

# 人乳中叶黄素及叶黄素酯的测定

黄千千<sup>1,2</sup>, 何小玲<sup>3</sup>, 丁德胜<sup>1,2,4</sup>, 蔡甜<sup>5</sup>, 陈科伟<sup>1,2,4\*</sup>

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715)(2.西南大学食品科学与工程国家级实验教学示范中心, 重庆 400715)(3.重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016)(4.川渝共建特色食品重庆市重点实验室, 重庆 400715)(5.西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

**摘要:** 人乳中的叶黄素对婴幼儿视力和认知功能的发育起着至关重要的作用。该研究利用超高效液相色谱串联质谱对不同分娩年龄和泌乳阶段的人乳中叶黄素及叶黄素酯的组成和含量进行测定, 最终实现定性定量分析人乳中的叶黄素和 16 种叶黄素酯。研究发现人乳中叶黄素与叶黄素酯的含量呈较强的正相关关系(皮尔逊相关系数为 0.721), 适龄组(分娩年龄 < 35 岁)乳汁中叶黄素和叶黄素酯的含量与高龄组(分娩年龄 ≥ 35 岁)相近, 两者之间的差异并不显著( $P > 0.05$ ), 可知分娩年龄对人乳中叶黄素及叶黄素酯含量的影响较小。叶黄素与叶黄素酯的含量均随着泌乳期的延长而逐渐降低, 初乳中两者的含量均最高, 其中叶黄素的平均含量达 183.78  $\mu\text{g/L}$ , 叶黄素酯的平均含量达 45.89  $\mu\text{g/L}$ 。分别从初乳、过渡乳、成熟乳中检出了 10、14、6 种叶黄素酯, 其中叶黄素棕榈酸-硬脂酸酯的含量在整个泌乳期中最高, 叶黄素二硬脂酸酯的含量次之。研究结果可为人乳成分的研究及婴配产品的研发提供一定的实验和理论基础。

**关键词:** 人乳; 超高效液相色谱串联质谱; 叶黄素; 叶黄素酯; 分娩年龄; 测定

文章编号: 1673-9078(2024)07-267-275

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0860

## Determination of Lutein and Lutein Esters in Human Breast Milk

HUANG Qianqian<sup>1,2</sup>, HE Xiaoling<sup>3</sup>, DING Desheng<sup>1,2,4</sup>, CAI Tian<sup>5</sup>, CHEN Kewei<sup>1,2,4\*</sup>

(1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)(2.National Demonstration Center for Experimental Food Science and Technology Education, Southwest University, Chongqing 400715, China)(3.Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)(4.Chongqing Key Laboratory of Speciality Food Co-built by Sichuan and Chongqing, Chongqing 400715, China)(5.School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** Lutein in human breast milk plays an important role in the development of vision and cognitive function in infants. In this study, ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was used to determine the composition and contents of lutein and lutein esters in human breast milk collected at different ages for giving childbirth and lactation stages. Finally, lutein and 16 lutein esters in human breast milk were qualitatively and quantitatively analyzed.

引文格式:

黄千千,何小玲,丁德胜,等.人乳中叶黄素及叶黄素酯的测定[J].现代食品科技,2024,40(7):267-275.

HUANG Qianqian, HE Xiaoling, DING Desheng, et al. Determination of lutein and lutein esters in human breast milk [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 267-275.

收稿日期: 2023-07-17

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(CSTB2022NSCQ-MSX0633); 中国食品科学技术学会食品科技基金(2020-03); 西南大学大学生创新创业训练计划项目(X202210635487)

作者简介: 黄千千(2000-), 女, 本科生, 研究方向: 食品化学与营养学, E-mail: 1948515638@qq.com; 共同第一作者: 何小玲(1988-), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 妊娠期代谢性疾病及妊娠期营养, E-mail: 694229094@qq.com

通讯作者: 陈科伟(1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品化学与营养学, E-mail: chenkewei@swu.edu.cn

A strong positive correlation was found between lutein and lutein esters contents in human breast milk (Pearson correlation coefficient was 0.721). The contents of lutein and lutein esters in human breast milk in the age-appropriate group (childbirth age < 35 years) was similar to that of the older age group (childbirth age  $\geq$  35 years), and the difference between the two was insignificant ( $P > 0.05$ ), indicating that the age for giving childbirth had little effect on the contents of lutein and lutein esters in human breast milk. The contents of lutein and lutein esters decreased gradually with the extension of the lactation period, and the contents of both in colostrum were the highest, with the average content of lutein reaching 183.78  $\mu\text{g/L}$  and the average content of lutein esters reaching 45.89  $\mu\text{g/L}$ . There were 10, 14 and 6 kinds of lutein esters detected in the colostrum, transitional milk and mature milk, respectively, with the content of lutein palmitate-stearate being the highest throughout the whole lactation period, followed by lutein distearate. The research results can provide certain experimental and theoretical bases for the research of human milk composition and the research and development of infant formula foods.

**Key words:** human breast milk; ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; lutein; lutein esters; childbearing age; determination

人乳中的叶黄素对婴幼儿的生长发育具有十分重要的作用，婴幼儿自身不能合成叶黄素，最好通过人乳获取。婴幼儿的视网膜发育不健全，眼睛部位的抗氧化保护尤为重要。叶黄素在视网膜黄斑区内发挥关键作用<sup>[1]</sup>，具有良好的抗氧化和防蓝光作用，从而防止婴幼儿生长发育过程中视力的下降以及近视的出现<sup>[2]</sup>。另外，叶黄素也能被选择性地吸收进入婴幼儿脑组织，成为大脑中最主要的类胡萝卜素。有研究表明，较高的妊娠期叶黄素摄入量与更好的儿童行为表现相关，并且人乳中的高叶黄素浓度与婴幼儿更好的识别记忆有关，说明生命早期叶黄素的摄入对婴幼儿的脑发育和认知功能也十分有益<sup>[3]</sup>。

人乳中的叶黄素包括游离态和结合酯两种形式，图1为叶黄素的化学结构式，由于分子中含有两个羟基基团，叶黄素在与脂肪酸酯化时会形成多种叶黄素酯。人乳中的脂质分子会形成被细胞膜包裹的乳脂球，而叶黄素分布在乳脂球的表面，构成乳腺上皮细胞膜的成分，两者可以结合形成叶黄素酯<sup>[4]</sup>。虽然人乳中叶黄素及叶黄素酯的含量较少，但是对于婴幼儿的生理健康及发育有着不可或缺的作用。目前，国内外关于孕妇血浆和婴儿脐带血中叶黄素含量的研究较多<sup>[5]</sup>，此外 Ríos 等<sup>[4]</sup>初步发现初乳中含有叶黄素酯；Zoccali 等<sup>[6]</sup>首次检测了人初乳中的游离类胡萝卜素和类胡萝卜素脂肪酸酯，而暂无研究深入探索不同泌乳阶段人乳中叶黄素酯的具体种类和含量分布。同时，随着我国产妇高龄化的趋势逐渐上升<sup>[7, 8]</sup>，分娩年龄对乳汁成分也可能产生一定的影响，因此本研究将在测定不同泌乳期叶黄素含量的基础上，首次测定叶黄素酯的组成和分

布，并研究人乳中叶黄素及叶黄素酯含量在不同分娩年龄间的差异关系。

本研究利用超高效液相色谱/四极杆飞行时间质谱检测 (Ultra-high Performance Liquid Chromatography / Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry, UPLC/Q-TOF-MS) 技术对人乳中叶黄素和叶黄素酯的种类和含量进行测定，探究分娩年龄与人乳中叶黄素及叶黄素酯含量之间的联系，并进一步研究不同泌乳阶段叶黄素及其衍生物叶黄素酯的组成和含量差异，为相关婴配食品的改良、生产以及类脂代谢的研究提供一定的科学和理论依据。

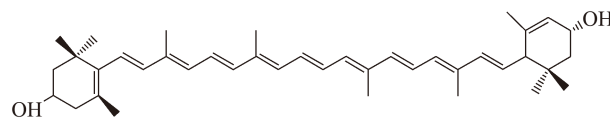


图1 叶黄素化学结构式

Fig.1 Chemical structure of lutein

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 主要仪器设备

人乳样品来自重庆医科大学附属第一医院产科 (伦理审查批号: 2020-548)。一共收集了 150 位哺乳期志愿者的乳汁，每位志愿者都被告知详细信息并签署了知情同意书。在收集人乳之前，志愿者的乳房先用热毛巾捂热一段时间，然后集中在上午 9 点到 11 点之间收集。所有的志愿者身体指标均正常，无不良嗜好。志愿者的平均分娩年龄为 (31.26  $\pm$  3.45) 岁，其中最大分娩年龄为 43 岁，最小分娩年龄为 22 岁，22~34 岁产妇 95 例，35~43

岁产妇 55 例。收集到的乳汁中有 50 份来自于初乳 (1~7 d), 50 份来自于过渡乳 (8~15 d), 50 份来自于成熟乳 (16 d 及以后), 每份乳汁样品约为 20 mL, 被平均分装到 5 mL 冷冻储存管中, 并贮存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下备用<sup>[9]</sup>。

### 1.1.2 试剂

叶黄素 (CAS: 127-40-2, 纯度 $\geq 90\%$ )、叶黄素二棕榈酸酯 (CAS: 547-17-1)、叶黄素棕榈酸-硬脂酸酯 (CAS: 79313-82-9)、叶黄素肉豆蔻酸-棕榈酸酯 (CAS: 104784-49-8), 三种叶黄素酯的纯度均 $\geq 98\%$ , 上海源叶生物科技有限公司; 甲基叔丁基醚 (分析纯)、乙酸铵 (分析纯)、高效液相色谱纯丙酮和甲醇, Sigma-Aldrich (中国, 上海); 己烷 (分析纯)、乙醚 (分析纯), 上海麦克林生化有限公司; 氯化钠、无水硫酸钠, 成都市科隆化学制品有限公司。

## 1.2 仪器与设备

Agilent 1290 infinity II 超高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Bruker Impact II 四级杆飞行时间质谱仪 (具有 Bruker Compass DataAnalysis 5.1 数据处理软件), 德国 Bruker 公司; Vortex-2 涡旋混匀仪, 上海沪析实业有限公司; 离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; KQ5200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; DW-HL398 超低温冷冻储存箱, 中科美菱低温科技股份有限公司; BSA124S 分析天平, 德国 Sartorius 公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 人乳叶黄素及叶黄素酯的提取

参考 Rios 等<sup>[4]</sup>和 Xavier 等<sup>[10]</sup>的方法并加以修改, 准确量取 2.5 mL 人乳与 5 mL 甲醇进行涡旋混合 2 min, 并置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下冷冻 20 min, 将冷冻后的混合物在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 9 500 r/min 条件下离心 5 min, 弃去上层。将 5 mL 乙醚与 2 mL 己烷加入到下层沉淀中, 并进行涡旋混合 2 min。之后加入 5 mL 质量分数为 10% 的 NaCl 溶液, 并再次进行涡旋混合 2 min。接着在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 9 500 r/min 条件下离心 5 min, 得到有机相并再重复提取一次。合并两次提取的有机相溶液, 在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  下减压旋转挥干, 用 0.5 mL  $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{甲基叔丁基醚}}=8:2$  的混合溶剂溶解并过滤 ( $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ), 储存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下用于后续分析。

### 1.3.2 UPLC/Q-TOF-MS 的检测条件

参考课题组已经建立的条件<sup>[11-13]</sup>并加以改进, 利用 UPLC/Q-TOF-MS 对叶黄素及其酯类进行检测, 其中 UPLC 采用配备了自动进样系统和二级管阵列检测器 (Diode Array Detector, DAD) 的 Agilent 1290 型号。分析柱为  $2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$  的 C18 柱 (Poroshell 120,  $1.9\text{ }\mu\text{m}$ ), 并配备了具有相同材质的保护柱。参考实验室已经建立的分析脂溶性化合物的方法<sup>[14]</sup>来进行分析检测。流动相 A 为  $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=8:2$  的混合液, 流动相 B 为  $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{丙酮}}=1:1$  的混合液, 向两流动相中分别加入 10 mmol/L 的乙酸铵溶液, 设定 UPLC 的流速为 0.2 mL/min。采用 0~15 min, 25% B~100% B; 15~20 min, 100% B; 20~25 min, 25% B 的程序进行梯度洗脱。DAD 探测器记录的信号波长范围为 190~800 nm, 用于辅助鉴定叶黄素及其酯类。

MS 采用大气压化学电离源 (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI), 在正离子模式 (APCI<sup>+</sup>) 下分析叶黄素及其酯类, 该模式下的参数: APCI 的加热温度为  $460\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 质量范围为 70~2 900  $m/z$ , 采用高纯度氮气分别进行雾化和干燥, 其中雾化气流速为 3 Bar, 干燥气流速为 8 L/min, 干燥气温度为  $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。毛细管电压为 3 700 V, 末端平板电压为 450 V, 裂解能量为 10 eV。

### 1.3.3 人乳中叶黄素及叶黄素酯的测定

采用 UPLC-DAD 联合质谱技术对人乳中的叶黄素及叶黄素酯的种类和含量进行测定, 通过 UPLC 分离人乳脂质样品中所含有的各种物质 (包括叶黄素、叶黄素酯、其他脂质及杂质成分), 通过与标准品的保留时间、质谱  $[M+H]^+$  精确质荷比、UV 峰型等进行比对, 最终确定叶黄素及叶黄素酯的种类并利用相应的质谱峰面积确定其含量, 具体操作方法如下:

首先配制叶黄素标准溶液, 参考实验室已有的方法<sup>[12-14]</sup>并加以改进, 准确称取 10 mg 叶黄素标准品, 加入一定量  $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{甲基叔丁基醚}}=8:2$  的混合溶剂进行溶解并共同定容至 10 mL, 得到质量浓度为 1 000 mg/L 的叶黄素标准品溶液, 之后将此标准溶液进行梯度稀释, 最终得到质量浓度分别为 3~800  $\mu\text{g/L}$  的系列标准溶液。之后配制混合叶黄素酯标准溶液, 采用已经定性确定的、可以购买到的商用高纯度 (纯度 $\geq 98\%$ ) 叶黄素二棕榈

酸酯、叶黄素棕榈酸-硬脂酸酯和叶黄素肉豆蔻酸-棕榈酸酯这三种标准品,按照等比例混合,将该混合叶黄素酯作为所有叶黄素酯定量所用的标准品。分别准确称取这三种叶黄素酯标准品各5 mg,用 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{甲基叔丁基醚}}=8:2$ 的混合溶剂溶解后共同定容至15 mL,配制成质量浓度为1 000 mg/L的混合叶黄素酯标准溶液,并将此溶液进行梯度稀释配制成质量浓度为3~300  $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准溶液。将配制好的一系列不同浓度的叶黄素标准溶液和混合叶黄素酯标准溶液通过UPLC进样分析。以叶黄素标准品的质谱峰面积为横坐标,对应的质量浓度( $\mu\text{g/L}$ )为纵坐标绘制标准曲线,得到回归方程和判定系数;以三种叶黄素酯标准品的质谱峰面积之和为横坐标,对应的质量浓度( $\mu\text{g/L}$ )为纵坐标绘制标准曲线,得到回归方程和判定系数。

考察方法的准确性和精密性:根据信噪比(S/N)为3确定方法检出限(Limits of Detection, LOD)以及信噪比(S/N)为10确定方法定量限(Limits of Quantification, LOQ);通过样品加标考察方法的准确性,通过日内连续进样及日间连续进样方法考察方法的精确性。

#### 1.4 数据统计分析

对每个人乳样品进行两次分析检测,其中叶黄素直接根据所获标准曲线进行定量测定,而对于叶黄素酯则为相对定量测定,各种叶黄素酯均统一采用混合叶黄素酯标准曲线进行定量,最终得到人乳中叶黄素和各种叶黄素酯的含量。研究所得液相色谱、质谱数据均采用Bruker Compass Data Analysis 5.1软件进行分析,包括色谱峰保留时间和积分面积、信噪比、相对分子质量等,采用Excel软件对实验数据进行初步整理,实验结果采用Origin 2018软件绘图,叶黄素化学结构式采用ChemDraw 19.0软件绘制,采用SPSS 26.0统计分析软件对实验数据进行单因素方差分析和相关性分析, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 采用UPLC/Q-TOF-MS测定人乳中叶黄素及叶黄素酯

#### 2.1.1 方法学评价

在评价方法的准确性和精密性方面,通过标

准品回添方法,运用回收率研究以验证方法的准确性,运用相对标准偏差(RSD)以证明精密性<sup>[14]</sup>。最终测得叶黄素及混合叶黄素酯在加标浓度范围为50~500  $\mu\text{g/L}$ 的回收率介于80%~110%,UPLC/Q-TOF-MS方法分析的日内RSD( $n=5$ )和日间RSD( $n=3$ )均小于10%,可知该方法的准确性和精密性均良好。Zoccali等<sup>[6]</sup>采用超临界萃取-超临界色谱-质谱联用(Supercritical Fluid Extraction-supercritical Fluid Chromatography-tandem Massspectrometry, SFE-SFC-MS)分析了初乳中的类胡萝卜素和类胡萝卜素酯,由于提取和分离方式不同,与本研究的检测结果有所差异。此外,叶黄素及叶黄素酯在提取检测过程中会受到有机溶剂及用量、提取温度、提取时间等的影响<sup>[16]</sup>,本研究所采用的UPLC/Q-TOF-MS方法可以依据保留时间和精确分子质量等对检测物进行测定<sup>[17]</sup>,具有更高的检测灵敏度和分离度,对数据的分析也更准确、全面。

通过UPLC/Q-TOF-MS对人乳样品中的叶黄素及叶黄素酯进行测定,得到叶黄素和混合叶黄素酯的标准曲线及相应参数见表1。

#### 2.1.2 人乳中叶黄素及叶黄素酯的测定

在收集到的150份人乳样品中,由UPLC/Q-TOF-MS技术检测到的叶黄素和叶黄素酯的组成结果见表2,根据各种物质的特征色谱峰型、分子相对质量大小、标准品的相关信息以及在色谱柱中的保留时间等,在人乳样品中分析检测到叶黄素和16种全与中链或长链脂肪酸结合的叶黄素酯,而未检测到与短链脂肪酸结合的叶黄素酯,可能原因是短链脂肪酸可以直接经门静脉进入肝脏,被迅速分解转换为能量,更容易被机体吸收<sup>[18]</sup>,因此能与叶黄素结合的短链脂肪酸的含量甚微。此外,叶黄素亚油酸酯和叶黄素油酸酯是仅有的单分子脂肪酸与羟基结合的叶黄素酯,其余的均为两分子脂肪酸与叶黄素结合的酯类。Zoccali等<sup>[6]</sup>在初乳中检测到了10种类胡萝卜素酯,酯化形式的出现可能与更稳定的储存条件有关。

人乳中的叶黄素能与游离脂肪酸结合形成叶黄素酯,而叶黄素酯也能在人体内代谢转化为叶黄素,因此人乳中叶黄素酯的含量可能与叶黄素的含量具有一定的相关性。对150份人乳样品中叶黄素与叶黄素酯含量之间的相关性进行分析,分析结果见表3。可知人乳中叶黄素与叶黄素酯

含量之间的皮尔逊相关系数为 0.721, 即两者的含量之间呈较强的正相关关系, 表明人乳中叶黄素酯的含量随着叶黄素含量的变化而变化。脂肪酸易与带有羟基的叶黄素结合发生酯化, 虽然叶黄

素酯会在小肠肠腔中被去酯化, 但一些酰基转移酶可以将其进行再酯化, 从而升高叶黄素酯的含量, 并且酯化形式的出现有利于叶黄素更稳定地存在于人乳中<sup>[4, 6]</sup>。

表 1 叶黄素和叶黄素酯的标准曲线及相应参数

Table 1 Standard curves and corresponding parameters of lutein and lutein esters

物质	标准曲线	线性范围	判定系数 $R^2$	检出限 (LOD)	定量限 (LOQ)
叶黄素	$y=2.1224x-8.1689$	3~800 $\mu\text{g/L}$	0.9993	0.9 $\mu\text{g/L}$	3.0 $\mu\text{g/L}$
叶黄素酯	$y=0.0025x+1.7376$	3~300 $\mu\text{g/L}$	0.9915	0.8 $\mu\text{g/L}$	2.7 $\mu\text{g/L}$

注: 表中标准曲线里的  $y$  分别对应叶黄素和叶黄素酯的质量浓度 ( $\mu\text{g/L}$ ),  $x$  分别对应叶黄素和叶黄素酯的质谱峰面积。

表 2 人乳中叶黄素及叶黄素酯的组成

Table 2 Composition of lutein and lutein esters in human breast milk

化合物	保留时间 /min	分子式	理论分子量	观测离子 $m/z$	观测离子 $[M+H]^+$	偏差 ( $\times 10^{-6}$ )	mSigma
叶黄素	7.4	$C_{40}H_{56}O_2$	568.4280	551.4247	$C_{40}H_{55}O[M-H_2O+H]^+$	0.1	5.7
叶黄素亚油酸酯	11.5	$C_{58}H_{86}O_3$	830.6577	831.6670	$C_{58}H_{87}O_3[M+H]^+$	-2.4	40.4
叶黄素油酸酯	12.1	$C_{58}H_{88}O_3$	832.6733	833.6833	$C_{58}H_{89}O_3[M+H]^+$	-3.2	33.1
叶黄素二亚油酸酯	15.0	$C_{76}H_{116}O_4$	1092.8874	1093.8960	$C_{76}H_{117}O_4[M+H]^+$	-1.2	78.3
叶黄素月桂酸-油酸酯	17.4	$C_{70}H_{110}O_4$	1014.8404	1015.8454	$C_{70}H_{111}O_4[M+H]^+$	2.3	32.8
叶黄素肉豆蔻酸-亚油酸酯	17.6	$C_{72}H_{112}O_4$	1040.8561	1041.8606	$C_{72}H_{113}O_4[M+H]^+$	2.7	18.5
叶黄素棕榈酸- $\alpha$ -亚麻酸酯	17.7	$C_{74}H_{114}O_4$	1066.8717	1067.8750	$C_{74}H_{115}O_4[M+H]^+$	3.7	33.7
叶黄素亚油酸-油酸酯	18.2	$C_{76}H_{118}O_4$	1094.9030	1095.9072	$C_{76}H_{119}O_4[M+H]^+$	2.8	23.1
叶黄素肉豆蔻酸-油酸酯	18.3	$C_{72}H_{114}O_4$	1042.8717	1043.8755	$C_{72}H_{115}O_4[M+H]^+$	3.4	17.2
叶黄素棕榈酸-亚油酸酯	18.4	$C_{74}H_{116}O_4$	1068.8874	1069.8911	$C_{74}H_{117}O_4[M+H]^+$	3.3	18.8
叶黄素肉豆蔻酸-棕榈酸酯	18.5	$C_{70}H_{112}O_4$	1016.8561	1017.8628	$C_{70}H_{113}O_4[M+H]^+$	0.5	33.1
叶黄素棕榈酸-油酸酯	19.1	$C_{74}H_{118}O_4$	1070.9030	1071.9073	$C_{74}H_{119}O_4[M+H]^+$	2.8	21.6
叶黄素二棕榈酸酯	19.3	$C_{72}H_{116}O_4$	1044.8874	1045.8904	$C_{72}H_{117}O_4[M+H]^+$	4.0	49.0
叶黄素二油酸酯	19.6	$C_{76}H_{120}O_4$	1096.9187	1097.9221	$C_{76}H_{121}O_4[M+H]^+$	3.5	27.9
叶黄素硬脂酸-油酸酯	20.1	$C_{76}H_{122}O_4$	1098.9343	1099.9373	$C_{76}H_{123}O_4[M+H]^+$	3.9	26.1
叶黄素棕榈酸-硬脂酸酯	20.2	$C_{74}H_{120}O_4$	1072.9187	1073.9214	$C_{74}H_{121}O_4[M+H]^+$	4.2	59.5
叶黄素二硬脂酸酯	21.6	$C_{76}H_{124}O_4$	1100.9500	1101.9532	$C_{76}H_{125}O_4[M+H]^+$	3.6	23.7

注: 表中 mSigma 表示相对同位素丰度的观察值和理论值间的偏差, 其值越小表示偏差越小<sup>[19, 20]</sup>。

表 3 人乳中叶黄素和叶黄素酯的相关性分析

Table 3 Analysis of the correlation between lutein and lutein esters in human breast milk

	叶黄素	叶黄素酯
皮尔逊相关性	1	0.721**
叶黄素 显著性 (双尾)		0.000
个案数	150	150
皮尔逊相关性	0.721**	1
叶黄素酯 显著性 (双尾)	0.000	
个案数	150	150

注: \*\* 在 0.01 级别 (双尾), 相关性显著。

## 2.2 乳汁中叶黄素及叶黄素酯在不同分娩年龄人群间的分布差异

由于生育政策调整以及女性生育观念改变等因素的影响, 女性的生育年龄逐渐增高已成为普遍现象<sup>[7, 8]</sup>。通常, 高龄产妇是指分娩年龄满 35 周岁的产妇, 其数量也呈现上升趋势<sup>[7, 21]</sup>。将分娩年龄 < 35 岁产妇所分泌的乳汁分为适龄组, 将分娩年龄 ≥ 35 岁产妇所分泌的乳汁分为高龄组<sup>[22]</sup>。图 2 为不同分娩年龄人群乳汁中叶黄素及叶黄素酯含量间的分布差异, 可知适龄组乳汁中叶黄素和叶黄素酯的含量与高龄组相近, 两者之间的差异并不显著 ( $P > 0.05$ ), 说明分娩年龄对人乳中叶黄素及叶黄素酯含量的影响较小。同时人乳成分会受到多种因素的影响, 包括乳母饮食、生活环境和方式、健康状况等<sup>[23]</sup>, 而膳食叶黄素摄入量的增加会导致母乳中叶黄素含量的增加, 因此鼓励育龄妇女在怀孕期间和产后增加富含叶黄素的蔬菜和水果的饮食摄入量<sup>[24]</sup>。

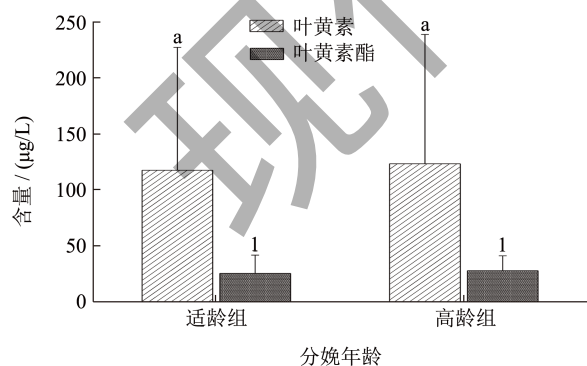


图 2 不同分娩年龄人群乳汁中叶黄素和叶黄素酯的含量

Fig.2 Contents of lutein and lutein esters in human breast milk of different childbearing ages

注: 图中误差棒上方的相同字母和数字分别表示不同分娩年龄人群乳汁中叶黄素和叶黄素酯含量之间不具有差异显著 ( $P > 0.05$ )。

## 2.3 人乳中叶黄素及叶黄素酯在不同泌乳期的含量分布

### 2.3.1 叶黄素及叶黄素酯含量的总体分布

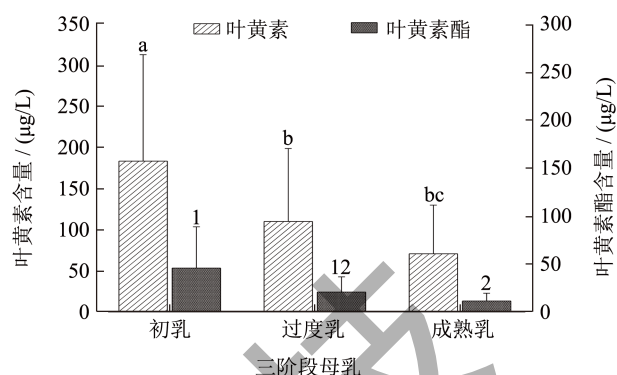


图 3 不同泌乳期人乳中叶黄素及叶黄素酯的含量

Fig.3 Contents of lutein and lutein esters in human breast milk in different lactation periods

注: 图中误差棒上方的不同字母和数字分别表示不同泌乳阶段人乳中叶黄素和叶黄素酯含量之间具有差异显著 ( $P < 0.05$ )。

人乳中叶黄素及叶黄素酯的总体含量在不同泌乳期的分布结果见图 3。由图可知, 随着泌乳期的延长, 人乳中叶黄素的含量逐渐降低, 这与 Song 等<sup>[25]</sup>的研究结果相一致。初乳中叶黄素的含量最高, 可能是因为初乳是新生儿出生后最初几天的唯一食物形式<sup>[6]</sup>, 初乳中的叶黄素对新儿的生长发育特别重要<sup>[26]</sup>, 并且乳母血浆中叶黄素的水平在怀孕期间持续升高<sup>[5]</sup>, 泌乳开始时达到最大值。之后叶黄素的含量逐渐降低是因为初生婴儿的生长发育需要较多的叶黄素, 而在连续泌乳的过程中, 叶黄素可以从乳母体内被有效地分泌进入乳中从而被婴儿吸收<sup>[4]</sup>。孙涵潇等<sup>[27]</sup>报道了在 612 例成熟乳样本中叶黄素的中位数含量约为 70.23  $\mu\text{g/L}$ ; Schweigert 等<sup>[28]</sup>报道了初乳中叶黄素的平均含量水平为 164.0  $\text{nmol/L}$ , 成熟乳中叶黄素的平均含量水平为 88.1  $\text{nmol/L}$ ; Sun 等<sup>[26]</sup>报道了初乳中叶黄素的质量浓度为 104.06  $\mu\text{g/L}$ , 过渡乳中叶黄素的质量浓度为 119.27  $\mu\text{g/L}$ , 成熟乳中叶黄素的质量浓度为 70.73  $\mu\text{g/L}$ 。而在本研究中, 初乳的叶黄素含量最高, 平均含量可达 183.78  $\mu\text{g/L}$ , 过渡乳的叶黄素平均含量为 110.28  $\mu\text{g/L}$ , 成熟乳的叶黄素平均含量为 70.87  $\mu\text{g/L}$ , 与文献中的研究结果大致相符合。对不同泌乳期的叶黄素含量进行单因素方差分析, 结果表明在 95% 的置信度下, 叶黄素含量在不同泌乳期间的差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ), 进一步分析组间的

差异,发现叶黄素含量在过渡乳和成熟乳间的差异并不显著,而在初乳与过渡乳间、初乳与成熟乳间均存在显著差异( $P<0.05$ )。同时对于叶黄素酯,其含量具有很大的个体差异性,在一部分人乳样品中甚至未检测到叶黄素酯的存在。初乳中叶黄素酯的平均含量最高,可达 $45.89\ \mu\text{g/L}$ ,过渡乳中叶黄素酯的平均含量为 $20.79\ \mu\text{g/L}$ ,成熟乳中叶黄素酯的平均含量为 $11.48\ \mu\text{g/L}$ 。Ríos等<sup>[4]</sup>研究发现人初乳中约三分之一的叶黄素被酯化,本研究结果与之大致相符合。并且随着泌乳期的延长,叶黄素酯的含量也逐渐降低,符合表3中的相关性分析结果,也与Ríos等<sup>[4]</sup>的研究结果中叶黄素酯存在于初乳并且在随后的哺乳期中逐渐下降的结论是一致的。进一步分析不同泌乳阶段人乳中叶黄素酯含量间的组间差异,发现叶黄素酯含量仅在初乳和成熟乳间具有显著差异( $P<0.05$ )。

不同个体中叶黄素和叶黄素酯的含量均存在较大的差异,这是因为人乳具有多样性和独特性,人乳脂存在较大的个体内差异和个体间差异<sup>[29]</sup>。由于人体不能合成叶黄素,只能从食物中获得,因此人乳中的叶黄素浓度与乳母的叶黄素摄入量呈正相关<sup>[26]</sup>。膳食叶黄素的摄入量随时间增加,而这种增加可能受到乳母个体差异、膳食习惯、生理状态、营养状况以及生存地理环境等的影响<sup>[30-32]</sup>。

### 2.3.2 叶黄素酯含量的具体分布

通过UPLC/Q-TOF-MS进一步分析不同泌乳阶段人乳中叶黄素酯的具体分布,发现过渡乳中所含叶黄素酯的种类最多,共有14种,初乳中含有10种,成熟乳中含有6种。图4表示这16种叶黄素酯在人乳中的具体含量分布。在初乳叶黄素酯中,叶黄素棕榈酸-硬脂酸酯的含量最高,平均含量为 $45.63\ \mu\text{g/L}$ ;在过渡乳叶黄素酯中,叶黄素棕榈酸-

油酸酯的含量最高,平均含量为 $20.60\ \mu\text{g/L}$ ;在成熟乳叶黄素酯中,叶黄素硬脂酸-油酸酯的含量最高,平均含量为 $10.96\ \mu\text{g/L}$ 。在所有的叶黄素酯中,叶黄素棕榈酸-硬脂酸酯的含量是整个泌乳期中最高的,叶黄素二硬脂酸酯的含量次之。在不同泌乳期的人乳中均检测到叶黄素亚油酸-油酸酯、叶黄素棕榈酸-亚油酸酯、叶黄素二棕榈酸酯、叶黄素二油酸酯以及叶黄素二硬脂酸酯这五种叶黄素酯。Ríos等<sup>[4]</sup>在研究中发现泌乳初始阶段含有叶黄素酯,而成熟的乳汁中则不具有这些化合物。但本研究在成熟乳中仍检测到了少量的叶黄素亚油酸-油酸酯、叶黄素棕榈酸-亚油酸酯、叶黄素二棕榈酸酯、叶黄素二油酸酯、叶黄素硬脂酸-油酸酯和叶黄素二硬脂酸酯,其中叶黄素硬脂酸-油酸酯的含量最高( $10.96\ \mu\text{g/L}$ ),这与乳母自身的生理状况、所处的环境、地理位置以及饮食习惯等均有关,也因检测技术和检测精确度的不同而存在一定的差异<sup>[27]</sup>。

人乳脂中含量最丰富的脂肪酸为棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸,它们在总脂肪酸中占有很大的比重<sup>[33]</sup>,本研究检测出了含量较为丰富的由这四种脂肪酸组合搭配形成的叶黄素酯。其中棕榈酸是人乳中含量最高的饱和脂肪酸,油酸是质量分数最高的单不饱和脂肪酸<sup>[18]</sup>,这两种脂肪酸形成的叶黄素棕榈酸-油酸酯的含量较高( $30.52\ \mu\text{g/L}$ )。此外,叶黄素酯及对应的脂肪酸组成在很大程度上决定了人乳脂的营养功能和理化性质,如游离的棕榈酸很容易与钙、镁等离子反应形成不溶性皂化盐,造成婴幼儿体内能量和矿物质的流失,从而导致婴幼儿便秘、腹泻<sup>[34]</sup>,因此棕榈酸更趋向于与叶黄素结合形成叶黄素酯而被固定下来,与此同时,硬脂酸可以降低胆固醇的吸收以及血清、肝脏中胆固醇的含量<sup>[35]</sup>,这两种脂肪酸所形成的叶黄素棕榈酸-硬脂酸酯在整个泌乳期中的含量最高。

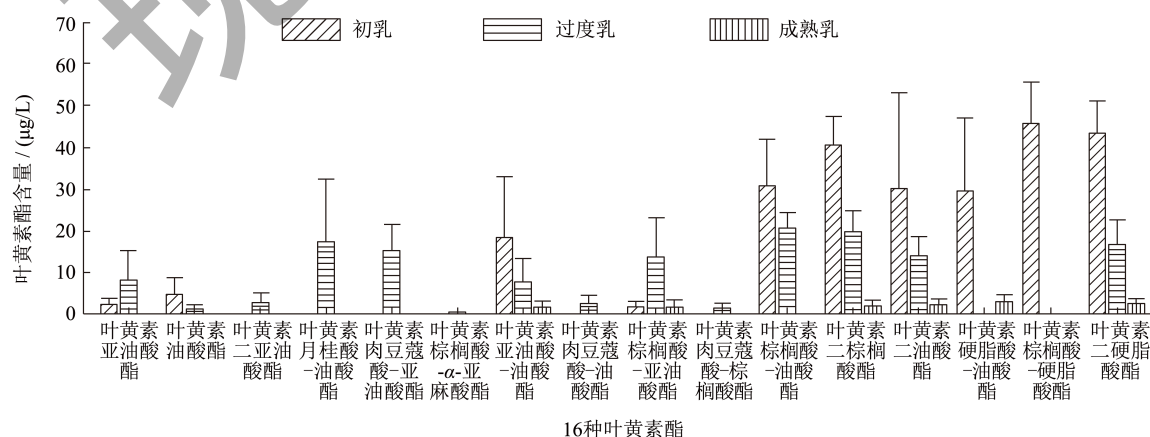


图4 不同泌乳期人乳中各种叶黄素酯的含量

Fig.4 Contents of various lutein and lutein esters in human breast milk in different lactation periods

### 3 结论

本研究利用 UPLC/Q-TOF-MS 对 150 份不同分娩年龄和泌乳阶段的人乳样品中叶黄素和叶黄素酯的组成和含量进行测定, 该方法的准确性和精密性均良好, 且具有更高的检测速度、检测灵敏度和分离度。最终在三个阶段的人乳中检出一定量的叶黄素和 16 种全与中链或长链脂肪酸结合的叶黄素酯。研究发现适龄组(分娩年龄 $<35$ 岁)乳汁中叶黄素和叶黄素酯的含量与高龄组(分娩年龄 $\geq 35$ 岁)相近, 两者之间的差异并不显著( $P>0.05$ ), 可知分娩年龄对人乳中叶黄素及叶黄素酯含量的影响较小。在三个阶段的人乳中, 初乳叶黄素和叶黄素酯的平均含量均最高, 分别为  $183.78 \mu\text{g/L}$  和  $45.89 \mu\text{g/L}$ 。随着泌乳期的延长, 叶黄素和叶黄素酯的含量均逐渐下降, 并且通过相关性分析发现两者之间呈较强的正相关关系, 对应的皮尔逊相关系数为 0.721, 表明叶黄素酯的含量随着叶黄素含量的变化而变化。初乳中含 10 种叶黄素酯, 叶黄素棕榈酸-硬脂酸酯的平均含量最高 ( $45.63 \mu\text{g/L}$ ); 过渡乳中含 14 种叶黄素酯, 叶黄素棕榈酸-油酸酯的平均含量最高 ( $20.60 \mu\text{g/L}$ ); 此外在成熟乳中还检测出了 6 种叶黄素酯, 其中叶黄素硬脂酸-油酸酯的平均含量最高 ( $10.96 \mu\text{g/L}$ )。在所有的叶黄素酯中, 叶黄素棕榈酸-硬脂酸酯的含量最高 ( $45.63 \mu\text{g/L}$ ), 叶黄素二硬脂酸酯的含量次之 ( $43.15 \mu\text{g/L}$ )。本研究可为婴幼儿配方乳粉的制作和添加提供一定的科学依据。

### 参考文献

- [1] 马少杰. 婴幼儿配方奶粉中叶黄素的稳定性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
- [2] 姚志楠. 液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中叶黄素含量方法优化[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
- [3] GAZZOLO D, PICONE S, GAIERO A, et al. Early pediatric benefit of lutein for maturing eyes and brain-an overview [J]. *Nutrients*, 2021, 13(9): 1-26.
- [4] RIOS J J, ODORISSI X A A, DIAZ-SALIDO E, et al. Xanthophyll esters are found in human colostrum [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(10): 1-9.
- [5] DIANE E.ALEXANDER, BRANDON L, SHEILA D. 叶黄素是有益于孕妇和婴幼儿的重要类胡萝卜素[C]//2013 中国乳制品工业协会第十九次年会论文集. *Kemin Foods L.C., Human Nutrition and Health*, 2013: 150-156.
- [6] ZOCCALI M, GIUFFRIDA D, GRANESE R, et al. Determination of free apocarotenoids and apocarotenoid esters in human colostrum [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(6): 1335-1342.
- [7] 郑思思, 余莉, 唐雨欣, 等. 2016-2021年成都市某三甲妇产儿童医院产妇年龄及妊娠并发症变化趋势[J]. *职业卫生与病伤*, 2023, 38(3): 131-136.
- [8] 赵姗, 马旭媛, 李雅丽, 等. 女性分娩年龄对妊娠结局的影响[J]. *河北医药*, 2019, 41(21): 3336-3340.
- [9] 谢恩萍, 步军, 李菁, 等. 不同保存条件对母乳的影响[J]. *临床儿科杂志*, 2012, 30(3): 212-215.
- [10] XAVIER A A O, DIAZ-SALIDO E, ARENILLA-VELEZ I, et al. Carotenoid content in human colostrum is associated to preterm/full-term birth condition [J]. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1-12.
- [11] 张淑红, 王龙琼, 丁德胜, 等. 母乳中胆固醇及胆固醇酯分布规律研究[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(2): 218-225.
- [12] 李韵唱, 王龙琼, 何小玲, 等. 母乳中 $\beta$ -胡萝卜素、维生素A及维生素A酯分布规律研究[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(14): 80-87.
- [13] 丁德胜, 王龙琼, 何小玲, 等. 基于UPLC/Q-TOF-MS技术分析人乳中维生素D及其酯类分布规律[J]. *食品科学*, 2023, 44(10): 324-331.
- [14] CHEN K, ROCA M. Cooking effects on bioaccessibility of chlorophyll pigments of the main edible seaweeds [J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 101-109.
- [15] AGARRY I E, DING D S, LI Y C, et al. *In vitro* bioaccessibility evaluation of chlorophyll pigments in single and binary carriers [J]. *Food Chemistry*, 2023, 415: 135757.
- [16] 顾佳缘, 王琰, 胡慧敏, 等. 基于HPLC-DAD法及响应曲面法的稻谷叶黄素含量测定方法研究[J]. *粮食科技与经济*, 2018, 43(8): 52-59.
- [17] 赵森, 吴小军, 赵鹏, 等. UPLC-Q-TOF/MS法在毒物检测领域应用研究进展[J]. *中国法医学杂志*, 2021, 36(5): 524-527.
- [18] 李琳瑶, 华家才, 康巧娟, 等. 婴儿配方奶粉中脂肪酸的研究[J]. *中国乳品工业*, 2022, 50(6): 39-43.
- [19] CHEN K, RIOS J J, PEREZ G A, et al. Development of an accurate and high-throughput methodology for structural comprehension of chlorophylls derivatives. (I) Phytolated derivatives [J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1406: 99-108.
- [20] CHEN K, RIOS J J, ROCA M, et al. Development of an accurate and high-throughput methodology for structural comprehension of chlorophylls derivatives. (II) Dephytolated derivatives [J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1412: 90-99.
- [21] 张艳, 蒋健. 孕妇年龄对分娩方式和新生儿影响的研究[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(24): 5781-5783.
- [22] 孙霆芳, 赵环宇. 产妇分娩年龄对新生儿出生后的影



- 响[J].中国妇幼保健,2017,32(12):2570-2571.
- [23] 刘婵,王丽,窦亚兰,等.早产儿母乳宏量营养素和总能量横断面调查[J].中国循证儿科杂志,2021,16(4):301-305.
- [24] ZHANG Y, YANG J, HUANG N, et al. Changes in breast milk lutein concentrations and their associations with dietary lutein intake: a 12-week prospective analytical study [J]. *British Journal of Nutrition*, 2019, 122(9): 1033-1039.
- [25] SONG B J, JOUNI Z E, FERRUZZI M G. Assessment of phytochemical content in human milk during different stages of lactation [J]. *Nutrition*, 2013, 29(1): 195-202.
- [26] SUN H, WU T, MAO Y, et al. Carotenoid profile in breast milk and maternal and cord plasma: a longitudinal study in Southwest China [J]. *British Journal of Nutrition*, 2021, 126(9): 1281-1287.
- [27] 孙涵潇,毛颖异,杨希娟,等.中国六地区成熟母乳中类胡萝卜素含量研究[J].营养学报,2019,41(6):534-538.
- [28] SCHWEIGERT F J, BATHE K, CHEN F, et al. Effect of the stage of lactation in humans on carotenoid levels in milk, blood plasma and plasma lipoprotein fractions [J]. *European Journal of Nutrition*, 2004, 43(1): 39-44.
- [29] MARINCOLA F C, DESSI A, CORBU S, et al. Clinical impact of human breast milk metabolomics [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 451: 103-106.
- [30] TUCKER K L, CHEN H L, VOGEL S, et al. Carotenoid intakes, assessed by dietary questionnaire, are associated with plasma carotenoid concentrations in an elderly population [J]. *Journal of Nutrition*, 1999, 129(2): 438-445.
- [31] MENESES F, TRUGO N. Retinol,  $\beta$ -carotene, and lutein +zeaxanthin in the milk of Brazilian nursing women: associations with plasma concentrations and influences of maternal characteristics [J]. *Nutrition Research*, 2005, 25(5): 443-451.
- [32] 董彩霞,王晖,荫士安.人乳微生物组学[J].中国妇幼健康研究,2020,31(8): 989-995.
- [33] 黄卓能,程昕祎,赵昕辰,等.母乳脂化学组成的研究进展[J].中国油脂,2021,46(5):63-70.
- [34] LOPEZ L A, CASTELLOTE B A I, CAMPOY F C, et al. The influence of dietary palmitic acid triacylglyceride position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces [J]. *Early Human Development*, 2001, 65: S83-S94.
- [35] 程立坤,陈浩,王国泽.母乳中脂肪酸组成研究进展[J].现代食品,2020,23:4-11.