

检测分析

DHA 单细胞油脂的脂肪酸分布及甘油三酯组成分析

齐冬梅, 邹孝强, 黄健花, 金青哲, 王兴国

(江南大学 食品学院, 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心, 国家功能食品工程技术研究中心, 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:测定了 DHA 单细胞油脂的总脂肪酸组成, 采用脂肪酶 Lipozyme 435 醇解 DHA 单细胞油脂获得 2-单甘酯(2-MAG), 结合薄层色谱法和气相色谱法, 分析其脂肪酸分布, 并选择超高效液相色谱(UPLC)串联四级杆飞行时间质谱(Q-TOF-MS/MS)在电喷雾离子化(ESI)模式下对 DHA 单细胞油脂的甘油三酯进行了分离鉴定。结果表明: DHA 单细胞油脂中含量较高的脂肪酸是 DHA (51.37%)、棕榈酸(31.13%)和 DPA (10.78%); sn-2 位 DHA 和 DPA 含量分别为 72.65% 和 18.21%, sn-1,3 位棕榈酸含量为 43.61%; DHA 和 DPA 平均分布在甘油三酯的 sn-1,3 位和 sn-2 位, 棕榈酸主要分布在 sn-1,3 位。DHA 单细胞油脂中含量较高的甘油三酯是 22:6-22:5-16:0 (12.76%), 22:5-16:0-16:0 (8.93%), 22:6-22:6-22:6 (8.78%), 22:6-22:6-22:5 (6.62%), 16:0-16:0-16:0 (6.61%), 占总甘油酯的 43.7%。

关键词: DHA 单细胞油脂; 脂肪酸分布; 甘油三酯; 超高效液相色谱-质谱

中图分类号: TQ646.4; O657 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)09-0154-07

Fatty acid distribution and triglyceride composition of DHA single cell oil

QI Dongmei, ZOU Xiaoqiang, HUANG Jianhua, JIN Qingzhe, WANG Xingguo
(National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, National Engineering Research Center for Functional Food, Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: The total fatty acid composition of DHA single cell oil was determined, and 2-MAG was obtained by ethanolysis of DHA single cell oil with Lipozyme 435. The positional distribution of fatty acid in DHA single cell oil was analyzed by gas chromatography combined with thin layer chromatography. Additionally, the triglyceride composition (TAG) of DHA single cell oil was separated and identified by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry in electrospray ionization mode (UPLC-Q-TOF-ESI/MS/MS). The results showed that the DHA content (51.37%) in DHA single cell oil was the highest, followed by palmitic acid (31.13%) and DPA (10.78%). The contents of DHA and DPA in the sn-2 position were 72.65% and 18.21% respectively, and the palmitic acid content in the sn-1,3 position was 43.61%. DHA and DPA were evenly distributed in the sn-2 position and sn-1,3 position, while palmitic acid was typically located at sn-1,3 position. The most abundant TAG species in DHA single cell oil were (22:6-22:5-16:0), (22:5-16:0-16:0), (22:6-22:6-22:6), (22:6-22:6-22:5) and (16:0-16:0-16:0) with contents of 12.76%, 8.93%, 8.78%, 6.62% and 6.61% respectively, and they accounted for 43.7% of total glyceride.

Key words: DHA single cell oil; fatty acid distribution; triglyceride; UPLC-Q-TOF-ESI/MS/MS

收稿日期: 2017-11-28; 修回日期: 2018-06-06

基金项目: 国家自然科学基金(31601433); 江苏省自然科学基金(BK20140149)

作者简介: 齐冬梅(1990), 女, 在读硕士, 研究方向为脂质科学与技术(E-mail) qidongmei168@126.com。

通信作者: 邹孝强, 副教授(E-mail) xiaoqiangzou@163.com。

多年来, DHA 与生命营养的议题一直备受关注, DHA 是中枢神经和外周神经系统中最丰富的

ω -3型长链多不饱和脂肪酸(LCPUFA),俗称“脑黄金”,在神经组织的形成、光感受器的分化、视网膜紫质的激活以及神经递质的水平与代谢等方面起重要作用,因而对婴儿的视觉敏锐度和认知功能发育至关重要^[1]。另外,DHA衍生的氧脂素(如消退素和保护素)还具有较强的抗炎能力和免疫调节活性^[2]。当前,含DHA的油脂(如鱼油和DHA单细胞油脂)被广泛应用于特殊膳食用食品领域,常将DHA单细胞油脂添加到婴儿配方奶粉中,这是因为同鱼油相比,DHA单细胞油脂采用无菌发酵生产模式,无重金属污染的风险,90%以上的脂肪酸以甘油三酯形式存在,含有较高浓度的DHA(一般高于30%),几乎不含EPA^[3],而且胆固醇含量较低,类胡萝卜素和生育酚等天然抗氧化剂含量较高^[4],有助于延缓LCPUFA的氧化。近年来,DHA等LCPUFA的生物利用度受到高度关注,Schuchardt等^[5]认为LCPUFA的生物利用度会受到物理化学性质和基质效应等因素的影响,特别是DHA在甘油骨架上的位置分布以及甘油三酯的脂肪酸构成,会影响DHA的消化、吸收及代谢。

胰脂酶水解法是一种常用的且较为简便的脂肪酸分布测定方法,研究者^[6-8]多采用该方法测定DHA油脂的sn-2位脂肪酸组成。然而,这种方法并不适用于DHA单细胞油脂,因为sn-1,3位的DHA等LCPUFA(多于4个双键)会抵抗胰脂酶的水解而难被水解下来,影响到结果的可靠性。研究^[9]证实,脂肪酶CALB对C4~C24之间的饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的选择程度近似,Shimada等^[10]以椰子油、琉璃苣油和金枪鱼油为测试底物,比较了酶促醇解法同格氏试剂法在脂肪酸分布测定上的差异,发现这两种方法的测定结果基本一致,表明酶促醇解法能够较为准确地测定特殊油脂的sn-2位脂肪酸组成,但是采用酶促醇解法测定DHA单细胞油脂的sn-2位脂肪酸组成未见报道。甘油三酯的鉴定通常选用高温气相色谱法和反相液相色谱法^[11],但是DHA单细胞油脂为热敏性物质,且甘油三酯构成较为复杂,增大了分离鉴定的难度。相比之下,超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)可在无标准品的条件下通过准分子离子峰($[M+H]^+$)和碎片离子峰($[DAG]^+$)获得甘油酯的结构信息,同时质谱展现出灵敏度高、稳定性和重现性好^[12]的特点,但采用该方法分离鉴定DHA单细胞油脂的甘油三酯组成方面的研究较少。

本文测定了DHA单细胞油脂的总脂肪酸组成;采用脂肪酶Lipozyme 435催化DHA单细胞油脂的

醇解反应得到2-单甘酯(2-MAG),并进一步测定和分析了DHA单细胞油脂的脂肪酸分布情况;采用UPLC-Q-TOF-ESI/MS/MS分离和鉴定了DHA单细胞油脂的甘油三酯组成,为DHA单细胞油脂的开发应用提供基础数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

DHA单细胞油脂(食品级,*Schizochytrium* sp.)购自山东青岛科源海洋生物有限公司;固定化脂肪酶Lipozyme 435由诺维信(中国)生物技术有限公司捐赠;37种脂肪酸甲酯(C4~C24)混标购自Sigma-Aldrich公司;氢氧化钾、乙醇、甲酸,分析纯;甲醇、正己烷、异丙醇、乙腈,色谱纯;氮气(99.99%)、高纯氮气(99.999%)和高纯氢气(99.999%)购自无锡太湖气体有限公司。

1.1.2 仪器与设备

7820A气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;Acquity超高效液相色谱仪(UPLC)、Synapt Q-TOF-MS质谱仪,美国Waters公司;1525高效液相色谱仪(HPLC)、2414示差检测器(RID),美国Waters公司;RO10数显型不带加热磁力搅拌器,德国IKA集团;GF254硅胶板,乳山市太阳干燥剂有限公司;25 mL夹层酶反应器,上海申迪玻璃仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 总脂肪酸组成分析

采用酯交换法制备脂肪酸甲酯(FAME),取适量DHA单细胞油脂溶解于2 mL正己烷中,加入0.5 mL氢氧化钾-甲醇溶液(2 mol/L),旋涡振荡2 min后,加入少许无水硫酸钠,离心取上相,待气相色谱分析。

气相色谱(GC)条件:美国安捷伦7820A气相色谱仪,配备氢火焰离子检测器(FID);TRACE TR-FAME色谱柱(60 m × 0.25 mm × 0.25 μ m, Thermo Fisher, USA);载气为高纯氮气,流速25 mL/min;燃烧气为氢气和空气,氢气流速30 mL/min,空气流速400 mL/min;升温程序为色谱柱初始温度60 $^{\circ}$ C并保持3 min,以5 $^{\circ}$ C/min的速度升温至175 $^{\circ}$ C并保持15 min,再以2 $^{\circ}$ C/min的速度升温至220 $^{\circ}$ C并保持10 min,单个样品运行时间为73.5 min;进样口和检测器温度均为250 $^{\circ}$ C;进样体积1 μ L,分流比100:1。将样品脂肪酸甲酯的保留时间同37种脂肪酸甲酯混标的保留时间比对定性,确定脂肪酸种类。采用

面积归一化法计算样品中脂肪酸甲酯的质量分数。

1.2.2 sn-2 位脂肪酸组成分析

2-MAG 的制备:根据 Shimada 等^[10]的方法获得 2-MAG。在 25 mL 反应釜中加入 1 g DHA 单细胞油脂和 4 g 无水乙醇,随后加入 10% 脂肪酶 Lipozyme 435 启动醇解反应,反应温度为 23 °C,350 r/min 下连续搅拌,每间隔 1 h 取样,采用 Waters 1525 高效液相色谱仪检测甘油酯的组成变化。高效液相色谱条件:样品质量浓度 10~20 mg/mL,进样体积 15 μL;流动相为正己烷-异丙醇-甲酸(体积比 15:1:0.03),流速 1 mL/min,等梯度洗脱;Sepax HP-Silica 色谱柱(2.5 m×4.6 mm×5 μm),柱温 30 °C。

2-MAG 的分离提取及分析:反应 4 h 后,从醇解产物中取出 100 μL 样品经氮气浓缩,采用薄层层析将样品中的 2-MAG 分离,所用展开剂为正己烷-乙醚-乙酸(体积比 50:50:1),在硅胶板上均匀喷洒 2 g/L 的 2,7-二氯荧光素乙醇溶液,在紫外灯 254 nm 下显色,刮下 2-MAG 条带,用无水乙醚提取 3 次,采用氮气吹扫脱除溶剂。2-MAG 的甲酯化以及脂肪酸组成的测定按照 1.2.1 所述进行,但将进样体积和分流比分别调整为 2 μL 和 50:1。

1.2.3 甘油三酯组成分析

采用 UPLC-Q-TOF-ESI/MS/MS 分离鉴定 DHA 单细胞油脂中的甘油三酯种类。

色谱条件:使用 Waters Acquity 超高效液相色谱仪将 DHA 单细胞油脂中的甘油三酯分离,色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC™ BEH C18 柱(50 mm×2.1 mm×1.9 μm),柱温 45 °C;样品质量浓度 2 mg/mL,进样量 1.0 μL,流动相流速 0.3 mL/min;流动相 A 为含 10 mmol/L 乙酸铵的乙腈-异丙醇(体积比 1:9)溶液;流动相 B 为含 10 mmol/L 乙酸铵的乙腈-水(体积比 4:6)溶液;洗脱梯度为流动相 A 由 70% 起始并保留 1 min,将其在 30 min 内由 70% 线性上升至 87% 并保留 1 min,最后将其在 1 min 内线性降至 70% 并平衡 4 min。

质谱条件:ESI 离子源温度 100 °C,正离子 DDA 扫描模式;毛细管电压 3.5 kV,锥孔电压 30 V;脱溶剂气温度 400 °C,流量 700 L/h;锥孔气流量 50 L/h;扫描方式 MSE,碰撞气体为氩气,一级碰撞电压 6 V,二级碰撞电压 20~40 V;检测器电压 1 800 V;相对分子质量扫描范围(m/z)200~1 500,扫描时间 0.5 s。使用 MassLynx 4.1 软件(Waters)进行数据处理分析。

2 结果与分析

2.1 DHA 单细胞油脂的脂肪酸分布

采用脂肪酶 Lipozyme 435 催化 DHA 单细胞油脂的醇解反应获得 2-MAG,并对反应过程中 2-MAG 含量变化进行实时监测,结果如图 1 所示。

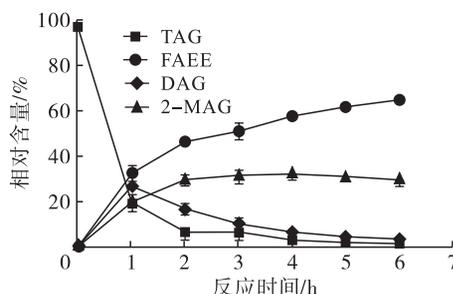


图 1 2-MAG 相对含量随反应时间的变化

由图 1 可知,在反应 1 h 后,甘油三酯(TAG)、甘二酯(DAG)含量急剧减少,而脂肪酸乙酯(FAEE)、2-MAG 含量急剧增多;在反应 2 h 之后,TAG 和 DAG 含量的降低越来越缓慢,相应地 2-MAG 含量的增幅越来越慢,在反应 4 h 时 2-MAG 含量最高,为 32.46%,表明 sn-1,3 位上的 DHA 等 LCPUFA 能够很好地转化成脂肪酸乙酯,而且在整个反应过程中始终未出现 1(3)-MAG,因此测定该条件下 2-MAG 的脂肪酸组成能够较好地反映 DHA 单细胞油脂的 sn-2 位脂肪酸组成。

对 DHA 单细胞油脂进行脂肪酸组成分析,结果如表 1 所示。由表 1 可知,DHA 单细胞油脂中的主要脂肪酸是二十二碳六烯酸(DHA,51.37%)、棕榈酸(31.13%)、二十二碳五烯酸(DPA,10.78%)、豆蔻酸(2.33%)和硬脂酸(1.02%)。其中,多不饱和脂肪酸占总脂肪酸的 64.60%,主要是 DHA 和 DPA;饱和脂肪酸占总脂肪酸的 34.48%,主要为棕榈酸。sn-2 位的 DHA 和 DPA 含量分别为 72.65% 和 18.21%,sn-2 位的多不饱和脂肪酸含量高达 91.81%。在 sn-1,3 位脂肪酸组成中,DHA 和 DPA 含量分别为 40.74% 和 7.06%,棕榈酸含量高达 43.61%。从 sn-2 位脂肪酸相对含量来看,DHA 和 DPA 平均分布在 sn-2 位和 sn-1,3 位,棕榈酸主要分布在 sn-1,3 位。人乳脂中的 DHA 主要分布在 sn-2 位和 sn-3 位,研究证实 DHA 以 2-MAG 形式的吸收效果更好。另外,人乳脂中超过 70% 的棕榈酸在 sn-2 位,这样的脂肪酸分布规律可降低脂肪酸钙皂的生成概率,从而提高婴儿的脂质吸收率,然而棕榈酸在 DHA 单细胞油脂中的分布结果是与此相悖的,从 DHA 生物利用率的角度考虑,或许 DHA 单细胞油脂应做以适当的改造,才能

够更好地应用于婴儿配方奶粉,这有待于进一步的商榷。

表1 DHA单细胞油脂的脂肪酸分布

脂肪酸	总脂肪酸含量	sn-2位脂肪酸含量	sn-2位脂肪酸相对含量	sn-1,3位脂肪酸含量
C14:0	2.33 ± 0.01	0.81 ± 0.02	11.60 ± 0.22	3.09 ± 0.00
C14:1	0.28 ± 0.00	-	-	0.42 ± 0.00
C16:0	31.13 ± 0.15	6.17 ± 0.07	6.61 ± 0.04	43.61 ± 0.18
C16:1	0.21 ± 0.00	0.12 ± 0.01	19.42 ± 1.74	0.26 ± 0.01
C18:0	1.02 ± 0.02	1.08 ± 0.01	35.23 ± 0.19	0.99 ± 0.02
C18:1	0.43 ± 0.02	-	-	0.64 ± 0.03
C18:3	0.21 ± 0.00	-	-	0.32 ± 0.00
C18:4	0.74 ± 0.00	0.36 ± 0.01	16.20 ± 0.23	0.93 ± 0.00
C20:4	0.65 ± 0.00	0.40 ± 0.00	20.77 ± 0.21	0.77 ± 0.00
C20:5	0.85 ± 0.02	0.19 ± 0.00	7.48 ± 0.09	1.18 ± 0.02
C22:5	10.78 ± 0.03	18.21 ± 0.03	56.32 ± 0.07	7.06 ± 0.03
C22:6	51.37 ± 0.10	72.65 ± 0.09	47.14 ± 0.04	40.74 ± 0.11
SFA	34.48 ± 0.17	8.06 ± 0.10	-	47.69 ± 0.20
MUFA	0.92 ± 0.03	0.12 ± 0.01	-	1.32 ± 0.04
PUFA	64.60 ± 0.14	91.81 ± 0.11	-	50.99 ± 0.16

注:sn-2位脂肪酸相对含量=(sn-2位脂肪酸含量×100)/(总脂肪酸含量×3),sn-1,3位脂肪酸含量=(3×总脂肪酸含量-sn-2位脂肪酸含量)/2。

2.2 DHA单细胞油脂的甘油三酯组成

采用UPLC-Q-TOF-ESI/MS/MS分离鉴定DHA单细胞油脂中的甘油三酯,鉴于DHA单细胞油脂为脂溶性物质,选择以有机溶剂为主的流动相配比,考虑到高比例的有机溶剂会引起总离子强度相对较低,从而影响到结果的准确分析,于是在流动相中添加一定浓度的乙酸铵来提高离子化效率,这些离子的加入不仅不会影响甘油三酯的出峰时间,同时还会获得更好的峰型和分子质量信息。DHA单细胞油脂甘油三酯的UPLC-Q-TOF-ESI/MS/MS总离子流图见图2。

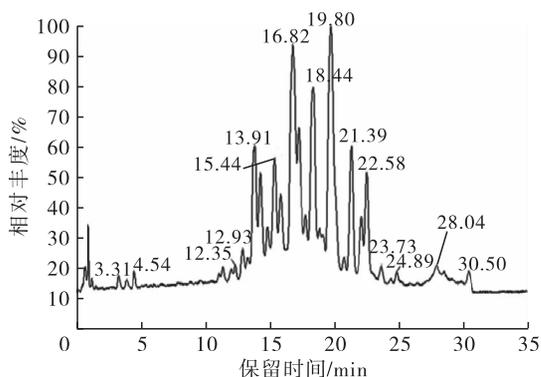


图2 DHA单细胞油脂甘油三酯的UPLC-Q-TOF-ESI/MS/MS总离子流色谱图

由图2可知,在超高液相色谱条件优化后能够较好地分离DHA单细胞油脂的甘油三酯组分,甘油三酯在C18色谱柱上的出峰顺序按照碳当量数的大小顺序被洗脱。甘油三酯集中在12~23 min内

流出。

经C18色谱柱分离后的甘油三酯进一步通过Q-TOF-MS获得准分子离子 $[M+H]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 以及丢失脂肪酸后形成的碎片离子 $[DAG]^+$,根据这些信息可以推算出甘油三酯的脂肪酸构成及脂肪酸分布。 $[M+NH_4]^+$ 相比于 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 更容易形成碎片离子,因此被选为MS/MS的母离子。以甘油三酯22:5-22:6-16:0的定性为例,该甘油三酯的二级质谱图如图3所示。

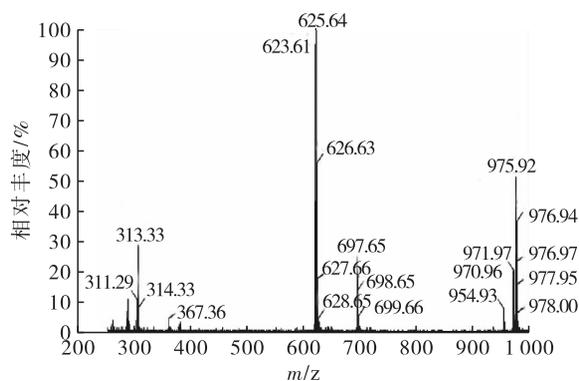


图3 保留时间为18.167 min的22:5-22:6-16:0的MS/MS谱图

由图3可知, m/z 970.96和 m/z 975.92分别为 $[M+NH_4]^+$ 和 $[M+Na]^+$,通过计算可知该甘油三酯的相对分子质量为953.91,碎片离子 m/z 623.61、 m/z 625.64和 m/z 697.65分别由DPA、DHA和棕榈酸中性损失后形成的 $[DAG]^+$,通过质量守恒验

证可确定该甘油三酯为 22:5 - 22:6 - 16:0。

由于空间位阻作用,在相同碰撞能量下,sn - 1,3 位和 sn - 2 位脂肪酸在电离过程中所需的断裂能量不同,因此会产生相对丰度不同的 [DAG]⁺,即 sn - 1,3 位脂肪酸断裂后形成的 [DAG]⁺ 相对丰度要高于 sn - 2 位脂肪酸断裂后形成的 [DAG]⁺ 相对丰度。通常可根据该断裂规律来解析脂肪酸在甘油三酯中的位置分布,然而在 DHA 单细胞油脂中,发现 DHA 和 DPA 等 LCPUFA 断裂后形成的 [DAG]⁺

相对丰度要高于棕榈酸等饱和脂肪酸断裂后形成 [DAG]⁺ 相对丰度,表明脂肪酸的碳链长度和不饱和度同样会影响脂肪酸的断裂规律。Tu 等^[13]报道甘油三酯中的不饱和脂肪酸相比于饱和脂肪酸更容易断裂,同时分布在 sn - 1,3 位的脂肪酸比 sn - 2 位脂肪酸更容易碎片化。鉴于脂肪酸的断裂规律受多种因素的影响和 DHA 单细胞油脂的特殊性,无法判断每个甘油三酯的脂肪酸位置分布。

DHA 单细胞油脂的甘油酯组成见表 2。

表 2 DHA 单细胞油脂的甘油酯组成

保留时间/min	甘油酯	母离子(<i>m/z</i>)	碎片离子(<i>m/z</i>)	ECN	相对含量/%
3.242	22:6 - 22:6	730.65	385.35	20	0.60
3.976	22:6 - 22:5	732.65	385.34,387.35	22	0.22
4.470	22:6 - 16:0	658.63	313.30,386.35	26	0.52
11.297	22:6 - 22:6 - 16:3	962.81	617.60,695.62	30	0.50
11.928	22:6 - 22:6 - 12:0	912.79	567.57,695.61	32	0.20
11.996	22:6 - 22:6 - 18:4	988.91	643.60,695.63	30	0.40
12.388	22:6 - 14:3 - 16:0	862.78	517.52,623.64,589.55	34	0.20
12.781	22:6 - 22:6 - 20:5	1 014.92	669.63,695.62	30	1.21
12.815	22:6 - 16:2 - 22:6	964.91	619.58,695.63	32	0.48
13.190	22:6 - 16:0 - 12:1	838.77	493.53,565.52,623.63	36	0.22
13.309	22:6 - 18:3 - 22:6	990.92	645.62,695.65	32	0.81
13.361	20:5 - 14:0 - 22:6	914.89	569.56,595.60,669.61	34	0.32
13.395	22:6 - 16:4 - 16:0	888.79	543.55,615.54,623.63	34	0.18
13.446	22:6 - 16:0 - 14:2	864.78	519.55,591.56,623.61	36	0.28
13.582	22:6 - 22:6 - 22:6	1 040.93	695.62	30	8.78
13.872	22:6 - 22:6 - 20:4	1 016.92	671.64,695.61	32	0.95
13.889	22:6 - 22:5 - 14:1	940.90	593.57,595.60,697.64	34	4.86
13.974	22:6 - 16:0 - 14:2	864.78	519.52,591.57,623.62	36	0.48
14.025	22:6 - 16:0 - 16:3	890.89	545.57,617.56,623.63	36	1.16
14.383	22:6 - 22:6 - 16:1	966.91	621.60,695.67	34	0.73
14.519	22:6 - 20:4 - 14:0	916.89	571.59,595.60,671.62	36	0.20
14.639	22:6 - 14:0 - 14:0	840.77	495.53,595.60	38	1.05
14.792	22:6 - 18:4 - 16:0	916.89	571.59,623.60,643.61	36	1.46
14.946	22:6 - 20:4 - 20:4	992.92	647.63,671.65	34	
14.946	22:6 - 22:6 - 18:2	992.92	647.63,695.60	34	0.34
14.946	22:5 - 20:5 - 20:4	992.92	645.60,673.67,671.65	34	
15.014	14:1 - 22:6 - 16:0	866.88	521.56,593.57,623.61	38	1.62
15.082	22:6 - 22:6 - 22:5	1 042.93	695.62,697.66	32	6.62
15.474	22:6 - 22:5 - 20:4	1 018.92	673.66,671.63,697.65	34	0.60
15.474	22:6 - 22:6 - 20:3	1 018.92	673.66,695.64	34	
15.508	22:6 - 22:6 - 15:0	954.91	609.61,695.62	35	0.24
15.559	22:6 - 16:0 - 16:2	892.89	547.59,619.59,623.45	38	0.95
15.593	22:6 - 14:0 - 22:5	942.90	597.63,595.58,697.64	36	4.57
16.070	22:6 - 22:5 - 16:1	968.91	621.60,623.63,697.66	36	0.24
16.070	20:4 - 20:4 - 20:4	968.91	647.63	36	
16.105	22:6 - 18:3 - 16:0	918.90	573.60,623.64,645.63	38	1.61

续表 2

保留时间/min	甘油酯	母离子(m/z)	碎片离子(m/z)	ECN	相对含量/%
16.309	22:5-14:0-14:0	842.88	495.54,597.59	40	0.41
16.309	20:5-14:0-16:0	842.88	523.58,597.59,569.60	40	
16.735	22:6-22:6-18:1	994.92	649.64,695.65	36	0.49
16.769	22:6-16:0-20:4	944.90	599.62,623.64,671.61	38	1.48
16.855	22:5-22:6-22:5	1 044.93	697.65,699.65	34	1.39
16.991	16:0-16:0-16:3	818.87	545.56,551.62	42	0.38
17.246	22:6-16:0-16:1	894.89	549.59,621.60,623.63	40	
17.246	16:1-16:1-22:5	894.89	623.63,547.57	40	1.20
17.246	18:3-18:3-18:1	894.89	599.60,595.58	40	
17.246	20:4-18:3-16:0	894.89	573.56,599.60,621.60	40	
17.587	14:0-14:0-16:0	768.76	495.56,523.58	44	
17.587	16:0-16:0-12:0	768.76	495.56,551.61	44	0.57
17.775	16:0-16:0-18:4	844.88	551.62,571.57	42	0.28
17.843	22:5-18:3-16:0	920.90	573.60,625.68,647.60	40	0.52
18.047	16:0-16:0-14:1	794.86	521.55,551.62	44	0.49
18.167	22:6-22:5-16:0	970.91	623.61,625.64,697.65	38	12.76
18.303	20:4-16:0-14:0	844.88	523.58,571.59,599.62	42	0.18
18.354	22:6-22:5-18:1	996.92	649.64,651.66,697.64	38	0.23
18.456	15:0-22:6-16:0	882.89	537.58,609.58,623.59	41	0.38
18.593	22:5-16:0-14:0	870.88	523.58,597.59,625.63	42	2.94
18.593	20:5-16:0-16:0	870.88	551.61,597.59	42	
19.036	18:0-22:6-22:6	996.92	651.64,695.63	38	1.49
19.070	22:5-16:0-16:1	896.89	549.59,623.65,625.64	42	0.17
19.104	16:0-16:0-18:3	846.88	573.61,551.62	44	0.42
19.582	18:1-22:6-16:0	922.90	577.63,623.61,649.66	42	1.21
19.684	22:5-22:5-16:0	972.91	625.64,699.67	40	3.04
19.735	20:4-16:0-16:0	872.88	551.61,599.63	44	0.42
19.974	16:0-16:0-14:0	796.86	523.59,551.60	46	2.82
20.246	18:1-16:0-14:0	822.87	523.57,549.59,577.64	46	0.41
20.366	20:4-16:0-16:0	872.88	551.61,599.60	44	0.81
20.656	22:6-18:0-22:5	998.92	653.69,651.64,697.65	40	0.65
20.980	22:5-16:0-16:0	898.89	551.61,625.64	44	8.93
21.269	22:5-16:0-18:1	924.90	577.63,625.64,651.66	44	0.30
21.883	22:6-18:0-16:0	924.90	579.65,623.61,651.67	44	3.80
22.310	16:0-16:0-16:0	824.87	551.61	48	6.61
22.514	16:0-16:0-18:1	850.88	551.61,577.62	48	0.31
23.060	22:4-16:0-16:0	900.89	551.59,627.66	46	0.31
23.521	18:0-16:0-22:5	926.90	579.65,625.63,653.67	46	1.03
24.732	16:0-16:0-18:0	852.88	551.63,579.65	50	1.00

注: X-Y-Z 代表甘油三酯, 例如 16:0-16:0-18:0 表示棕榈酸-棕榈酸-硬脂酸甘油三酯, 但是甘油三酯中脂肪酸的位置分布无法确定。

由表 2 可知, 从 DHA 单细胞油脂中分离鉴定了 72 种甘油三酯, 含量大于 5% 的甘油三酯为 22:6-22:5-16:0 (12.76%), 22:5-16:0-16:0 (8.93%), 22:6-22:6-22:6 (8.78%), 22:6-22:6-22:5 (6.62%) 和 16:0-16:0-16:0 (6.61%)。Liu 等^[14] 采用液相色谱-质谱联用法分离鉴定了 5 种婴儿配方奶粉中含 DHA 的甘油三酯, 结果表明这 5

种婴儿配方奶粉中含 DHA 的甘油三酯种类及含量大致类似, 含量较高的甘油三酯为 14:0-16:0-22:6, 16:0-16:1-22:6, 16:0-18:1-22:6, 16:0-16:0-22:6 和 16:0-24:1-22:6, 含 DHA 的甘油三酯种类与本文结果存在差异, 推测二者的微生物来源可能不同。Gastaldi 等^[15] 使用 RP HPLC-APCI MS/MS 分析了人乳脂中含 DHA 的甘油三酯,

发现含量大于5%的含DHA的甘油三酯为18:1-18:1-22:6(38.17%),18:2-18:1-22:6(23.21%),16:0-18:2-22:6(12.05%),12:0-18:1-22:6(11.31%)和10:0-18:1-22:6(5.73%),表明DHA多与油酸、亚油酸、中碳链脂肪酸相结合。另外,Liu等^[14]也分析了人乳脂中含DHA的甘油三酯,结果表明含量较高的甘油三酯为16:0-18:1-22:6,18:1-18:1-22:6,18:0-18:1-22:6,16:0-18:2-22:6,16:1-18:1-22:6和16:0-16:1-22:6,同Gastaldi等^[15]的测定结果相比,说明人乳脂样品之间存在差异性。综上所述,人乳脂和DHA单细胞油脂在含DHA的甘油三酯种类及含量上均存在差异,有必要深入探讨功能脂质的甘油三酯构成与其消化吸收及代谢之间的关联性。

3 结论

DHA单细胞油脂中的主要脂肪酸是DHA、棕榈酸和DPA,还含有微量的亚麻酸、EPA和ARA。sn-2位的长链多不饱和脂肪酸总含量达到91.81%,主要是DHA和DPA,棕榈酸主要分布在sn-1,3位,占43.61%。采用UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS从DHA单细胞油脂中共鉴定出75种甘油酯,包括72种甘油三酯和3种含量较低的甘油二酯,该方法能够有效地分离鉴定DHA单细胞油脂中甘油三酯的脂肪酸组成,但是却不能判断脂肪酸在甘油骨架上的位置分布,因为脂肪酸在断裂过程中同时受到空间位阻作用和多不饱和脂肪酸本身的影响。本研究为分析特殊油脂的脂肪酸分布提供了新的途径,也为DHA单细胞油脂的后续研究提供数据参考。

参考文献:

- [1] MARTINEZ M M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development [J]. *J Pediatr*, 1992, 120:S129-S138.
- [2] 苏杭. 亚油酸和 α -亚麻酸的摄入比例对体内炎症因子及高度不饱和脂肪酸合成通路的影响[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2018.
- [3] WINWOOD R J. Recent developments in the commercial production of DHA and EPA rich oils from micro-algae [J]. *OCL*, 2013, 20(6):D604.
- [4] ARMENTA R E, VALENTINE M C. Single-cell oils as a source of *omega*-3 fatty acids: an overview of recent advances[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2013, 90(2):167-182.
- [5] SCHUCHARDT J P, HAHN A. Bioavailability of long-chain *omega*-3 fatty acids [J]. *Prostagl Leukot Ess*, 2013, 89(1):1-8.
- [6] 杨洋. 酶催化合成多不饱和脂肪酸结构酯工艺的研究[D]. 北京:北京化工大学, 2015.
- [7] NAGACHINTA S, AKOH C C. Production and characterization of DHA and GLA-enriched structured lipid from palm olein for infant formula use[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2013, 90(8):1141-1149.
- [8] ZHANG Y, WANG X, XIE D, et al. Synthesis and concentration of 2-monoacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids[J]. *Food Chem*, 2018, 250:60-66.
- [9] IRIMESCU R, IWASAKI Y, HOU C T. Study of TAG ethanalysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2002, 79(9):879-883.
- [10] SHIMADA Y, OGAWA J, WATANABE Y, et al. Regio-specific analysis by ethanalysis of oil with immobilized *Candida antarctica* lipase[J]. *Lipids*, 2003, 38(12):1281-1286.
- [11] 吴琳, 魏芳, 吕昕, 等. 长链多不饱和脂肪酸甘油酯分析方法研究进展[J]. *分析科学学报*, 2015, 31(6):871-878.
- [12] ZHOU Y, XUE Y, CHEN G C, et al. Rapid separation and characterisation of triacylglycerols in ostrich oil by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3):2098-2102.
- [13] TU A, QIANG M, HUA B, et al. A comparative study of triacylglycerol composition in Chinese human milk within different lactation stages and imported infant formula by SFC coupled with Q-TOF-MS[J]. *Food Chem*, 2017, 221:555-567.
- [14] LIU Z, COCKS B G, ROCHFORD S. Comparison of molecular species distribution of DHA-containing triacylglycerols in milk and different infant formulas by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(10):2134-2144.
- [15] GASTALDI D, MEDANA C, GIANCOTTI V, et al. HPLC-APCI analysis of triacylglycerols in milk fat from different sources[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2011, 113(2):197-207.