



## 南极磷虾油中磷脂型脂肪酸的测定方法优化及应用

王诗淼<sup>1,2</sup>, 杨春雨<sup>1,2</sup>, 赵琪<sup>1,2\*</sup>, 李健<sup>1,2</sup>

(1. 大连工业大学食品学院, 辽宁 大连 116034;

2. 大连工业大学, 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁 大连 116034)

**摘要:** 南极磷虾营养价值高, 因富含必需氨基酸、磷脂、虾青素和多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 而具有良好的开发价值。目前, 对南极磷虾及其制品脂肪酸含量的分析主要集中在总脂肪酸含量的测定, 由于 PUFAs 不同酯的结合会影响其生物利用度, 因此, 有必要对南极磷虾不同类型酯的脂肪酸含量进行准确定量。为了明确南极磷虾油中磷脂 (PL) 型脂肪酸含量, 基于固相萃取建立南极磷虾油中 PL 型脂肪酸含量的气相色谱分析方法。通过优化各实验条件, 在最优条件下通过本方法测得的加标回收率在 84.22%~94.45%, 日内和日间精密度在 0.79%~6.09% 之间。将本方法应用在测量南极磷虾油在贮藏过程中 PL 型脂肪酸的含量变化中, 结果表明, 在 21 d 贮藏过程后, PL 型脂肪酸含量均下降, 且降解率随温度升高而增加。本研究为南极磷虾脂质研究提供了方法学支持。

**关键词:** 南极磷虾; 磷脂; 多不饱和脂肪酸; 固相萃取; 气相色谱

**中图分类号:** TS 254.5; S 985

**文献标志码:** A

南极磷虾 (*Euphausia superba*) 属于磷虾科 (Euphausiidae) 磷虾属 (*Euphausia*)<sup>[1-2]</sup>。南极磷虾产量巨大, 2018 年捕捞量为 312 989 t<sup>[3-4]</sup>。磷虾富含蛋白质、脂类、必需氨基酸和多种矿物质元素。此外, 它还含有磷酸化肽、虾青素酯和其他功能性食品成分<sup>[5-7]</sup>。南极磷虾已被开发为磷虾油, 并被列为健康食品和膳食补充剂<sup>[8-9]</sup>, 因营养价值高, 产量多而备受关注<sup>[10-11]</sup>。

南极磷虾较其他海洋生物来说脂质营养功能活性较为突出<sup>[12-13]</sup>, 也是含有多不饱和脂肪酸的水生磷脂的丰富来源。但由于南极磷虾中脂质组成复杂, 不同的脂质组成和含量会影响南极磷虾的品质和营养价值, 因此, 分离组分并分析其含量和组成是非常有必要的。

而在各种类型酯中, 磷脂 (PL) 是细胞膜和细

胞器膜的主要成分, 可以分成鞘磷脂和甘油磷脂两大类。其中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇为海洋生物中甘油磷脂主部分。PL 的种类及含量决定着生物膜的状态、功能以及细胞活性, 从而决定了机体的新陈代谢能力、免疫能力和自我恢复能力等<sup>[14]</sup>。目前, 国内对于南极磷虾脂质组成的变化研究都集中在对各类型酯的含量、脂肪酸总量和氧化水解指标, 如过氧化值和酸值等<sup>[15-16]</sup>, 因此有必要对不同类型的酯, 尤其是 PL 型脂肪酸的种类和含量进行分析。

因此, 本研究基于固相萃取方法建立南极磷虾中 PL 型脂肪酸含量的气相色谱 (GC) 分析方法, 通过优化上样量、洗脱体积和洗脱溶剂种类并通过加标回收率和精密度对方法进行验证。将该方

收稿日期: 2021-11-30 修回日期: 2022-02-12

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1406805)

第一作者: 王诗淼 (照片), 从事海洋功能性油脂的开发及利用研究, E-mail: 767658557@qq.com

通信作者: 赵琪, 从事海洋功能性油脂的开发及利用研究, E-mail: zhaqiqi@dlpu.edu.cn



法应用在贮藏南极磷虾油中,探究贮藏温度对南极磷虾油中 PL 型脂肪酸变化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

南极磷虾油由辽宁省大连海洋渔业集团公司提供,并于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存,于2020年8月17日产。

分析级的无水乙醚、乙酸乙酯、正己烷、甲醇和氯仿购买于天津市科密欧化学试剂有限公司;分析级的正庚烷、冰乙酸和甲酸购买于天津市大茂化学试剂厂;色谱级的正己烷和二硬脂酰磷脂酰胆碱购买于北京百灵威科技有限公司;色谱级的14%三氟化硼-甲醇、1,2-双二十二碳酰基-Sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二油酰-Sn-甘油-3-磷酸乙醇胺购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Cleanert  $\text{NH}_2$  氨基固相萃取柱(500.0 mg, 3.0 mL),购买于天津博纳艾杰尔科技有限公司。

### 1.2 实验方法

**脂质组分的分离与衍生化** 使用4.0 mL 正己烷活化 Cleanert  $\text{NH}_2$  氨基固相萃取柱(500.0 mg, 3.0 mL),将体积为1.0 mL,浓度为10.0 mg/mL 用正己烷配置的虾油以流速1.0 mL/min 上样,用4.0 mL 正己烷-乙醚(85:15, 体积比),4.0 mL 正己烷-乙酸乙酯(15:85, 体积比)和4.0 mL 乙酸-乙醚溶液(2:98, 体积比)淋洗后,使用3.0 mL 的正己烷洗脱,得到含有 PL 的溶液,收集洗脱液,氮吹至近干,用正己烷复溶至1.0 mL,进行后续分析。

参照 GB 5009.168 中脂肪酸的甲酯化方法略有改动,在含有 PL 的洗脱液中加入2.0 mL 0.5 mol/L NaOH 甲醇溶液,连接回流冷凝器, $80^{\circ}\text{C}$  水浴上回流,直至油滴消失。从回流冷凝器上端加入2.0 mL,14%三氟化硼甲醇溶液,继续回流2 min。停止加热,从水浴上取下烧瓶,迅速冷却至室温。加入1.5 mL 正己烷,涡旋2 min,吸取上层正己烷提取溶液至10 mL 离心管中,加入大约0.5~1.0 g 无水硫酸钠,涡旋1 min,静置5 min,吸取上层溶液定容到1.0 mL 至进样瓶中待测定。

**脂肪酸测定** 通过 Agilent 7890B GC 色谱对脂肪酸的组成和含量进行检测。色谱条件:色谱柱为 SP2560 毛细管(100.0 m $\times$ 250.0  $\mu\text{m}$  $\times$ 0.2  $\mu\text{m}$ );进样方式:进样口温度设定为 $220^{\circ}\text{C}$ ,进样量为1.0  $\mu\text{L}$ ,分流比为20:1;载气为氮气。检测器:

火焰离子化(FID)检测器。升温程序为 $120^{\circ}\text{C}$  维持9 min,以 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 $200^{\circ}\text{C}$  维持5 min,随后以 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 $230^{\circ}\text{C}$  维持10 min。脂肪酸甲酯通过比较保留时间和标准品来鉴定,并通过内标法经相对峰面积来计算脂肪酸含量。

**固相萃取实际应用于贮藏虾油** 将质量为(1.0 $\pm$ 0.1) g 的南极磷虾油置于密闭的棕色瓶中,同一种样品分成3份,分别于遮光的 $4^{\circ}\text{C}$  冰箱、 $25^{\circ}\text{C}$  和 $55^{\circ}\text{C}$  烘箱中保持21 d,每隔3 d取一次样品,测定不同贮藏温度的磷虾油中 PL 的含量。

**数据处理** 实验数据均做3次平行检测,数据表示为平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD),并使用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析和独立  $t$  检验分析, $P<0.05$  表示存在显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 固相萃取条件优化

**洗脱液种类** 为了消除在衍生化步骤中不同脂质的互相干扰,因此需要对洗脱液的种类进行优化。不同的洗脱液种类包括正己烷、乙酸-乙醚(2:98, 体积比)、正己烷-乙酸乙酯(15:85, 体积比)、正己烷-乙醚(85:15, 体积比)和氯仿-异丙醇(2:1, 体积比)被用于不同类型脂质成分的洗脱(图1)。结果表明,正己烷-乙醚(85:15, 体积比)可用于洗脱甘油三酯(TAG),而不影响其他脂质的洗脱;而经正己烷-乙酸乙酯(5:85, 体积比)和乙酸-乙醚溶液(2:98, 体积比)溶液洗脱后,洗脱液中分别含有 TAG、甘油二酯(DAG)、甘油一酯(MAG)和 TAG、DAG、MAG 和游离脂肪酸(FFA),因此正己烷-乙酸乙酯(15:85, 体积比)作为 DAG 和 MAG 的淋洗液,乙酸-乙醚溶液(2:98, 体积比)作为 FFA 的淋洗液;而正己烷和氯仿-异丙醇(2:1, 体积比)均可将 TAG、MAG、DAG、FFA 和 PL 洗脱下来,均可作为 PL 的洗脱溶剂,但氯仿-异丙醇(2:1, 体积比)毒性较强,所以最后选择正己烷为 PL 的洗脱溶剂。因此本实验选择正己烷-乙醚(85:15, 体积比),正己烷-乙酸乙酯(15:85, 体积比)和乙酸-乙醚溶液(2:98, 体积比)作为淋洗液,而使用正己烷作为 PL 的洗脱液。

**固相萃取柱最大上样量** 首先优化固相萃取柱容量,商业化固相萃取柱(500.0 mg, 3.0 mL)被应用于不同质量南极磷虾油(10.0~30.0 mg)的萃

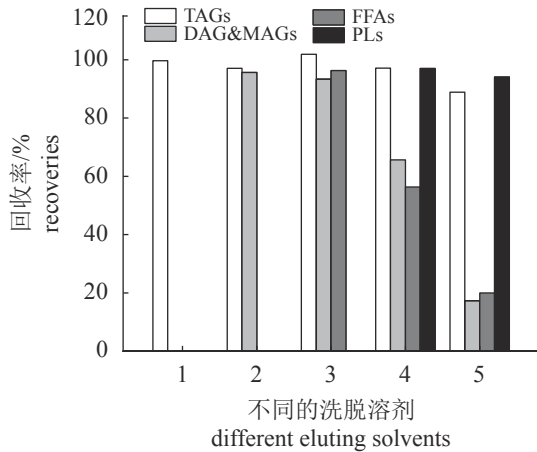


图1 洗脱液种类对 PL 中脂肪酸回收率的影响

1. 正己烷-乙醚, 2. 正己烷-乙酸乙酯, 3. 乙酸-乙醚, 4. 氯仿-异丙醇, 5. 正己烷

Fig. 1 Effect of eluent solvent on recoveries of fatty acids in PL

1. n-hexane-diethyl ether, 2. n-hexane-ethyl acetate, 3. acetic acid-diethyl ether, 4. chloroform-isopropanol, 5. n-hexane

取。柱容量对 PL 中脂肪酸的影响如图 2 所示, 对于柱容量为 500.0 mg 的固相萃取柱, 当上样量从 10.0 mg 提高到 20.0 mg 时, PL 中各脂肪酸含量无显著性变化 ( $P>0.05$ ), 当上样量增加至 30.0 mg 时, 棕榈酸 (C16:0) 的含量减少至  $3.33\% \pm 0.27\%$ 、亚油酸 (C18:2n-6) 的含量减少至  $0.34\% \pm 0.04\%$ 、二十碳五烯酸 (EPA) 的含量减少至  $4.70\% \pm 0.14\%$  和二十二碳六烯酸 (DHA) 的含量减少至  $2.11\% \pm 0.29\%$ 。

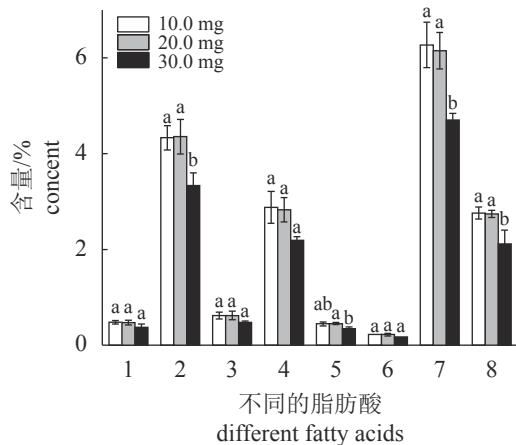


图2 柱容量对 PL 中脂肪酸含量的影响

1. 肉豆蔻酸, 2. 棕榈酸, 3. 硬脂酸, 4. 油酸, 5. 亚油酸, 6. 亚麻酸, 7. 二十碳五烯酸, 8. 二十二碳六烯酸; 下同

Fig. 2 Effect of column capacity on content of fatty acids in PL

1. C14:0, 2. C16:0, 3. C18:0, 4. C18:1n-9, 5. C18:2n-6, 6. C18:3n-3, 7. C20:5n-3, 8. C22:6n-3; the same below

脂肪酸含量与之前相比发生显著降低 ( $P<0.05$ )。因此, 对于柱容量为 500 mg 的固相萃取柱, 最大上样量为 20.0 mg。基于本实验仅定量脂肪酸含量, 结合 GC-FID 所需分析量, 选择 500 mg 固相萃取柱可以满足后续实验要求。

洗脱体积 考察不同体积正己烷对 PL 型脂肪酸含量的影响 (图 3)。当正己烷的体积从 2.0 mL 增加到 3.0 mL 时, 脂肪酸含量显著性增加 ( $P<0.05$ )。当洗脱液体积从 3.0 mL 增加到 4.0 mL 时, 脂肪酸的含量无显著性变化 ( $P>0.05$ )。此时 PL 洗脱液中主要的脂肪酸肉豆蔻酸 (C14:0) 的含量为  $0.47\% \pm 0.04\%$ 、C16:0 的含量为  $4.24\% \pm 0.38\%$ 、硬脂酸 (C18:0) 的含量为  $0.60\% \pm 0.05\%$ 、油酸 (C18:1n-9) 的含量为  $2.81\% \pm 0.10\%$ 、C18:2n-6 的含量为  $0.46\% \pm 0.07\%$ 、亚麻酸 (C18:3n-3) 的含量为  $0.23\% \pm 0.04\%$ 、EPA 的含量为  $6.09\% \pm 0.19\%$  和 DHA 的含量为  $2.71\% \pm 0.28\%$ 。因此, 为了节约试剂和减少对环境的影响, 在使用 500.0 mg 固相萃取柱上样 20.0 mg 南极磷虾油时, 使用 3.0 mL 的正己烷来洗脱 PL 可以满足研究要求。

### 2.2 方法评价

日内日间精密度及回收率 通过回收率和精密度对该方法进行评价, 二硬脂酰磷脂酰胆碱、1,2-双二十二碳酰基-Sn-甘油-3-磷酸胆碱和 1,2-二油酰-Sn-甘油-3-磷酸乙醇胺作为标准品添加到南极磷虾油中考察固相萃取柱对 PL 的分离效果。日内精密度是一天内测定 0.03、0.07 和 0.10 g/g 3 个标浓度的南极磷虾油, 每个测定 6 个平行样品;

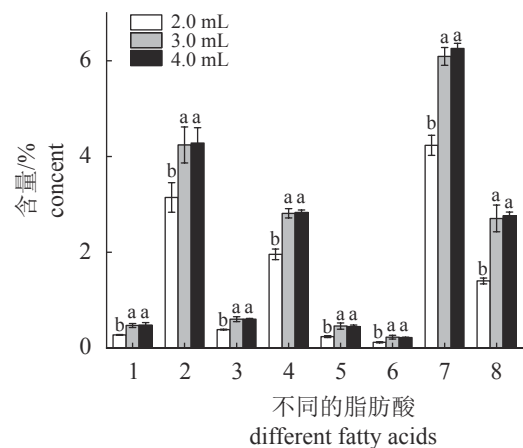


图3 洗脱体积对 PL 中脂肪酸含量的影响

Fig. 3 Effect of elution volume on content of fatty acids in PL

日间精密度是通过连续 3 d 测定 0.03、0.07 和 0.10 g/g 3 个加标浓度的南极磷虾油在测定的。如表 1 所示, 二硬脂酰磷脂酰胆碱、1,2-双二十二碳酰基-

Sn-甘油-3-磷酸胆碱和 1,2-二油酰-Sn-甘油-3-磷酸乙醇胺的回收率在 84.22%~94.45%, 精密度在 0.79%~6.09%, 表明该方法满足分析要求。

表 1 磷脂的日内日间回收率

Tab. 1 Intra-day and inter-day recoveries of phospholipids

	日内回收率/% intra-day recoveries			日间回收率/% inter-day recoveries		
	0.03 g/g	0.07 g/g	0.10 g/g	0.03 g/g	0.07 g/g	0.10 g/g
二硬脂酰磷脂酰胆碱 Distearyl phosphatidylcholin	90.85±3.60	92.01±2.04	91.50±2.16	89.04±2.48	88.46±6.09	90.80±0.79
1,2-二油酰-Sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 1,2-dioleoyl-sn-glycerin-3-phosphoethanolamine	86.93±4.05	91.86±1.76	92.70±4.53	84.22±2.85	86.83±4.65	93.08±5.03
1,2-双二十二碳酰基-Sn-甘油-3-磷酸胆碱 1,2-bis-docosanoyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine	93.86±2.41	88.85±2.73	92.13±3.20	94.45±1.73	92.34±5.20	90.61±2.71

检出限和定量限 检测限 (LODs) 是分析物能被检测的最小值, 可通过 3 倍信噪比计算。定量限 (LOQs) 是分析物能被定量的最小值, 可通过 10 倍信噪比计算。如表 2 所示, C14:0 的最低检出限为 22.84 ng/g, C16:0 的最低检出限为 25.64 ng/g、C18:0 的最低检出限为 28.45 ng/g, C18:1n-9 的最低检出限为 70.62 ng/g, C18:2n-6 的最低检出限为 70.11 ng/g, C18:3n-3 的最低检出限为 69.61 ng/g, EPA 的最低检出限为 75.61 ng/g 和 DHA 的最低检出限为 82.12 ng/g。

表 2 检测限和定量限  
Tab. 2 LODs and LOQs ng/g

脂肪酸 fatty acids	LODs	LOQs
C14:0	22.84	76.12
C16:0	25.64	85.47
C18:0	28.45	94.83
C18:1n-9	70.62	235.38
C18:2n-6	70.11	233.70
C18:3n-3	69.61	232.03
C20:5n-3	75.61	252.04
C22:6n-3	82.12	273.74

### 2.3 固相萃取应用于贮藏南极磷虾油

如表 3 所示, 新鲜南极磷虾油的 PL 中 SFAs、MUFAs 和 PUFAs 的含量分别为 (54.42±1.12)、(28.51±0.30) 和 (97.26±3.91) mg/g。而南极磷虾油 PL 中 SFAs 主要是 C16:0 和 C18:0, PL 中 PUFAs 主要是 EPA 和 DHA。

当贮藏温度为 55 °C, 在 21 d 的贮藏过程中, 储藏天数由 0 d 增加到 12 d 时, PL 中 SFAs、PUFAs 和 MUFAs 显著减少 ( $P < 0.05$ )。当贮藏 21 d 后, PL

中 SFAs、PUFAs 和 MUFAs 较第 0 天分别降低了 28.74%、49.18% 和 45.03%。由此可知, 储藏过程中南极磷虾油的 PL 中 SFAs、PUFAs 和 MUFAs 的含量变化受储藏时间的影响。PL 中 SFAs、PUFAs 和 MUFAs 的含量随着贮藏时间的增加均减少, 可能是由于在贮藏过程中, PL 发生了水解和氧化。Manat 等<sup>[17]</sup>等在沙丁鱼的研究中同样表明, 15 d 的贮藏后沙丁鱼中的 PL 含量降低。然而, 在 21 d 的储藏过程中, 储藏温度在 4 °C 和 25 °C 时 SFAs 的含量没有显著变化, 而在 55 °C 贮藏 12 d 可以观察到 SFAs 含量的显著下降。当储藏 21 d 后, 温度由 4 °C 增加到 25 °C 时, PL 中 SFAs、PUFAs 和 MUFAs 减少了 8.96%、3.76% 和 9.70%。当储藏温度由 4 °C 增加到 55 °C 时, PL 中 SFAs、PUFAs 和 MUFAs 减少了 29.41%、28.23% 和 40.47%。由此可知, 储藏过程中南极磷虾油的 PL 中 SFAs、PUFAs 和 MUFAs 的含量变化受储藏温度的影响。在 4 °C 和 25 °C 的贮藏中 PL 中 SFAs、PUFAs 和 MUFAs 的含量降低率低于在 55 °C 的贮藏中的含量。本实验证明温度的升高会加速 PL 的氧化速度和水解, 导致 PL 的脂肪酸含量减少, 而在张玲云等<sup>[18]</sup>研究中也证实了温度升高会加速 PL 的氧化。

### 3 结论

通过优化最佳上样量、洗脱液种类和体积确定南极磷虾油中 PL 型脂肪酸的萃取方法。在最优条件下, 本方法的加标回收率在 84.22%~94.45% 之间, 精密度在 0.79%~6.09% 之间。PL 型脂肪酸的检出限为 22.84~82.12 ng/g, 定量限为 76.12~273.74 ng/g。经本方法分离贮藏南极磷虾油中的 PL 并测定其脂肪酸含量, 在通过 21 d 贮藏后,



表 3 贮藏南极磷虾油中 PL 中的主要脂肪酸  
Tab. 3 Main fatty acids in PL in Antarctic krill oil during storage

脂肪酸 fatty acids	0 d	4 °C			25 °C			55 °C		
		3 d	12 d	21 d	3 d	12 d	21 d	3 d	12 d	21 d
C14:0	4.80±0.27 <sup>a</sup>	4.38±0.22 <sup>c</sup>	4.31±0.17 <sup>c</sup>	4.75±0.22 <sup>ab</sup>	4.74±0.06 <sup>ab</sup>	4.42±0.09 <sup>bc</sup>	4.31±0.04 <sup>c</sup>	4.65±0.09 <sup>abc</sup>	3.66±0.13 <sup>d</sup>	3.43±0.25 <sup>d</sup>
C16:0	43.52±1.58 <sup>a</sup>	43.06±0.30 <sup>a</sup>	41.98±1.37 <sup>a</sup>	44.26±9.36 <sup>a</sup>	43.84±1.35 <sup>a</sup>	40.92±0.57 <sup>a</sup>	39.73±2.96 <sup>ab</sup>	39.29±5.42 <sup>ab</sup>	33.09±0.37 <sup>bc</sup>	29.33±1.18 <sup>c</sup>
C18:0	6.10±0.24 <sup>a</sup>	6.07±0.48 <sup>a</sup>	5.90±0.78 <sup>a</sup>	5.93±0.35 <sup>a</sup>	5.93±0.52 <sup>a</sup>	5.96±0.86 <sup>a</sup>	5.98±0.07 <sup>a</sup>	6.27±0.94 <sup>a</sup>	5.49±0.28 <sup>a</sup>	6.02±1.01 <sup>a</sup>
C18:1n-9	28.51±0.30 <sup>a</sup>	27.95±0.74 <sup>a</sup>	22.04±0.87 <sup>c</sup>	20.19±2.31 <sup>d</sup>	23.20±0.24 <sup>bc</sup>	22.22±0.67 <sup>c</sup>	19.43±0.16 <sup>dc</sup>	24.30±0.27 <sup>b</sup>	18.19±0.46 <sup>c</sup>	14.49±0.47 <sup>f</sup>
C18:2n-6	4.50±0.15 <sup>ab</sup>	4.43±0.52 <sup>ab</sup>	3.98±0.47 <sup>bc</sup>	3.90±0.29 <sup>bc</sup>	4.20±0.08 <sup>abc</sup>	4.85±0.65 <sup>a</sup>	4.09±0.24 <sup>bc</sup>	4.41±0.47 <sup>ab</sup>	3.78±0.06 <sup>bc</sup>	3.62±0.25 <sup>c</sup>
C18:3n-3	2.17±0.12 <sup>ab</sup>	2.39±0.14 <sup>a</sup>	2.16±0.03 <sup>ab</sup>	1.89±0.40 <sup>bc</sup>	2.35±0.24 <sup>a</sup>	1.56±0.13 <sup>cd</sup>	1.61±0.19 <sup>cd</sup>	2.43±0.20 <sup>a</sup>	2.27±0.08 <sup>ab</sup>	1.49±0.22 <sup>d</sup>
C20:5n-3	63.02±2.64 <sup>abc</sup>	64.62±10.11 <sup>ab</sup>	60.12±2.12 <sup>abc</sup>	59.08±3.26 <sup>abc</sup>	55.19±1.54 <sup>bc</sup>	60.20±2.12 <sup>abc</sup>	52.36±1.63 <sup>c</sup>	69.19±1.51 <sup>a</sup>	38.43±7.09 <sup>d</sup>	30.73±2.08 <sup>d</sup>
C22:6n-3	27.57±1.85 <sup>abc</sup>	29.44±2.75 <sup>ab</sup>	28.06±1.47 <sup>abc</sup>	24.92±2.97 <sup>cd</sup>	25.76±2.87 <sup>bcd</sup>	20.44±1.46 <sup>ef</sup>	23.04±1.21 <sup>de</sup>	30.61±0.05 <sup>a</sup>	27.11±2.51 <sup>abc</sup>	17.62±2.43 <sup>f</sup>
SFAs	54.42±1.12 <sup>a</sup>	53.50±0.66 <sup>a</sup>	52.19±1.57 <sup>a</sup>	54.94±4.23 <sup>a</sup>	54.51±1.75 <sup>a</sup>	51.30±1.07 <sup>a</sup>	50.02±2.90 <sup>a</sup>	50.20±6.27 <sup>a</sup>	42.25±4.03 <sup>b</sup>	38.78±1.65 <sup>b</sup>
MUFAs	28.51±0.30 <sup>a</sup>	27.95±0.74 <sup>a</sup>	22.04±0.87 <sup>c</sup>	20.19±2.31 <sup>d</sup>	23.20±0.24 <sup>bc</sup>	22.22±0.67 <sup>c</sup>	19.43±0.16 <sup>dc</sup>	24.30±0.27 <sup>b</sup>	18.19±0.46 <sup>c</sup>	14.49±0.47 <sup>f</sup>
PUFAs	97.26±3.91 <sup>abc</sup>	100.88±10.84 <sup>ab</sup>	94.33±3.87 <sup>abc</sup>	89.80±6.80 <sup>bcd</sup>	87.50±2.28 <sup>cd</sup>	87.04±2.99 <sup>cd</sup>	81.09±2.87 <sup>de</sup>	106.63±14.77 <sup>a</sup>	71.59±9.51 <sup>c</sup>	53.46±0.38 <sup>f</sup>

注: 表格中实验数据以“平均值±标准差”表示 ( $n=3$ ); 同行肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ); SFAs. 饱和脂肪酸, MUFAs. 单不饱和脂肪酸, PUFAs. 多不饱和脂肪酸

Notes: the experimental data in the table are expressed as "mean ± standard deviation" ( $n=3$ ); in the same row, values with different small letters superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ); SFAs. saturated fatty acid, MUFAs. monounsaturated fatty acids, PUFAs. polyunsaturated fatty acids

PL 型脂肪酸的含量显著减少。储藏过程中南极磷虾油的 PL 中 SFAs、PUFAs 和 MUFAs 的含量变化受储藏时间和贮藏温度的影响。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] 刘丽, 刘承初, 赵勇, 等. 南极磷虾的营养保健功效以及食用安全性评价[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 443-447.  
Liu L, Liu C C, Zhao Y, et al. Recent advances in the healthcare function and food safety of Antarctic krill[J]. Food Science, 2010, 31(17): 443-447 (in Chinese).
- [2] 荣雅利, 汪之和, 周婷婷, 等. 南极磷虾羧肽酶的适冷特性及蛋白质结构预测[J]. 水产学报, 2020, 44(11): 1893-1902.  
Rong Y L, Wang Z H, Zhou T T, et al. Cold-adaptation and structural prediction of carboxypeptidase from *Euphausia superba*[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(11): 1893-1902 (in Chinese).
- [3] Commission for the conservation of Antarctic marine living resources. Krill fishery report 2018[EB/OL]. [2019-04-03]. <https://www.ccamlr.org/en/document/publications/krill-fishery-report-2018>.
- [4] Santa Cruz F, Ernst B, Arata J A, et al. Spatial and temporal dynamics of the Antarctic krill fishery in fishing hotspots in the Bransfield Strait and South Shetland Islands[J]. Fisheries Research, 2018, 208: 157-166.
- [5] Takaichi S, Matsui K, Nakamura M, et al. Fatty acids of astaxanthin esters in krill determined by mild mass spectrometry[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 136(2): 317-322.
- [6] Wang Y C, Wang S S, Wang J F, et al. Preparation and anti-osteoporotic activities *in vivo* of phosphorylated peptides from Antarctic krill (*Euphausia superba*)[J]. Peptides, 2015, 68: 239-245.
- [7] Winther B, Hoem N, Berge K, et al. Elucidation of phosphatidylcholine composition in krill oil extracted from *Euphausia superba*[J]. Lipids, 2011, 46(1): 25-36.
- [8] Chu F M, Wang D, Liu T, et al. An optimized cocktail of chitinolytic enzymes to produce N, N'-diacetylchitobiose and N-acetyl-D-glucosamine from defatted krill by-products[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133: 1029-1034.
- [9] Sun D W, Cao C, Li B, et al. Antarctic krill lipid extracted by subcritical n-butane and comparison with supercritical CO<sub>2</sub> and conventional solvent extraction[J]. LWT, 2018, 94: 1-7.
- [10] Tou J C, Jaczynski J, Chen Y C. Krill for human consumption: Nutritional value and potential health benefits[J]. Nutrition Reviews, 2007, 65(2): 63-77.
- [11] Yu Y, Liu X F, Miao J K, et al. Chitin from Antarctic krill shell: eco-preparation, detection, and characterization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 4125-4137.
- [12] Wang Y C, Wang R, Chang Y G, et al. Preparation and

- thermo-reversible gelling properties of protein isolate from defatted Antarctic krill (*Euphausia superba*) byproducts[J]. *Food Chemistry*, 2015, 188: 170-176.
- [13] Wang Y C, Chang Y G, Xue Y, *et al.* Rheology and microstructure of heat-induced fluid gels from Antarctic krill (*Euphausia superba*) protein: Effect of pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 510-519.
- [14] Sun N, Chen J, Wang D, *et al.* Advance in food-derived phospholipids: sources, molecular species and structure as well as their biological activities[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 80: 199-211.
- [15] Lu F S H, Bruheim I, Haugsgjerd B O, *et al.* Effect of temperature towards lipid oxidation and non-enzymatic browning reactions in krill oil upon storage[J]. *Food Chemistry*, 2014, 157: 398-407.
- [16] Li Y F, Zeng Q H, Liu G, *et al.* Effects of ultrasound-assisted basic electrolyzed water (BEW) extraction on structural and functional properties of Antarctic krill (*Euphausia superba*) proteins[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 71: 105364.
- [17] Chaijan M, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage[J]. *Food Chemistry*, 2006, 99(1): 83-91.
- [18] 张玲云, 张敏, 李淑卿, 等. 贮藏温度对大黄鱼鱼卵油品质的影响[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(2): 76-79,92. Zhang L Y, Zhang M, Li S Q, *et al.* Effect of storage temperature on the quality of large yellow croaker roe oil[J]. *Cereals & Oils*, 2021, 34(2): 76-79,92 (in Chinese).

## Optimization and application of the method for determination of the fatty acid content in phospholipid from krill oil

WANG Shimiao<sup>1,2</sup>, YANG Chunyu<sup>1,2</sup>, ZHAO Qi<sup>1,2\*</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

2. National Engineering Research Center of Seafood, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**Abstract:** Due to richness in essential amino acids, phospholipids, astaxanthin and omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), Antarctic krill (*Euphausia superba*) which was abundant and had high nutritional value was considered to have great development value. At present, the analysis of fatty acid contents in Antarctic krill and its products mainly focused on the determination of total fatty acid contents. Owing to the effect of bioavailability for PUFAs in different esters, it was necessary to accurately quantify the content of fatty acid in different types of esters in Antarctic krill and its products. In order to clarify the content of phospholipids (PL) fatty acids in Antarctic krill oil, a gas chromatography analysis method for the content of fatty acids in PL in Antarctic krill oil was established based on solid phase extraction. After optimizing the various conditions of the impact analysis, under the optimal conditions, the recoveries of the standard addition measured by this method were between 84.22%-94.45%, and the intra-day and inter-day precision were between 0.79%-6.09%. This method was applied to measure the changes in the content of various PL fatty acids of Antarctic krill oil during storage. The results showed that the content of PL fatty acids decreased during the 21-day storage process, and the degradation rate increased with increasing temperature. The present study provided methodological support for the study of lipids in Antarctic krill.

**Key words:** *Euphausia superba*; phospholipids; polyunsaturated fatty acids; solid phase extraction; gas chromatography

**Corresponding author:** ZHAO Qi. E-mail: zhaoqi@dlpu.edu.cn

**Funding project:** National Key Research and Development Program (2018YFC1406805)