.05\%$, 明显高于MeOH的 4.90% 和EtOH的 3.43% , 而 CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 2, V/V)混合液与 CH_2Cl_2 -MeOH (2 : 1, V/V)混合液的提取率仅相差 0.14% ; 在磷脂的提取方面, MeOH及EtOH的磷脂提取率分别为 4.46% 和 4.03% , 远高于 CH_2Cl_2 -MeOH混合溶液, 但由于这二者的极性较大, 使用该方法所得到的磷脂可能混合了其他诸如脂蛋白等大分子物质, 故弃去不用, 而在几种不同比例的 CH_2Cl_2 -MeOH混合溶液中, CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 2, V/V)混合液的磷脂提取率为 0.97% , 该提取率明显高于 CH_2Cl_2 -MeOH (2 : 1, V/V)混合液的 0.62% 和 CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 1, V/V)混合液的 0.61% , 其原因可能因为MeOH极性高于 CH_2Cl_2 , 而磷脂又为极性分子, 故提高MeOH比例有利于磷脂提取。因此, 本实验采用 CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 2, V/V)混合液同时提取磷脂和鱼油。

2.2 鱼油样品中脂肪酸化学成分分析

本实验利用气相色谱法对提取所得的鱼油样品进行脂肪酸甲酯化实验, 将实验得出的样品中化学成分的气相色谱图(图2-b)与37种脂肪酸甲酯混标标准品气相色谱图(图2-a)进行对比, 并用面积归一法定量分析各类脂肪酸的相对含量。结果显示, 鱼油样品中共检出23种脂肪酸, 饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFA)占 24.03% , 以棕榈酸为主, 含量达到 17.70% , 硬脂酸次之, 含量为 4.2% ; 不饱和脂肪酸(unsaturated fatty acid, UFA)占 75.97% , 其中单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA)占脂肪酸总含量的 26.14% , 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)占 45.97% 。在各类UFA中, 以油酸和亚油酸为主, 其含量分别高达 42.06% 和 22.96% , 棕榈油酸、 α -亚麻酸、花生一烯酸次之, 含量也能达到 $2.26\% \sim 2.97\%$ (表1)。此外, 由于实验样品为淡水鱼, 故EPA和DHA含量略少, 但均有检出, 分别占总量的 0.26% 和 0.65% 。各类脂肪酸的比例为SFA : MUFA : PUFA = 1 : 1.9 : 1.1。用该方法对水产加工副产物进行提取, 所得的脂肪酸中, 不饱和脂肪酸占大部分, 其中多为多不饱和脂肪酸。

2.3 鸟枪法脂质组学鉴定

将磷脂样品注入ESI离子源, 利用三重四级

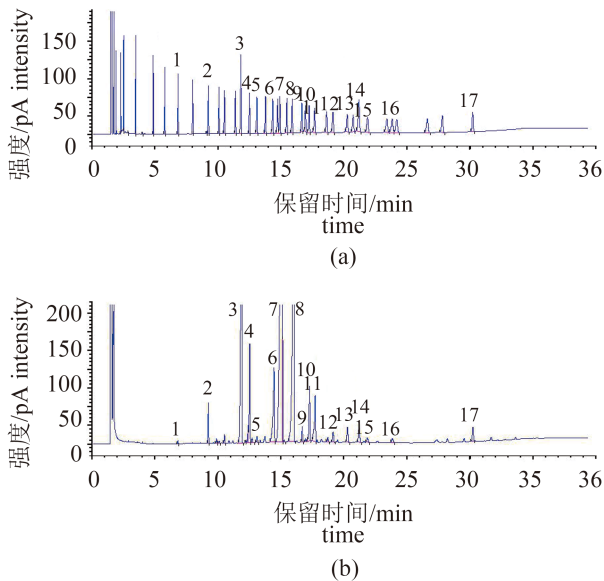


图2 脂肪酸种类

1. C12:0; 2. C14:0; 3. C16:0; 4. C16:1; 5. C17:1; 6. C18:0; 7. C18:1 cis; 8. C18:2 cis; 9. C18:3 n6; 10. C18:3 n3; 11. C20:1; 12. C20:2; 13. C22:0+C20:3 n6; 14. C22:1; 15. C20:4; 16. C20:5; 17. C22:6

Fig. 2 The contrast of the kinds of fatty acid

杆质谱所具有的PreIS和NLS功能,通过质谱扫描选定的特征离子碎片即可得到含有该碎片的所有母离子。因动物的骨骼肌组织中一般不含有磷脂酰甘油(phosphatidyl glycerol, PG),且鱼类肌肉组织中甘油磷脂酸(phosphatidic acid, PA)属于低丰度磷脂,故这2类磷脂在本实验中均未检出。通过磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline, PC)含有的特征碎片 $[H_2PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3]^+$ 可选定 m/z 184为子离子,通过磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositol, PI)含有的特征碎片 $[C_6H_{10}O_8P]$ 可选定 m/z 241为子离子,经PreIS扫描后可分别得到所有PC类(图3-a)、PI类(图3-c)磷脂分子;通过磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)含有的特征碎片 $[HPO_4(CH_2)_2NH_3]$ 可选定141 u为子离子,通过磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine, PS)含有的特征碎片 $(C_3H_5NO_2P)$ 可选定87 u为子离子,经NLS扫描后可分别得到所有PE类(图3-b)、PS类(图3-d)磷脂分子。

对于该磷脂样品,PC谱图检测出的峰较多,证明PC种类较多,且 m/z 多在732.9~835.0, m/z 761.0、 m/z 783.0等峰丰度较大;PE类似于PC,检测出的峰也较多, m/z 多聚集在718.9~849.0, m/z 764.9、 m/z 788.9等峰丰度较大;PI的谱图不同于前二者,检测出的峰较少,说明PI种类较

表1 鱼油中脂肪酸化学组分及含量

Tab. 1 The chemical constituent and content of fatty acid methyl ester in the fish oil

序号 no.	保留时间/min retention time	化学成分 chemical component	相对百分含量/% the relative percentage
1	6.799	C12:0 月桂酸甲酯	0.06
2	9.209	C14:0 肉豆蔻酸甲酯	0.96
3	10.057	C14:1 肉豆蔻烯酸甲酯	0.07
4	10.489	C15:0 十五烷酸甲酯	0.23
5	11.869	C16:0 棕榈酸甲酯	17.70
6	12.491	C16:1 棕榈油酸甲酯	2.97
7	13.073	C17:0 十七烷酸甲酯	0.20
8	13.698	C17:1 十七碳烯酸甲酯	0.28
9	14.418	C18:0 硬脂酸甲酯	4.20
10	15.052	C18:1 cis 油酸甲酯	42.06
11	15.985	C18:2 cis 亚油酸甲酯	22.96
12	16.648	C18:3 n6 γ -亚麻酸甲酯	0.48
13	16.925	C20:0 花生酸甲酯	0.13
14	17.233	C18:3 n3 α -亚麻酸甲酯	2.03
15	17.679	C20:1 花生一烯酸甲酯	2.26
16	18.679	C21:0 二十一烷酸甲酯	0.18
17	19.105	C20:2 花生二烯酸甲酯	0.44
18	20.243	C22:0+C20:3 n6 山嵛酸甲酯+花生三烯酸甲酯	0.77
19	21.164	C22:1 芥酸甲酯	0.87
20	21.824	C20:4 花生四烯酸甲酯	0.24
21	23.796	C20:5 EPA	0.26
22	30.187	C22:6 DHA	0.65

少, m/z 881.8、 m/z 885.9、 m/z 909.8等峰较明显;PS检测出的峰也较少,其中 m/z 788.8、 m/z 810.8、 m/z 836.9、 m/z 862.9等峰较明显。

磷脂分子种类确定后,即可解析其2条脂肪酸链结构。本实验先用多维质谱法得到所有含有选定脂肪酸链碎片的磷脂,与图3进行对比后由LipidViewTM软件定性和多维质谱解析,以图3-b中离子峰 m/z 766.9为例,该离子峰为磷脂酰乙醇胺,其负离子模式下理论值为 m/z 764.9,通过对特定脂肪酸链磷脂谱搜索,在 m/z 255(C16:0)、 m/z 283(C18:0)、 m/z 301(C20:5)和 m/z 329(C22:5)对应的特征脂肪酸链磷脂谱图中均发现了离子

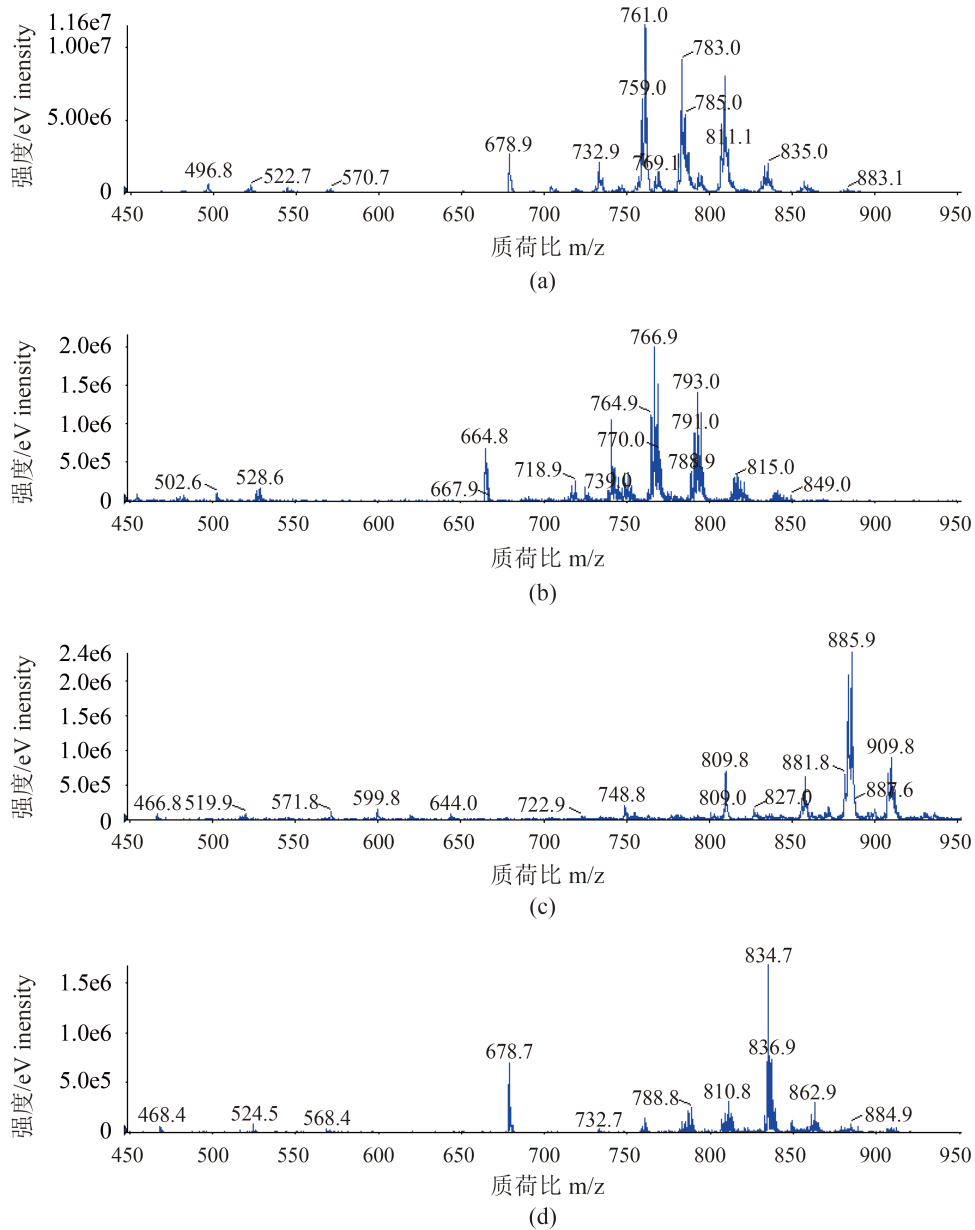


图3 鸟枪法测定磷脂样品质谱图

Fig.3 Mass spectra of phospholipids by shotgun lipidomics

峰m/z 764.9, 故推测该离子峰为PE 18:0/20:5和PE 16:0/22:5的重叠。通过归一化法对已鉴定的磷脂分子进行相对含量测定, 结果见表2。

提取出的磷脂样品中共检测出20种PC, 21种PE, 14种PI, 14种PS。其中, 磷脂的C原子数为16~22(溶血性磷脂)和32~44, 双键数为0~6(表2)。在这4类磷脂中, PC中16:0/18:1(丰度为19.10%)、16:0/20:4(丰度为16.23%)、16:0/22:5(丰度为11.31%)、16:0/18:2(丰度为9.72%)、16:0/22:6(丰度为7.46%)等分子种含量较

高; PE中16:0/22:4&18:0/20:4(丰度为8.97%)、16:0/22:6(丰度为7.52%)等分子种含量较高; PI中16:0/22:5(丰度为17.73%)、16:0/22:4&18:0/20:4(丰度为17.58%)、18:0/22:6(丰度为7.41%)等分子种含量较高; PS中含量较高的为18:0/22:5(丰度为12.91%)。通过实验, 还从该提取方法得到的磷脂样品中测出了许多含有DHA、EPA链的磷脂, 如16:0/20:5在PC、PE、PI中均有检出, 丰度分别为2.57%、1.17%、2.10%; 16:0/22:6在PC、PE、PI、PS这4类磷脂中均存在, 丰度分别为7.46%、

表 2 样品中磷脂结构与含量

Tab. 2 The identity and content of phospholipid in the sample

脂肪酸链sn1/sn2 fatty acid chains	PC [M+H] ⁺	丰度/% abundance	PE [M+H] ⁺	丰度/% abundance	PI [M-H] ⁻	丰度/% abundance	PS [M-H] ⁻	丰度/% abundance
16:0	496.7	1.21			571.7	1.25		
18:1	522.7	1.13						
18:0			482.7	0.36	599.7	1.95		
20:4			502.7	0.36				
22:5			528.6	1.11				
22:6					643.9	0.74		
16:0/16:1	732.9	3.79						
16:0/16:0	735.0	1.02						
O-16:0/18:1	747.0	1.02						
16:0/18:3	756.9	1.69						
16:0/18:2	759.0	9.72	716.9	1.07				
16:0/18:1	761.0	19.10					760.8	1.92
O-16:0/20:5	767.0	1.54	724.9	1.16				
O-16:0/20:4	769.0	1.93						
16:0/20:5	781.0	2.57	738.8	1.17	855.8	2.10		
16:0/20:4	783.0	16.23			857.9	4.67		
16:0/20:3	785.0	4.68					784.8	1.71
16:0/20:2 & 18:0/18:2	787.1	1.69	745.0	1.70			786.8	2.95
16:0/20:1			747.0	0.86			788.8	2.87
O-16:1/22:6			748.9	1.92				
O-16:0/22:6	793.0	1.99	750.9	2.55				
O-16:0/22:5	795.0	1.44			869.8	1.49		
16:1/22:6			762.9	0.57	880.0	0.94		
16:0/22:6	807.0	7.46	764.9	7.52	881.8	4.26	806.8	1.60
16:0/22:5	809.0	11.31			883.8	17.73	808.8	2.81
16:0/22:4 & 18:0/20:4			768.9	8.97	885.8	17.58	810.8	4.83
16:0/22:3			771.0	1.79			812.8	2.79
16:0/22:2			772.9	0.58				
O-18:0/22:6					895.9	1.19		
O-18:0/22:1			788.9	2.78	905.7	1.16		
18:1/22:6	833.0	2.72			907.8	5.45	832.8	2.24
18:0/22:6	835.1	2.73			909.8	7.41		
18:0/22:5							836.8	12.91
18:0/22:4							838.8	3.95
20:4/22:6			813.0	0.57				
20:3/22:6			814.9	2.30				
20:1/22:6							860.8	1.99
20:0/22:6			820.9	1.46			862.8	4.71
20:0/22:5							864.7	1.23
22:5/22:6			838.9	0.73				
22:4/22:6			841.1	0.80				

7.52%、4.26%、1.60%;在PC、PI、PS中均检出了18:1/22:6,丰度分别为2.72%、5.45%、2.24%;PC和PI中检出了18:0/22:6,丰度分别为2.73%和7.41%;PE和PS中检出了20:0/22:6,丰度分别为1.46%和4.71%等。

3 讨论

目前,有许多研究者在提取脂质时都选择使用Folch法,如卢航等^[17]利用Folch法提取长吻鮠(*Leiocassis longirostris*)脑中的磷脂;蒋立勤等^[18]用Folch法从鲈(*Pneumatophorus japonicus*)头和鲑鱼内脏中提取油脂;陆丽丽等^[19]利用正己烷—乙醇—丙酮法从鲫(*Carassius auratus*)卵中提取磷脂得率为0.99%。但这些方法均未能同时分离提取磷脂和鱼油。本研究以水产加工副产物为原料,探索了利用Folch法和丙酮沉淀法同时提取其中磷脂和鱼油的方法,并对其进行了优化,鱼油和磷脂的提取率分别为28.05%和0.97%,提取效率均较高。

在测定水产品脂肪酸含量的方法中,气相色谱法是使用较多的方法之一,如张志超等^[20]利用气相色谱法同时测定海产品中37种脂肪酸含量;张志坚等^[21]采用气相色谱—质谱联用方法,分析了3种淡水鱼脂肪的脂肪酸组成,其中,多不饱和脂肪酸含量为29.26%~41.49%,单不饱和脂肪酸的含量为26.46%~39.60%,饱和脂肪酸的含量为23.35%~37.05%。本实验鱼油样品中共检出23种脂肪酸,其中饱和脂肪酸占24.03%,主要有棕榈酸和硬脂酸;不饱和脂肪酸占75.97%,主要有油酸、亚油酸、棕榈油酸、 α -亚麻酸、花生一烯酸、EPA和DHA,其中多不饱和脂肪酸含量为45.97%。本方法提取的鱼油脂肪酸种类较多,不饱和脂肪酸含量高,鱼油质量好。

鸟枪法是基于电喷雾电离质谱法(ESI-MS)开发的一种适用于大多数磷脂定量分析的检测方法。Jin等^[22]和Shen等^[23-24]通过鸟枪法脂质组学研究了水产加工副产物等的磷脂成分;李婷婷^[25]利用鸟枪法,分析了水产动物肌肉组织内的磷脂轮廓,共鉴定出29种磷脂分子,包括16种PC分子和13种PE分子。沈清等^[26]利用二醇基硅胶固相萃取—多维质谱对乌鳢(*Ophiocephalus argus*)组织的脂质组学进行分析,共检出18种PC、21种PE、12种PI和16种PS。本研究提取出的磷脂样品

中检测出20种PC、21种PE、14种PI、14种PS共69种磷脂分子,磷脂种类多,提取效率高,故本方法对于磷脂的提取有效。

本研究建立了从水产加工副产物中同时提取制备磷脂和鱼油的方法,结果显示,该方法提取效率高、提取产物质量好,且为大量水产加工副产物的处理提供了一条解决途径,对维护生态环境起到了一定的作用。

参考文献:

- [1] 王昕岑. 水产品贮藏过程中磷脂的鸟枪法分析及水解机理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
Wang X C. Shotgun lipidomics and hydrolysis mechanism of phospholipids from aquatic product during storage[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015(in Chinese).
- [2] Hanahan D J. A guide to phospholipid chemistry[M]. New York: Oxford University Press, 1997.
- [3] Vance D E, Vance J. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes[M]. 4th Edition, Amsterdam: Elsevier Science, 2002.
- [4] 汪海峰, 杨受保. 磷脂的功能及其在水产养殖中的作用[J]. 水利渔业, 2004, 24(5): 67-69.
Wang H F, Yang S B. Functions and application of phosphorus lipids in aquaculture[J]. Reservoir Fisheries, 2004, 24(5): 67-69(in Chinese).
- [5] 郭玉华, 李钰金. 水产品中EPA和DHA的研究进展[J]. 肉类研究, 2011, 25(1): 82-86.
Guo Y H, Li Y J. Research progress of EPA and DHA from aatic[J]. Meat Research, 2011, 25(1): 82-86(in Chinese).
- [6] Zucker M L, Bilyeu D S, Helmkamp G M, et al. Effects of dietary fish oil on platelet function and plasma lipids in hyperlipoproteinemic and normal subjects[J]. Atherosclerosis, 1988, 73(1): 13-22.
- [7] 郝颖, 汪之和. EPA、DHA的营养功能及其产品安全性分析[J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 180-183.
Hao Y, Wang Z H. Nutritive function and safety analysis of EPA and DHA[J]. Modern Food Science & Technology, 2006, 22(3): 180-183(in Chinese).
- [8] 熊正英, 张崇旭, 郑毅. 多不饱和脂肪酸与运动[J]. 青海师范大学学报(自然科学版), 2002(3): 67-70.
Xiong Z Y, Zhang C X, Zheng Y. PUFA and exercise[J]. Journal of Qinghai Normal University (Natural Science

- Edition), 2002(3): 67-70(in Chinese).
- [9] Birch E E, Dennis R C, Yolanda S F, *et al.* A randomized controlled trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula in term infant after weaning at 6 wk of age[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 75(3): 570-580.
- [10] Simopoulos A P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases[J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2002, 21(6): 495-505.
- [11] Yin F W, Zhou D Y, Zhao Q, *et al.* Identification of glycerophospholipid molecular species of mussel (*Mytilus edulis*) lipids by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2016, 213: 344-351.
- [12] 叶彬清. 超临界CO₂萃取秋刀鱼内脏油脂及卵磷脂氧化特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- Ye B Q. Extraction and characterization of oil and lecithin extracted from pacific saury (*Cololabis saira*) viscera by supercritical carbon dioxide[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015 (in Chinese).
- [13] 邹舟, 王琦, 于刚, 等. 鲢鱼各部位磷脂组分及脂肪酸组成分析[J]. *食品科学*, 2014, 35(24): 105-109.
- Zou Z, Wang Q, Yu G, *et al.* Lipid classes and fatty acid composition of phospholipids from different parts of silver carp[J]. *Food Science*, 2014, 35(24): 105-109(in Chinese).
- [14] 许艳萍, 梁鹏, 陈丽娇, 等. 超临界萃取鱼卵鱼油及其脂肪酸组成的研究[J]. *食品科技*, 2015(10): 270-274.
- Xu Y P, Liang P, Chen L J, *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of fish roe oil and fatty acid composition[J]. *Food Science and Technology*, 2015(10): 270-274(in Chinese).
- [15] 陈欣, 张捷莉, 李铁纯, 等. 鲤鱼油中脂肪酸的GC/MS (气相色谱—质谱)分析[J]. *粮食与食品工业*, 2003(1): 39-40.
- Chen X, Zhang J L, Li T C, *et al.* Analysis of the fatty acid in fish oil of *Cyprinus carpio* by GC/MS[J]. *Cereal & Food Industry*, 2003(1): 39-40.
- [16] Han X L, Yang K, Gross R W. Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2012, 31(1): 134-178.
- [17] 卢航, 里慧, 赵景华, 等. 利用高效液相色谱-蒸发光检测器法分析鲫鱼脑中磷脂组成[J]. *食品科学*, 2015, 36(24): 177-180.
- Lu H, Li H, Zhao J H, *et al.* Determination of phospholipids in channel catfish brain by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD)[J]. *Food Science*, 2015, 36(24): 177-180(in Chinese).
- [18] 蒋立勤, 余陈欢, 余勤, 等. 两种海洋副产品的脂肪酸组成及其对高脂小鼠的影响[J]. *食品与机械*, 2009, 25(2): 58-61.
- Jiang L Q, Yu C H, Yu Q, *et al.* Fatty acid composition of two different marine by-products oils and the Effects on mice fed by high-fat diet[J]. *Food & Machinery*, 2009, 25(2): 58-61(in Chinese).
- [19] 陆丽丽, 陈舜胜. 鲫鱼卵中脂质提取方法的比较[J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(1): 104-108.
- Lu L L, Chen S S. Comparison on methods of extracting lipids from roes of *Carassius auratus*[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(1): 104-108(in Chinese).
- [20] 张志超, 余新威, 方力, 等. 气相色谱法同时测定海产品中37种脂肪酸含量[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014 (12): 1710-1713.
- Zhang Z C, Yu X W, Fang L, *et al.* Simultaneous determination of 37 fatty acids in seafood by gas chromatography[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2014(12): 1710-1713(in Chinese).
- [21] 张立坚, 杨会邦, 蔡春. 3种淡水鱼油脂肪酸的含量分析[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(4): 115-117.
- Zhang L J, Yang H B, Cai C. The profile of fatty acids in the fish oil of three kind of freshwater[J]. *Food Research and Development*, 2011, 32(4): 115-117(in Chinese).
- [22] Jin R Y, Li L Q, Feng J L, *et al.* Zwitterionic hydrophilic interaction solid-phase extraction and multi-dimensional mass spectrometry for shotgun lipidomic study of *Hypophthalmichthys nobilis*[J]. *Food Chemistry*, 2017, 216: 347-354.
- [23] Shen Q, Cheung H Y. TiO₂/SiO₂ core-shell composites-based sample preparation method for selective extraction of phospholipids from shrimp waste followed by hydrophilic interaction chromatography coupled with quadrupole time-of-flight/mass spectrometry analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62: 8944-8951.

- [24] Shen Q, Wang Y Y, Gong L K, *et al.* Shotgun lipidomics strategy for fast analysis of phospholipids in fisheries waste and its potential in species differentiation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(37): 9384-9393.
- [25] 李婷婷. 鸟枪法快速分析鱼贝类磷脂成分[J]. *食品科技*, 2015, 40(7): 330-334.
- Li T T. Rapid analysis of fish and shellfish phospholipid composition by shotgun approach[J]. *Food Science and Technology*, 2015, 40(7): 330-334(in Chinese).
- [26] 沈清, 金仁耀, 冯俊丽, 等. 二醇基硅胶固相萃取—多维质谱对乌鳢组织脂质组学分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(2): 154-158.
- Shen Q, Jin R Y, Feng J L, *et al.* SiO₂/diol based solid-phase extraction and multi-dimensional mass spectrometry for lipidomics study of *Channa argus*[J]. *Food Scienc*, 2017, 38(2): 154-158(in Chinese).

Separation of phospholipids and fish oil from fishery by-products followed by lipidomics study

CUI Yiwei¹, LI Shiyuan^{1,2}, WANG Jue¹, SONG Gongshuai¹,
WANG Yang², DAI Zhiyuan¹, SHEN Qing^{1*}

(1. *Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China;*

2. *Aquatic Products Quality Inspection Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310023, China)*

Abstract: For full utilization of the fishery wastes, the aim of this study was to establish a method for extracting the phospholipids and fish oil simultaneously from wastes, followed by the analysis of phospholipid and fatty acid composition on the basis of multi-dimensional tandem mass spectrometry and gas chromatography. Phospholipids and fish oil were extracted simultaneously by modified Folch method and precipitation method with acetone. The extracting efficiency of five different extracts was compared, and the mixture of CH₂Cl₂-MeOH (1 : 2, *V/V*) performed best, whose extracting rates of phospholipids and fish oil were 0.97%和28.05%, respectively. Afterwards, the obtained fish oil was esterified and analyzed by gas chromatography, and the obtained phospholipids were injected directly by a syringe pump and identified and quantified by tandem mass spectrometry in the precursor-ion scan (PreIS) and neutral-loss scan (NLS) modes. The results show that fish oil contains 23 kinds of fatty acids, including oleic acid, linoleic acid, palmitic acid, etc. The content of unsaturated fatty acid is 75.97%. There are four classes (phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inositol, phosphatidyl serine) and 69 kinds of phospholipid molecules were detected in the phospholipid extract. Phospholipids with at least one eicosapentaenoic acyl/docosahexaenoic acyl chain were frequently found, such as 16:0/20:5, 16:0/22:6, 18:1/22:6, 18:0/22:6, 20:0/22:6, etc. In conclusion, this method can efficiently extract phospholipids and fish oil simultaneously. It is simple, fast, and friendly to the environment.

Key words: fish oil; phospholipids; fishery by-products; gas chromatographic; tandem mass spectrometry; lipidomics

Corresponding author: SHEN Qing. E-mail: leonqshen@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31601542); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ16C200001); Key Project of Research and Development of Zhejiang Province (2017C03041)