

分类号：(TS225.24)

密 级：公开

单位代码：10363

学号：2210510105

不同脂质组成南极磷虾油的制备及其氧化行为差异研究

Study on the preparation of Antarctic krill oil with different lipid compositions and their differences in oxidative behavior

学生姓名：	罗静茹
指导老师：	谢丹 副教授；郭玉宝 教授
专 业：	食品科学与工程
研究方向：	粮油工程

论文答辩日期：2024 年 5 月 30 日

二、安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：罗静茹

日期：2024 年 6 月 3 日

三、安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：罗静茹
日期：2024年6月3日

指导教师签名：[Signature]
日期：2024年6月3日

不同脂质组成南极磷虾油的制备及其氧化行为差异研究

摘 要

作为一种富含 n-3 多不饱和脂肪酸的新兴海洋脂质，南极磷虾油（AKO）近年来受到广泛关注。然而，AKO 脂质组成复杂且特殊，探讨不同脂质组成的 AKO 的氧化行为差异对于调控其贮藏稳定性具有重要意义。本论文围绕 AKO 组成与氧化之间的关系，以全脂南极磷虾粉为原料，制取富含中性脂质和极性脂质的 AKO，并以此为原料复配不同组成的 AKO，并评价其加速氧化过程中的脂质劣变行为差异，旨在探明 AKO 组成对其氧化稳定性的影响。

（1）以南极磷虾粉为原料，采用超临界 CO₂ 萃取与乙醇提取法最大程度上实现 AKO 两种不同极性脂质的分离，并优化工艺条件。经过单因素试验以及响应面优化试验，确定最佳的提取富含中性脂质的 AKO（S-AKO）工艺条件为：萃取压强 45 MPa、萃取温度 45℃、萃取时间 1.75 h，在该条件下所得 AKO 甘油三酯(TG)含量为 73.68%；最佳提取富含极性脂的 AKO(E-AKO)的工艺条件为：萃取时间 3 h，萃取温度 57℃，料液比 1:3，在该条件下所得 AKO 磷脂（PL）含量高达 80.19%。

（2）以 S-AKO 和 E-AKO 为原料，复配制备 11 种不同脂质比例的 AKO。通过对 PL 含量、TG 含量、微量成分含量、氧化诱导时间

的测定以及烘箱加速氧化实验等多项指标的考察,评价了不同组成的 AKO 的氧化稳定性并建立氧化动力学方程,研究了脂质组分与氧化诱导时间的相关性。结果可得出,AKO4 具有最强的氧化稳定性,其次为 AKO2、AKO3、AKO5,而 AKO10 的氧化稳定性最差。这一结果说明,当 AKO 中的脂质组分为一定比例存在时,氧化稳定性才能达到最高。根据不同成分与氧化诱导时间之间的 Pearson 相关系数。发现 TG、虾青素、维生素 A、生育酚和 PL 含量都与氧化诱导时间高度相关。但只有 PL 与 AKO 的氧化稳定性呈正相关,说明 AKO 的氧化稳定性主要由 PL 含量决定。此外,在加速氧化实验中,EPA 和 DHA 在 11 种 AKO 中的变化符合零级动力学模型和一级动力学模型,且 AKO4 中 EPA 与 DHA 表现的氧化速率最低,这与 Oxitest 氧化诱导时间表现出来的结果一致,同时,虾青素、维生素 A 和生育酚在 11 种 AKO 的加速氧化期间稳定性总体呈现下降趋势,但 PL 含量较高的 AKO 的生育酚含量随贮藏期间呈现短暂回升现象,证实了 PL 与生育酚的抗氧化协同作用。

(3) 采用脂质组学的方法对三种脂质差异悬殊的 AKO 进行了定性定量分析,总共鉴定出 41 种脂质亚类以及 4812 种脂质分子。以 $VIP>1$, $P \text{ value}<0.05$, $FC>2$ 或 $FC<0.5$ 为阈值,筛选不同脂质组成 AKO 以及相同脂质组成 AKO 在不同氧化阶段的显著差异脂质。PC(22:1-22:6)可作为区别未氧化 AKO 之间的脂质标记物; Cer(35:3)可作为区别氧化 AKO 之间的脂质标记物。在氧化过程中低磷脂 AKO

中变化显著的差异脂质主要为甘油磷脂和甘油酯，而高磷脂 AKO 中则较多的是鞘磷脂型的脂质。这些脂质可作为氧化标记物区分不同种类的 AKO，以及氧化 AKO 的质量评价。

关键词：南极磷虾油，脂质制备，脂质组成，氧化稳定性，脂质组学

Study on the preparation of Antarctic krill oil with different lipid compositions and their differences in oxidative behavior

ABSTRACT

As an emerging marine lipid rich in n-3 polyunsaturated fatty acids, Antarctic krill oil (AKO) has received much attention in recent years. However, the lipid composition of AKO is complex and specific, and exploring the differences in the oxidative behaviour of AKO with different lipid compositions is important for regulating its storage stability. In this thesis, the relationship between AKO composition and oxidation was investigated. AKOs enriched with neutral and polar lipids were prepared from full-fat Antarctic krill meal, and AKOs with different lipid compositions were formulated and evaluated for differences in their lipid degradation behaviour during accelerated oxidation. The aim was to explore the effect of AKO composition on its oxidative stability.

(1) Based on Antarctic krill meal, supercritical carbon dioxide extraction and ethanol extraction were used to maximally separate the two different polar lipids of AKO, and the process conditions were optimised. After one-way and response surface optimisation tests, the optimum process conditions for the extraction of neutral lipid-rich AKO (S-AKO) were determined as follows: extraction pressure 45 MPa, extraction temperature 45 °C, extraction time 1.75 h, and the content of AKO triglyceride (TG) obtained under these conditions was 73.68%; the best process conditions for extracting AKO rich in polar lipids(E-AKO)

were: 3 h extraction time, 57 °C extraction temperature, 1:3 material-liquid ratio, under which the obtained AKO phospholipid (PL) content was up to 80.19%.

(2) 11 AKOs with different lipid ratios were prepared from S-AKO and E-AKO. The oxidative stability of the AKOs with different compositions was evaluated and oxidation kinetic equations were established by examining a number of indexes, such as the PL content, the TG content, the content of trace components, the measurement of oxidation induction time, and the accelerated oxidation experiments in an oven, etc. The correlation between the lipid fractions and oxidative induction time was investigated. It can be concluded that AKO4 has the strongest oxidative stability, followed by AKO2, AKO3, AKO5, and AKO10 has the worst oxidative stability. This conclusion suggests that the highest oxidative stability is achieved when the lipid components in AKO are present in a certain ratio. Based on the Pearson correlation coefficients between different components and oxidation induction time, TG, astaxanthin, vitamin A, tocopherol and PL content were found to be highly correlated with oxidation induction time. However, only PL was positively correlated with the oxidative stability of AKO, indicating that the oxidative stability of AKO was mainly determined by PL content. In addition, in the accelerated oxidation experiments, the changes of EPA and DHA in the 11 AKOs were consistent with the zero-order kinetic model and the first-order kinetic model, and the lowest oxidation rate was exhibited by EPA and DHA in AKO4, which was consistent with the results exhibited by the Oxitest oxidation induction time, and at the same time, astaxanthin, vitamin A, and tocopherol in the accelerated oxidation of 11 AKOs generally showed a decreasing trend, but the tocopherol content of AKO with higher PL content showed a transient rebound

during storage, confirming the antioxidant synergistic effect of PL and tocopherol.

(3) A qualitative and quantitative analysis of three AKOs with disparate lipid profiles was performed using a lipidomic approach, and a total of 41 lipid subclasses as well as 4812 lipid molecules were identified. $VIP > 1$, $P \text{ value} < 0.05$, $FC > 2$ or $FC < 0.5$ were used as thresholds to screen for significantly different lipids in different lipid composition AKOs as well as the same lipid composition AKOs at different oxidation stages. PC(22:1-22:6) can be used as a lipid marker to distinguish between unoxidised AKO; Cer(35:3) can be used as a lipid marker to distinguish between oxidised AKO. Differential lipids that changed significantly during oxidation in low-phospholipid AKOs were mainly glycerophospholipids and glycerolipids, whereas sphingomyelin-type lipids were more prevalent in high-phospholipid AKOs. These lipids can be used as oxidation markers to distinguish different kinds of AKOs and for quality evaluation of oxidised AKOs.

KEY WORDS: Antarctic krill oil, Lipid preparation, Lipid composition, Oxidative stability, Lipidomics

缩略词说明

缩略词	英文全称	中文全称
AKO	Antarctic krill oil	南极磷虾油
S-AKO	Supercritical CO ₂ extraction of AKO	超临界 CO ₂ 提取的 AKO
E-AKO	Ethanol extract of AKO	乙醇提取的 AKO
TG	Triglyceride	甘油三酯
DG	Diacylglycerol	甘油二酯
MG	Monoacylglycerol	甘油一酯
Lys	Lysine	赖氨酸
EPA	Eicosapentaenoic Acid	二十碳五烯酸
DHA	Docosahexaenoic acid	二十二碳六烯酸
PUFA	Polyunsaturated fatty acid	多不饱和脂肪酸
MUFA	Monounsaturated fatty acid	单不饱和脂肪酸
SFA	Saturated fatty acid	饱和脂肪酸
FFA	Free fatty acid	游离脂肪酸
EE	Ethyl ester	乙酯
PCC	Pearson correlation coefficient	皮尔逊相关系数
ABTS	2,2-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt	2, 2-连氮-双-（3-乙基苯并噻唑-6-磺酸）二铵盐阳离子
COPs	Cholesterol oxidation products	胆固醇氧化产物
TSO	Tocopherol stripped olive oil	剥离生育酚的橄榄油
TAO	Tocopherol-added olive oil	添加生育酚的

		橄榄油
ROOH	Hydroperoxide	氢过氧化物
LPL	Low phospholipid AKO	低磷脂 AKO
MPL	Medium phospholipid AKO	中磷脂 AKO
HPL	High phospholipid AKO	高磷脂 AKO
QC	Quality control samples	质控样本
GL	Glycerolipid	甘油脂
GP	Glycerophospholipid	甘油磷脂
SP	Sphingolipid	鞘脂
ST	Sterol lipid	固醇脂
FA	Fatty acid	脂肪酸
PR	Prenol lipid	孕烯醇酮脂
SL	Saccharolipid	糖脂
PK	Polyketide	多聚乙烯
OAHA	(O-acyl)- ω -hydroxy fatty acids	羟基脂肪酸
WE	Wax ester	蜡萃取物
CL	Cardiolipin	心磷脂
LPA	Lysophosphatidic acid	溶血磷脂酸
LPC	Lysophosphatidylcholine	溶血磷脂酰胆碱
LPE	Lysophosphatidylethanolamine	溶血磷脂酰乙醇胺
LPG	Lysophosphatidylglycerol	溶血磷脂酰甘油
LPI	Lysophosphatidylinositol	溶血磷脂酰肌醇
LPS	Lysophosphatidylserine	溶血磷脂酰丝氨酸
PL	Phospholipid	磷脂
PC	Phosphatidylcholine	磷脂酰胆碱
PE	Phosphatidylethanolamine	磷脂酰乙醇胺

PA	Phosphatidic acid	磷脂酸
PI (PIP、PIP2、 PIP3)	Phosphatidylinositol	磷脂酰肌醇
PG	Phosphatidylglycerol	磷脂酰甘油
PS	Phosphatidylserine	磷脂酰丝氨酸
Co	Coenzyme	辅酶
CerG2GNAC1、 CerG23GNAC2	Glycosylceramide	糖基神经酰胺
AcCa	Acyl-carnitines	脂肪酰肉碱
Cer	Ceramide	神经酰胺
Cerp	Ceramide phosphate	磷酸神经酰胺
GM	Ganglioside	神经节苷脂
HeX1Cer/HeX2 Cer/HeX3Cer	Hexosylceramide	己糖神经酰胺
phSM	PhytoSphingomyelin	植物鞘氨醇
SM	Sphingomyelin	鞘磷脂
SPH	Sphingosine	鞘氨醇
SPHP	Sphingosinephosphate	磷酸鞘氨醇
ChE	Cholesteryl ester	胆固醇酯
ZyE	Zymosterol	酵母甾醇
SiE	Sitosteryl palmitate	谷甾醇酯
ST	Sulfolipid	硫脂
StE	Soybean sterol esters	豆甾醇酯
FC	Fold-change	差异倍数
VIP	Variable important for the Projection	VIP 得分值
OPLS-DA	Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis	正交偏最小二乘 判别分析
PCA	Principal component analysis	主成分分析

目 录

摘 要	I
ABSTRACT.....	IV
缩略词说明	VII
目 录	X
第 1 章 绪论	1
1.1 AKO 概述	1
1.2 AKO 的脂质组分对其氧化稳定性的影响	2
1.2.1 PL	2
1.2.2 FFA	3
1.2.3 酰基甘油 (TG、DG、MG)	4
1.2.4 微量成分	5
1.2.4.1 虾青素	5
1.2.4.2 维生素	5
1.2.4.3 甾醇	6
1.3 AKO 氧化稳定性研究现状	7
1.3.1 AKO 氧化过程中各脂质劣变规律.....	7
1.3.2 AKO 氧化过程中的美拉德褐变反应.....	8
1.3.3 AKO 氧化过程中的协同作用.....	9
1.3.4 AKO 的氧化机制.....	11
1.4 本课题的研究内容.....	13
1.5 本课题的研究意义.....	13
第 2 章 不同极性脂质组分的 AKO 提取及工艺优化	15
2.1 引言.....	15
2.2 实验材料与仪器.....	15

2.2.1 实验材料与试剂	15
2.2.2 实验仪器与设备	16
2.3 试验方法	16
2.3.1 超临界 CO ₂ 萃取法提取富含中性脂质的 AKO	16
2.3.2 乙醇提取法提取富含极性脂质的 AKO	16
2.3.3 脂质提取率的计算	16
2.3.4 AKO 中 TG 与 PL 含量的测定	16
2.3.5 AKO 中微量物质含量的测定	16
2.3.6 AKO 中脂肪酸含量的测定	17
2.3.7 分离不同极性脂质的工艺优化	17
2.3.7.1 超临界 CO ₂ 提取富含中性脂质的 AKO	17
2.3.7.2 乙醇溶剂提取富含极性脂质的 AKO	17
2.3.8 数据统计与分析	18
2.4 结果与讨论	18
2.4.1 超临界 CO ₂ 提取富含中性脂质的 AKO	18
2.4.1.1 超临界 CO ₂ 提取富含中性脂质 AKO 的单因素试验结果分析 ...	18
2.4.1.2 超临界 CO ₂ 提取富含中性脂质 AKO 的响应面优化试验结果分析	19
2.4.1.3 模型的建立与显著性的分析	20
2.4.1.4 响应面分析	22
2.4.1.5 最佳工艺条件预测及验证	23
2.4.2 乙醇溶剂提取富含极性脂质的 AKO	23
2.4.2.1 乙醇溶剂提取富含极性脂质 AKO 的单因素试验结果分析	23
2.4.2.2 乙醇溶剂提取富含极性脂质 AKO 的响应面试验结果分析	23
2.4.2.3 模型的建立与显著性的分析	25
2.4.2.4 响应面分析	27
2.4.2.5 最佳工艺条件预测及验证	28
2.4.3 两种极性不同的 AKO 脂质组成	28

2.5 本章小结	30
第 3 章 AKO 脂质组成对其氧化稳定性的影响	31
3.1 引言	31
3.2 材料与方法	31
3.2.1 实验材料	31
3.2.2 实验试剂	31
3.2.3 实验设备	31
3.2.4 实验方法	32
3.2.4.1 不同脂质组成的 AKO 体系的构建	32
3.2.4.2 不同脂质组成的 AKO 的组成分析	32
3.2.4.3 不同脂质组成 AKO 氧化诱导时间的测定	32
3.2.4.4 不同脂质组成 AKO 的烘箱加速氧化实验	32
3.2.4.5 数据分析	33
3.3 结果与分析	34
3.3.1 不同脂质组成的 AKO 的组成分析	34
3.3.1.1 TG 含量与 PL 含量	34
3.3.1.2 脂肪酸组成	34
3.3.1.3 微量物质	38
3.3.2 AKO 脂质组成与氧化稳定性的相关性	40
3.3.2.1 不同脂质组成的 AKO 氧化诱导时间	40
3.3.2.2 脂质组成与氧化诱导时间的相关性系数分析	41
3.3.3 不同脂质组成 AKO 的加速氧化实验	42
3.3.3.1 不同脂质组成 AKO 加速氧化过程中 EPA 与 DHA 的变化	42
3.3.3.2 不同脂质组成 AKO 加速氧化过程中虾青素的变化	45
3.3.3.3 不同脂质组成 AKO 加速氧化过程中维生素 A 的变化	46
3.3.3.4 不同脂质组成 AKO 加速氧化过程中生育酚的变化	47
3.4 本章小结	47
第 4 章 加速氧化过程对不同脂质组成 AKO 脂质氧化的影响	49

4.1 引言	49
4.2 试验材料与仪器设备	49
4.2.1 药品与试剂	49
4.2.2 仪器与设备	49
4.3 实验方法	49
4.3.1 样本的制备	49
4.3.2 AKO 的加速氧化	50
4.3.3 样本预处理方法	50
4.3.4 色谱-质谱分析	50
4.3.5 数据分析流程	50
4.4 结果与分析	51
4.4.1 AKO 脂质的数据质量评价	51
4.4.2 AKO 脂质鉴定数量统计和脂质轮廓分析	51
4.4.3 低、中、高磷脂含量的三种 AKO 氧化前的脂质组成差异	53
4.4.3.1 三种未氧化 AKO 中各亚类脂质含量占比	53
4.4.3.2 三种未氧化 AKO 的脂质组学数据多元统计分析	55
4.4.3.3 三种未氧化 AKO 的显著差异脂质筛选	56
4.4.4 低、中、高含量的三种 AKO 氧化 24 d 后的脂质组成差异	59
4.4.4.1 三种氧化 AKO 中各亚类脂质含量占比	59
4.4.4.2 三种氧化 AKO 的脂质组学数据多元统计分析	60
4.4.4.3 三种氧化 AKO 的显著差异脂质筛选	61
4.4.5 加速储藏过程对低、中、高磷脂含量的三种 AKO 脂质代谢的影响	63
4.4.5.1 三种 AKO 在加速氧化过程中各亚类脂质含量的变化	63
4.4.5.2 三种 AKO 在加速氧化过程中脂质变化多元统计分析	64
4.4.5.3 三种 AKO 在加速氧化过程中的显著差异脂质筛选	65
4.5 本章小结	72
第 5 章 主要结论与展望	73
5.1 主要结论	73
5.2 创新点	74

5.3 展望.....	74
参考文献	75
攻读学位期间发表的学术论文	84
致谢	85

第1章 绪论

1.1 AKO 概述

南极磷虾是一类分布于南极洲的小型甲壳类浮游生物^[1]，尽管磷虾体型较小，但它是地球上数量最多的单体生物。自 2000 年以来，所有渔业的年度总捕获量约为 1.3 亿吨^[2]。相比之下，磷虾的生物量估计为 3.42 ~ 5.36 亿吨^[3]，而每年磷虾的实际捕获量仅为 40 万吨。这说明南极磷虾作为一种海洋资源还具有很大的开发空间，但这需要与生态发展相协调。

南极磷虾不仅储备资源丰富并且营养价值高，还富含高质量的蛋白质和脂质^[4]，作为营养食品具有很强的开发价值。随着近海渔业资源日益萎缩，AKO 因其丰富的含油量（12~50%）被认为是一种极具潜力的海洋鱼油替代资源，受到学术界及产业界广泛关注。同鱼油一样，AKO 中富含 n-3 PUFA（30~45%），如 EPA（11~20%）和 DHA（8~14%）^[4]。但鱼油中的 n-3 PUFA 主要与 TG 结合，而 AKO 中的 n-3 PUFA 主要与 PL 结合^[5-7]，这种特殊的结构使得 AKO 与鱼油比起来更容易被人体吸收，有着较高的生物利用度^[8,9]。此外，虾青素、生育酚、维生素 A、甾醇等次要成分也以不同的比例存在于 AKO 中。这些生理活性成分对人体健康具有诸多益处^[10-12]，如促进生长发育、预防心脑血管疾病、预防炎症、抗癌、治疗代谢综合征和/或非酒精性脂肪肝疾病等。

然而 AKO 作为一种含有高浓度 n-3 PUFA 的油脂，极易发生氧化劣变，使其营养价值降低并产生有毒化合物^[13]。不过 AKO 中的 n-3 PUFA 多结合在 PL 的 sn-2 位上，这种结构可以阻碍氧气和自由基攻击这个位置的 PUFA，从而可以防止 PUFA 氧化生成氢过氧化物（ROOH）。但 AKO 脂质组成复杂，其中既含有促氧化的组分，如 PUFA、FFA、DG、MG 还有金属离子等。也包含抗氧化的组分，如 PL、虾青素、生育酚、甾醇等^[4,7]。这些组分含量基于季节、产地、年份、磷虾的性别以及成熟度的不同有着很大差异，并且目前 AKO 的加工方法尚未标准化，这使得市面上 AKO 产品的质量差异较大^[14]，这也为系统的研究 AKO 的氧

化带了困难。

近年来,随着对脂质氧化研究的不断深入,传统的自由基链式反应模式过于简单,已不足以表达出脂质氧化中的各种竞争性副反应。Lu 等^[15]在 AKO 氧化体系中检测到了五种 Strecker 降解产物,这证明了 AKO 氧化的同时还发生了美拉德褐变反应。这也说明在 AKO 这种多组分的复杂体系中,其中的自动氧化过程可能伴随多种反应的发生。然而目前关于 AKO 的研究主要集中于工艺提取以及生理活性上,有关 AKO 中不同脂质组分在自动氧化过程中的具体劣变规律差异尚缺少科学系统的研究,这使得目前对 AKO 氧化稳定性的调控依然存在着困难。

1.2 AKO 的脂质组分对其氧化稳定性的影响

1.2.1 PL

传统鱼油中大多为中性脂质^[16],而 AKO 以极性脂质为主,基于原料以及分析方法的不同,AKO 的 PL 含量为 40~58%^[17]。多项研究^[18,19]表明,AKO 中的 PL 含量越高,其所表现出来的氧化稳定性也越高。Gigliotti 等^[20]通过比色抗氧化测定法(ABTS 法)来比较丙酮、乙醇、丙酮:乙醇(1:1, v/v)混合溶剂所提虾油的氧化稳定性。结果发现,采用乙醇溶液提取虾油的氧化稳定性最高,同时乙醇溶剂对 PL 成分有较强的溶解性,因此有理由推测 AKO 中的 PL 组分可表现出较强的氧化稳定性。Xie 等^[19]通过 DPPH 自由基清除实验比较了三种不同溶剂(丙酮、正己烷、乙醇)所提虾油的抗氧化能力,结果显示乙醇所提虾油的 PL 含量最高,抗氧化活性也最高。同时,该研究还比较了不同虾油组分(PL、虾青素、生育酚、维生素 A、胆固醇)与抗氧化能力之间的 PCC,结果发现 AKO 中的 PL 是唯一与抗氧化能力呈正相关的化合物,表明 AKO 的抗氧化能力主要受 PL 含量的影响。

同鱼油一样,AKO 中富含 PUFA,这些化合物具有高度的促氧化性,但在 AKO 中却没有体现。这是由于 AKO 中的 EPA(13.8~20.3%)和 DHA(5.6~17.4%)多以 PL 的形式存在。而 TG 形式的 EPA(2.83~3.48%)和 DHA(1.40~1.74%)含量则较少。有研究^[21,22]认为,以 PL 形式存在的 PUFA 比 TG 型 PUFA 的氧化稳定性更高。如在 Xie 等^[22]的研究中,25℃储存下的 TG 形式的 PUFA 的氧化

率常数(k)明显高于 PL 形式。TG 形式的 EPA 和 DHA 的 k 分别为 0.278 和 0.330, 比 PL 形式的 k (分别为 0.205 和 0.212) 高 1.356 和 1.557 倍。Gigliotti 等^[20]研究发现 EPA 在 PL 和 TG 中的含量比大致为 12:1, DHA 为 16:1, 证实了 AKO 中的 EPA 和 DHA 多以 PL 状态存在^[23]。Song 等^[24]研究了以 PL、TG 和 EE 三种形式存在的含 DHA 的油, 分别在 25 ℃ 的黑暗中储藏 10 周的氧化趋势。通过气相色谱分析发现, PL 油在氧化十周后仅损失 10% 的 DHA, 而 TG 和 EE 油则分别损失了高达 97% 和 64% 的 DHA。同时, 通过比较三种油的氧化诱导期发现, TG 的氧化诱导期 (25 d) 比 EE (57 d) 短得多, 但 PL 则没有显示出任何明确的诱导期。这说明三种形式的 PUFA 中, PL 型的氧化速率最低, 而 TG 型的氧化速率最高。这也证实了在三种形式的油中, 如果比较具有相同脂肪酸组成的油的氧化稳定性, PL 的形式更佳。这可能是由于 AKO 中的 PUFA, 特别是 EPA、DHA 大多数位于 PL 的 sn-2 位, PL 分子的紧密结构可以阻止自由基和氧气攻击这个位置的 PUFAs, 从而抑制 ROOH 的形成^[16]。

1.2.2 FFA

常规食用油为了提高油脂品质通常会进行精炼操作, 如: 脱胶、脱臭、中和、脱色^[25]。这一过程用于除去油脂中的 PL、挥发性氧化产物、FFA、色素等物质。但 AKO 含有较多的有益活性成分, 为了保留这些成分, AKO 的加工通常不进行精炼程序, 这也就导致 AKO 中还残留很多会促进油脂氧化的物质, 如 FFA。

由于目前市面上对 AKO 的质量并没有统一的标准, 这也就导致不同厂家采用不同加工工艺生产出来的虾油质量参差不齐^[14]。一般来讲, AKO 中的 FFA 含量通常高于普通食用油 (0.02~0.7%)^[26,27]。基于南极磷虾本身品质以及生产加工工艺的不同, 商品 AKO 中 FFA 含量占总脂质的 8~13%, 其绝大多数 (89~93%) FFA 来源于在 AKO 的加工储藏或是运输过程中, PL 在内源性 PL 酶的作用下发生的水解反应, 且主要来自 sn-2 位置, 其水解程度是 sn-1 位置的 8 倍。有研究发现^[28], 在 -35℃ 下储存 4 年的磷虾中的 FFA 含量 (16% 湿重) 是新鲜磷虾的两倍 (8.5% 湿重)。这证实了即使在较低的储藏温度下, 高活性内源酶也存在对 PL 的残余脂肪的分解活性。

FFA 是脂质氧化的主要底物, 并且 FFA 的化学结构使得它们对脂质氧

化有着催化作用。有研究表明^[29,30], FFA 的羧酸头基是它们具有促氧化活性的主要因素, 这可能是由于羧酸头基团可催化 ROOH 分解并产生自由基, 而自由基将促进脂质自动氧化反应, 从而加速脂质氧化。此外, 不饱和脂肪酸会降低自由基链式反应所需的活化能^[26]。也就是说, 饱和的 FFA 与不饱和的 FFA 都会促进脂质氧化, 但不饱和的 FFA 的促氧化能力更强。而 AKO 的 FFA 中含有较高浓度的 PUFA, 这样的脂肪酸组成会使 FFA 存在于 AKO 中具有较大的促氧化活性。

1.2.3 酰基甘油 (TG、DG、MG)

传统食用油的脂质组成较为单一, 其中酰基甘油的含量高于 98%, TG 的含量高达 95%。而 AKO 的脂质组成复杂, 如图 1-1 所示, 除了含量最高的 PL(48.9%)组分以外, 还含有数量略低于 PL 的 TG (43.7%), 伴随有少量的 DG (6.2%) 以及微量的 MG(<0.1%)、甾醇和 FFA (<1.0%) 等多种极性不同的脂质组分^[5]。

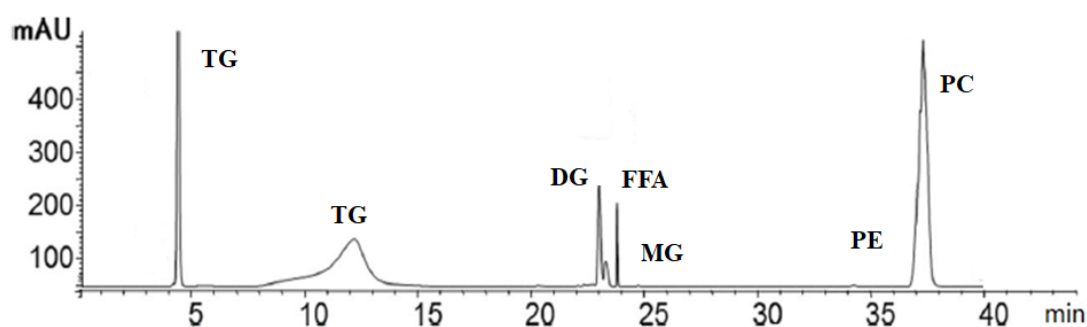


图 1-1 AKO 脂质组成^[5]

Figure 1-1 Lipid composition of the AKO

注: AKO, 南极磷虾油; TG, 甘油三酯; DG, 甘油二酯; FFA, 游离脂肪酸; MG, 单甘酯; PE, 磷脂酰乙醇胺; PC, 磷脂酰胆碱

虽然 AKO-TG 中大多为 SFA, 但这并不意味着 AKO-TG 没有氧化劣变的可能。Castro-Gómez 等^[5]将 AKO 分馏成脂质组成不同的三个组分 (F1、F2、F3), 其中 F1 主要成分为 TG, F2 主要成分为 MG, F3 主要成分为 PL, 并分别分析这三种组分的脂肪酸组成。研究发现, 虽然 AKO 中有近一半的 SFA (52.98%) 与 TG 结合, 但没有一种 TG 分子是完全饱和的, 这是由于大量的 MUFA (35.59%) 与 TG 相结合, 并且有将近 44% 的 TG 分子中含有 n-3 PUFA。因此, 虽然 AKO 的 TG 中 n-3 PUFA 含量不高 (11.43%), 但是 PUFA 在 TG 中分布广泛, 这使得

AKO 的 TG 在不饱和脂肪酸的促氧化作用下仍有发生氧化劣变的可能。此外, 在有水分存在的情况下, TG 容易被水解断裂进而逐步脱酰基生成 DG、MG、FFA 和甘油, 这一步不仅增加了促氧化 FFA 的含量, 还会使得 DG 和 MG 的含量增多^[31]。与 TG 比起来, DG 的不饱和度更高, DG 的脂肪酸分子中有高达 64% 是不饱和成分, 其中, n-3 PUFA 占总脂肪酸的 36.02%。这使得 DG 更容易受到不饱和脂肪酸促氧化的影响。此外, 虽然 AKO 中 DG 与 MD 的含量远远低于 TG, 但由于 DG 与 MG 具有乳化性, 会降低食用油脂的表面张力, 增加氧气扩散到油中的速度^[32], 从而加速油的氧化。

1.2.4 微量成分

1.2.4.1 虾青素

AKO 中的虾青素含量约 40~5000 mg/kg^[8,33], 波动很大, 主要受磷虾原料、提取方法以及分析方法的影响。据报道^[34], 虾青素的抗氧化活性高于角黄素、 β -胡萝卜素、玉米黄质、叶黄素、 α -生育酚等。由于虾青素在多烯链中含有长的共轭双键, 可终止油脂的自动氧化链式反应, 从而发挥抗氧化活性。当受到氧的攻击时, 虾青素可通过自身优先被氧化, 从而使得虾油中的其他脂质免于氧化降解^[35]。因此, AKO 得益于其高浓度的虾青素含量, 从而获得了较高的氧化稳定性。不过有些研究表示^[20], 虾青素并不是对虾油氧化稳定性贡献最大的成分。Xie 等^[36]比较了含虾青素最高的虾油 (A-KO) 与含 PL 最高的虾油 (E-KO) 的抗氧化能力有何差异, 结果显示 A-KO 的抗氧化活性远低于 E-KO, Gigliotti 等^[37]也得到了相同的结论。但这并不代表 AKO 中的虾青素没有抗氧化能力, 相反, AKO 的抗氧化能力远高于其他一些具有抗氧化能力的植物油, 如初榨橄榄油、芝麻油、沙棘油。这说明南极磷虾虾青素是一种抗氧化活性很高的物质, 它天然存在于 AKO 中, 为提高 AKO 的储藏稳定性做出了较大贡献。

1.2.4.2 维生素

维生素 E 是生育酚类物质的总称, AKO 中的生育酚含量约为 7.36~26.10 mg/100 g, 其中主要以 α -生育酚为主 (14.74~22.27 mg/100 g)。 α -生育酚是 AKO 中重要的微量活性物质, 在生育酚属中的抗氧化活性最高, 是使用最广泛的天然抗氧化剂。Lee 等^[38]通过各种色谱技术和质谱分析确定了 AKO 中的抗氧化物

质之一为 α -生育酚，其团队使用硅胶柱将 AKO 分馏成多个脂质组分，并通过烘箱加速氧化实验对这些组分进行抗氧化活性测定，显示被正己烷/乙醚洗脱的馏分有明显的抗氧化作用。通过气相色谱和质谱技术对该组分进行分析得知该组分为 α -生育酚。由于脂质过氧自由基与生育酚的反应速度比与脂质的反应速度快得多^[39]，因此生育酚会与不饱和脂肪酸和油争夺脂质过氧自由基。生育酚可以将其色环上 6-羟基的一个氢原子转移到脂质过氧自由基上，清除过氧自由基，并产生 ROOH 和生育酚氧自由基。由于共振结构，生育酚氧自由基比 ROOH 更稳定，这减缓了在自动氧化的传播阶段的油氧化速率。 α -生育酚自由基可与链式反应中的其他自由基结合，生成较稳定的脂质化合物，从而脱离脂质自动氧化链式反应^[40]。

AKO 中含有维生素 A（16.40~28.55 mg/100 g）^[7]，也具有一定的抗氧化能力，能灭活自由基、结合和稳定过氧化氢结构。有报道称^[42]，维生素 A 烯烃链越长，其稳定自由基能力就越强。不过维生素 A 在 AKO 中的抗氧化作用还没有得到证实。

1.2.4.3 甾醇

AKO 中脂溶性甾醇类物质占总脂类的 4~7%，所含的甾醇种类较多，包括胆固醇（80~100%）、去甲甾醇（0~18%）、24-去氢胆固醇（0.1~1.7%）、22-脱氢胆固醇（6~11%）、反式去氢胆固醇（1.1~1.5%）、黄铜甾醇（0.5~1.7%）、24-亚甲基胆固醇（0.1~0.4%），以及其他两种甾醇（0.1~0.2%）^[41,42]。这些微小的差异可能是由于磷虾食物来源的变化，甲壳类动物不能合成新的甾醇，这些甾醇可能来自饮食中植物甾醇去烷基化，或者直接来自饮食。

某些植物源甾醇可在长时间加热过程中延缓油的氧化变质，不过在 AKO 中，甾醇类物质中的主要成分为胆固醇（17~76.3 mg/g）^[43]，并不具备上述的抗氧化能力。此外，AKO 在油脂加工、贮藏、运输等过程中受光、热、氧作用时，胆固醇会发生自动氧化反应而生成多种胆固醇氧化产物（COPs）^[44]。多数研究认为 COPs 有可能参与大多数慢性病的发生和发展，包括动脉粥样硬化、神经退行性过程、糖尿病、肾衰竭和乙醇中毒^[45,46]，在 AKO 生产中应减少 COPs 产生。AKO 中高浓度的不饱和脂肪酸的氧化会与甾醇的氧化互相影响，一方面，不饱

和程度较高的脂类可以与甾醇竞争氧气,并通过自我氧化减少后者的氧化。另一方面,来自脂质氧化的自由基会对甾醇产生促氧化作用,加快甾醇氧化降解^[47]。不过在现阶段还缺少对 AKO 中甾醇类物质的抗氧化活性及其氧化机制的研究。

1.3 AKO 氧化稳定性研究现状

1.3.1 AKO 氧化过程中各脂质劣变规律

如上所述, AKO 脂质组成复杂,不同的脂质组成是否会影响 AKO 氧化劣变行为? Xie 等人^[22]意识到不同脂质氧化劣变具有差异性的问题,研究了在 25℃ 储存期间干贝内收肌中不同脂质类别的氧化敏感性之间的差异,结果发现 TAG 形式 PUFA 的氧化速率常数(k)显著高于 PL 形式 PUFA。Song 等^[24]分别检测了脂肪酸组成完全相同的 PL 和 TG 在 25℃ 的黑暗条件下储藏 10 周的氧化趋势,也得到相同的结论。研究发现,大多数 PL 型的 PUFA 在氧化十周后仅略微损耗,而 TG 型的 PUFA 则以较快的速度衰减。如 PL 型的 EPA 在氧化五周后就已停止氧化,损耗率为 26.9%,而 TG 型的 EPA 在氧化第五周时就已下降了 38.7%,而到第十周时, TG-EPA 的损耗率高达 90.3%,说明 TG-PUFA 比 PL-PUFA 易发生氧化劣变。而在 AKO 中这些脂质劣变规律则更为复杂, Song 等^[48]通过电焊铁离子源联用快速蒸发电离质谱的方法实时监测 AKO 中脂质组分氧化特性的动态变化。结果显示,不同 PL 组分在储藏期间内的含量变化差异明显,如: m/z707.50 (【PA-18:0/20:5-H】⁻)、721.50 (【PE16:1/20:3-NH₃】⁻和【PC16:0/20:3-N(CH₃)₃】⁻) 离子的丰度随着储藏天数的延长而持续下降,到第 15 天则完全消失。相反, m/z833.49 (【PI16:1/18:1-H】⁻)、837.54 (【PI16:0/18:0-H】⁻) 离子的含量在储存期间则持续增加。此外还观察到, ΣEPA、ΣDHA、ΣMUFA、ΣPUFA 的丰度明显下降,而 ΣSFA 的数量在贮藏期间明显升高,抗氧化物虾青素在储存期间显著下降,从 269.67 mg/kg 下降到 120.00 mg/kg,并且 AKO 脂质离子的信噪比在储存期间逐渐下降,这些迹象都证明了 AKO 的氧化酸败,并且在这一过程中,不同脂质组分的变化趋势不同。但其团队只研究了 AKO 中 PL 分子和虾青素的氧化趋势,对 TG、DAG、MAG 等脂质组分的氧化趋势还缺少研究。

AKO 中存在高活性的内源性脂肪酶,不仅会将 PL 水解为 FFA 和溶血磷脂,还会将 TG 水解为 DAG、MAG、FFA 和甘油。这些成分不仅自身极易被氧化而

且还对油脂系统有促氧化作用^[33]，且 FFA 形式的脂肪酸（FA）比酯化形式 FA 更容易被氧化，因为它们具有更大的捕获微量金属的能力。但目前关于 TG、MG、DG 和 FFA 等其他脂质组分在 AKO 中的氧化趋势还尚未有人研究，因此对 AKO 中不同脂质组分的氧化行为差异进行探讨，这对于建立一个全面综合的 AKO 氧化理论体系，从而有效调控 AKO 的储藏稳定性具有重要意义。

1.3.2 AKO 氧化过程中的美拉德褐变反应

AKO 的氧化过程还会发生非酶褐变反应。一般来讲，美拉德反应是指氨基酸的亲核氨基与还原糖的活性羰基之间的反应，然而除了来自糖或碳水化合物的活性羰基外，脂质氧化也会产生能与初级胺基发生美拉德反应的活性 α -二羰基脂质氧化产物^[49]。AKO 的体系中存在的氨基酸^[15]以及含有伯胺基团的 PE 会与 AKO 脂质氧化产物发生非酶褐变反应并产生羰基-胺反应产物。

在 AKO 的加工和储藏过程中由于脂质氧化反应形成二级挥发性氧化产物/羰基化合物（如 α ， β -不饱和醛），继而形成三级脂质氧化产物（类似于碳水化合物的 α -二羰基衍生物），如不饱和环氧酮脂肪酸酯、环氧烯醛和羟基烯醛，这类含有两个含氧官能团的化合物可以与 PE 的伯胺基或游离氨基酸发生非酶褐变反应^[21]。如图 1-2 所示，AKO 中的非酶褐变反应有以下三组机制（1）机制 A：如果 AKO 中存在氨基酸残基，则进行 Strecker 降解反应^[50]。Thomsen 等^[51]在 40℃ 下储存的 AKO 中检测到了五种 Strecker 降解产物，即 2-甲基丁醛、3-甲基丁醛、二甲基二硫化物、1-甲基-1H-吡咯和吡啶。Ventanas 等人^[52]认为，3-甲基丁醛和 2-甲基丁醛是分别来自亮氨酸和异亮氨酸的 Strecker 降解产物，而二甲基二硫化物是来自蛋氨酸的 Strecker 降解产物。这些 Strecker 降解产物只能在 AKO 中检测到（对比鱼油），因为 AKO 含有残留的氨基酸，允许它们的形成。此外，Lu 等人^[21]认为 PE 也能与脂质氧化产物反应产生 Strecker 降解产物，如 2-甲基-2-丁烯醛和 2-甲基-2-戊烯，但是数量低于氨基酸的产生量；（2）机制 B：脂质氧化产物与氨基酸发生反应，生成亲水性吡咯^[53]。Lu 等人^[53]将氨基酸（包括亮氨酸、甲磺酸和 Lys）加入到 PL 乳液中后在 60℃ 储藏 6 天，可观察到亲水吡咯的含量在此期间内明显增长了。而没有加入氨基酸的 PL 乳液中，亲水吡咯的含量保持恒定（几乎为零）。此外还监测了 AKO 在 40℃ 培养 21 天中非酶促褐变反应

产物的变化, 检测出亲水吡咯的含量在 AKO 的氧化过程中略有增加。(3) 机制 C: 由于 PE 中存在伯胺基, 因此 PE 也可与脂质氧化产物发生吡咯化反应, 并生成疏水性吡咯。在 60°C 培养 6 天后, 未加入氨基酸的 PE 乳液和加入了氨基酸的 PE 乳液都产生了疏水性吡咯, 而 PC 乳液和加入了氨基酸的 PC 乳液都没有产生疏水吡咯。这说明产生疏水吡咯的要素不是氨基酸也不是 PC, 而是 PE。上述 B、C 机制都会产生抗氧化活性的吡咯。Thomsen 等人^[51]研究发现, 在 AKO 储藏期间内, 疏水吡咯的产生量持续增加 (>0.3 mmol/g) 而亲水吡咯的产生量仅略有增加 (<0.1 mmol/g)。这说明在 AKO 这样一种同时含有游离氨基酸和 PE 的油中, PE 吡咯化的量高于氨基酸吡咯化的量, 也就是说 AKO 氧化过程中疏水吡咯产生的量高于亲水吡咯。此外, Thomsen 等人^[51]还观察到 AKO 氧化过程中产生的疏水性的 1-甲基-1H-吡咯的含量先增加后减少。这说明, 随着氧化的进行, AKO 先产生了具有抗氧化性能的 1-甲基-1H-吡咯, 随后又由于此物具有抗氧化活性, 因此在 AKO 储藏过程中被消耗。^[54]

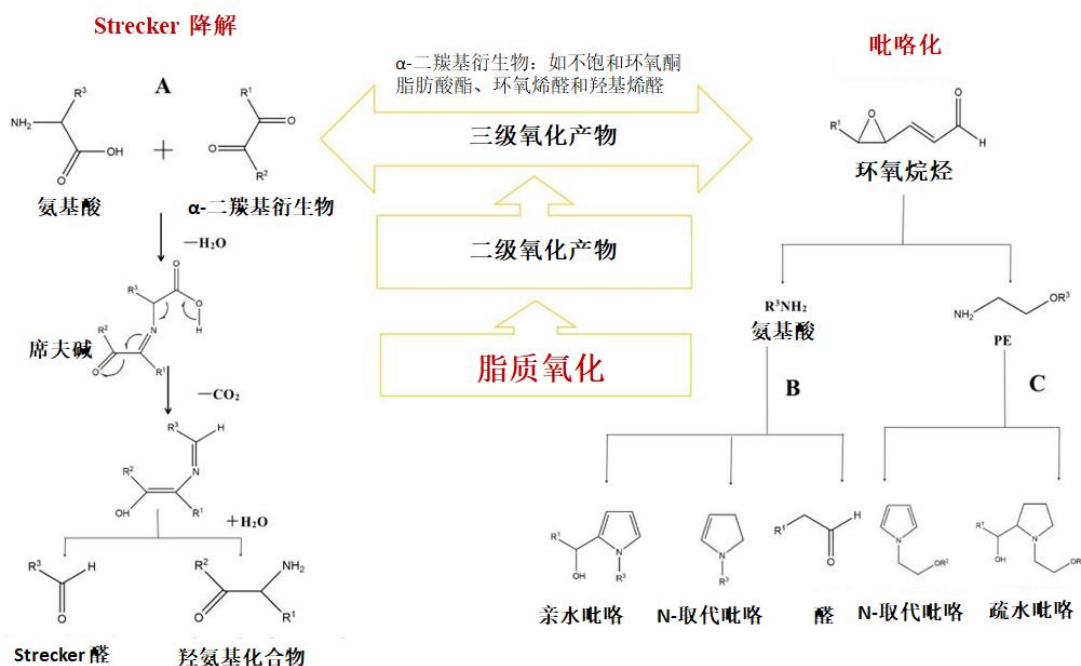


图 1-2 AKO 中可能的非酶褐变反应途径

Figure1-2 Several non-enzymatic browning reactions that may occur in AKO

1.3.3 AKO 氧化过程中的协同作用

AKO 的抗氧化脂质组分不仅单独存在时能够抑制油氧化, 当它们协同作用时, 可使得抗氧化活性更强。Lee 等^[38]分别评估了含有 AKO 总脂质和单体脂质的红花油的氧化程度。结果发现, 加入 AKO 总脂质的红花油的诱导期比加入 AKO 单体脂质的红花油的诱导期长, 这一现象证明了 AKO 抗氧化脂质组分协同作用的抗氧化效果大于分别作用。

有研究发现^[55], 生育酚与 PL 共存时, 二者的抗氧化作用能得到大幅度的提升。在 Lee 等^[38]的研究中, 主要成分为生育酚的中性脂质组分与 PL 的混合体系表现出的抗氧化活性远远大于它们单独作用的结果。PL 与生育酚的协同抗氧化作用具有几种机制: (1) PL 可以改变生育酚的物理位置, 并使其靠近油脂体系中最大氧化应激的部位^[56]。由于生育酚和 PL 都具有表面活性特性, 它们的组合可能会影响生育酚以及其他主要抗氧化剂的物理位置, 并且由此产生的位置变化可能会影响它们的抗氧化活性; (2) PL 对生育酚的分解有抑制作用。Song 等^[24]将以 PL、TG 和 EE 三种形式存在的含 DHA 的油在氧化十周后检测其中的生育酚含量。结果显示, PL 油中生育酚还保留为初始量的 37.3%, 而 EE 油和 TG 油在它们的初始总生育酚含量分别是 PL 油的 3 倍和 5 倍的情况下, 氧化 10 周后却已完全衰减。这是由于 TG 油和 EE 油中产生的脂质自由基耗尽了生育酚作为质子供体, 而在 PL 油中, 生育酚的损失相对较小; (3) PL 可以消除已氧化的生育酚并重新生成抗氧化性的生育酚, 既 PL 有再生生育酚的作用^[57]。Doert 等人^[58]发现 PE 能将 α -生育酚的氧化物, 即 α -生育醌转化为 PE- α -生育醌缩合产物。PE- α -生育醌缩合物随后通过异性裂解反应成一个碳酰亚胺和 PE-亚胺, 然后通过添加质子形成 α -生育酚。另一条可能的途径是 PE- α -生育醌通过异解裂解形成一个碳铵离子, 然后被 PE 或 L-抗坏血酸还原成 α -生育酚。

不同的 PL 种类与 α -生育酚发生的协同抗氧化效果也不同, 研究发现 PE 与 α -生育酚的协同作用最优^[59]。Koga 等^[56]指出, 生育酚与 PL 的抗氧化协同作用会随着 PE 量的增加而增加, 而 PC 作为一种非胺类 PL, 不能再生 α -生育酚, 不过它可以作为催化剂改善生育酚的再生。Bandarra 等^[59]研究了 α -生育酚分别与几种 PL 的组合对精制沙丁鱼油的氧化稳定性的影响。其中, α -生育酚和 PE 的混合物获得了最高的协同效应, 而用 PC 和 CL 制成的混合物则分

别获得了第二和第三好的协同效应。PE 和 α -生育酚可能发生了涉及美拉德反应的协同抗氧化机制^[60]。有研究表明^[61]，美拉德产物吡咯在有 α -生育酚等抗氧化物存在的情况下，抗氧化性能会显著提高。Hidalgo 等^[62]研究了 PE、PC、Lys 单独作用时，对剥离生育酚的橄榄油（TSO）和添加了 250 μg α -生育酚的橄榄油（TAO）的氧化稳定性。结果显示，用 0~400 μg PE、PC 或 Lys 的油处理 TSO，油的诱导期 IP 没有明显变化，而用同样浓度的 PE、PC、Lys 处理 TAO 时，TAO 的 IP 随着 PE、Lys 的添加量而增加，而 PC 依然不能对 TAO 起到保护作用。这再次说明了，非胺磷脂 PC 氧化时不能产生抗氧化物，同时 α -生育酚对油脂的氧化稳定性有较大贡献。

1.3.4 AKO 的氧化机制

如前所述，AKO 脂质组成复杂，以高 PL 含量为主要特征，伴随有 TG、MG、DG、FFA 等多种脂质组分，此外，还含有虾青素、维生素、甾醇等多种功能性微量成分。这些成分有些具有抗氧化作用，有些具有促氧化作用，如表 1-1 所示。众多脂质组分使得 AKO 中同时存在着脂质氧化反应、抗氧化协同作用、美拉德褐变等化学反应，产生了大量的脂质降解产物，导致 AKO 氧化机制复杂。此外，AKO 作为一种新兴的食品原料，目前尚未有统一的质量标准。原料捕捞的季节、产地、年份、磷虾的性别和成熟度以及各异的加工工艺的不同都会使得 AKO 组分有着很大差异，这不仅造成市场混乱，也为深入探讨 AKO 的氧化稳定性及其机制带来了困难。

表 1-1 影响 AKO 氧化稳定性的组成因素
Table 1-1 Factors affecting the oxidative stability of AKO

来源	因素	主要影响	影响机制
自然存在	FFA	促氧化	羧酸头催化自氧化
	PUFA	促进 ROOH 生成	降低自氧化反应所需的活化能
	酰基甘油(TG、 DG 、MG)	促氧化	降低表面张力增加氧气接触
	PL	阻止 ROOH 生成	与生育酚的协同抗氧化作用；螯合金 属离子；非酶促褐变反应产生抗氧化物
	虾青素	抗氧化剂	猝灭单线态氧；清除自由基
	生育酚	抗氧化剂	清除自由基；抗氧化协同作用
生成物	抗氧化吡咯	抗氧化剂	抗氧化协同作用
其他因素	金属离子	催化氧化反应	促进 ROOH 分解；形成自由基

注：AKO，南极磷虾油；FFA，游离脂肪酸；PUFA，多不饱和脂肪酸；ROOH，氢过氧化物；TG，甘三酯；
[18]DG，甘二酯；MG，甘一酯；PL，磷脂。

表 1-2 为 14 个国内外代表性 AKO 样品的部分脂质成分数据^[5,8,14,18,33,63]。可以看到，AKO 中的 PL、虾青素、EPA 和 DHA 含量悬殊。由于物质的组成决定其性质，因此可以推测在相同的贮藏条件下，不同脂质组成的 AKO 的自动氧化行为会存在差异。不过 AKO 中的一系列氧化机制中是如何协调作用的以及不同脂质组成的 AKO 自动氧化行为的差异如何还有待系统的研究。

表 1-2 代表性 AKO 样品脂质组成数据^[5,8,14,18,33,63]
Table 1-2 Lipid composition data for representative AKO samples

指标	含量范围
PL (g/100 g 油)	26~81
虾青素 (mg/kg 油)	117~970
EPA (%总脂肪酸)	11~23
DHA (%总脂肪酸)	6~13

注：AKO，南极磷虾油；PL，磷脂；EPA，二十碳五烯酸；DHA，二十二碳六烯酸。

1.4 本课题的研究内容

本课题围绕 AKO 脂质组分与其氧化稳定性的关系展开研究,从全脂南极磷虾粉中分两步提取不同极性的脂质组分。复配构建不同脂质组分含量的 AKO 体系,评估各体系的氧化稳定性差异,并分析脂质组分与氧化稳定性的相关性。进一步利用脂质组学方法,追踪三种具有不同脂质组成的 AKO 代表样品在储藏前、储藏中、储藏后其中的脂质组成有何差异。并筛选显著差异脂质分子,用来间接地比较不同脂质组成的 AKO 氧化行为。具体内容如下:

(1) 以全脂南极磷虾粉为原料,采用两步提取法制备含有不同极性脂质的两种 AKO。其中,第一步用超临界 CO₂ 萃取法提取富含中性脂质的 S-AKO,第二步用乙醇萃取法提取富含极性脂质的 E-AKO。

(2) 在明确 S-AKO 以及 E-AKO 中极性脂质和中性脂质的含量的基础上,以不同比例复配构建含有不同脂质组分含量的 11 种 AKO 体系。检测这些 AKO 中的 PL、TAG、虾青素、生育酚、维生素 A 的含量并比较含量差异。通过 Oxitest 法评估各体系的氧化稳定性得到各 AKO 体系的氧化诱导时间,通过数理统计,建立各脂质组分含量与 AKO 氧化诱导时间之间的皮尔森相关系数,解析 AKO 的脂质组分与氧化稳定性之间的相互关系。进一步采用 Schaal 烘箱加速储藏实验模拟自动氧化,分析不同贮藏时间点脂质微量伴随物虾青素、生育酚和维生素 A 含量变化趋势在 11 种 AKO 中有何区别。深入研究 11 种 AKO 加速氧化过程中的主要 PUFA (EPA 和 DHA) 的氧化动力学,为不同脂质组成的 AKO 氧化劣变行为提供理论研究。

(3) 利用基于 LC-MS/MS 的脂质组学方法探究不同脂质组成的 AKO 在储藏过程中的脂质变化。对 AKO 的脂质组成进行全面表征,监测加速氧化实验中 AKO 脂质组成,得到不同储藏时期的脂质组学图谱,分析 AKO 储藏氧化过程中的脂质变化。利用多元统计分析方法对显著性差异脂质进行筛选,得到不同脂质组成的 AKO 氧化前后的氧化标记物。用于区分不同脂质组成的 AKO 在氧化过程中脂质组成的变化,并间接的表达其氧化劣变行为的差异。

1.5 本课题的研究意义

AKO 作为一种新兴的食品原料,目前对 AKO 的研究和加工还存在着诸多不

完善。复杂的组成以及各异的加工工艺导致 AKO 产品组成的差异很大，不仅造成市场混乱，也为深入探讨 AKO 的氧化稳定性及其机制带来了困难。目前对 AKO 的研究还主要集中于加工工艺、生理活性以及健康功效等方面，而对其氧化行为机制的探讨还缺少系统的研究。因此，为减少 AKO 因脂质劣变带来的营养损失和健康风险，有效调控其贮藏稳定性，有必要对 AKO 在自动氧化过程中的各类脂质以及微量成分的氧化劣变行为进行深入探究。本课题的研究有如下重要意义：

（1）探明不同脂质组成的 AKO 与氧化稳定性的关系，为调控 AKO 的储藏稳定性提供了理论依据。

（2）研究 AKO 加速氧化过程中微量物质的降解规律，推导 AKO 中的主要 PUFA（EPA 和 DHA）的氧化动力学方程，为阐明不同脂质组成 AKO 的氧化劣变行为提供理论基础。

（3）探究加速氧化过程对 AKO 中脂质代谢的影响，以及不同脂质组成的 AKO 在氧化前后的显著差异脂质变化，为鉴别不同 AKO 的品质区别以及对 AKO 氧化劣变行为的研究提供理论依据。

第2章 不同极性脂质组分的 AKO 提取及工艺优化

2.1 引言

AKO 的氧化稳定性取决于其中的脂质组成，一般来讲，AKO 中的 PL 含量越高其氧化稳定性也越高^[20]，而在同等储藏条件下，往往虾青素，维生素和生育酚等微量成分最先被氧化降解^[48]，这会大大降低了 AKO 的营养价值。若能将 AKO 中的中性脂质与极性脂质分别提取出来，则不仅能使两种产物中的功能性脂质成分有效提高，还能将其应用于多种领域，扩大 AKO 产品的应用范围，也为后续研究提供了样本。

超临界 CO₂ 萃取法具有安全、环保等特点，并且不会破坏油脂成分，所提油脂的品质较高^[64]。有机溶剂提取是比较经济的一种制油方式，具有成本低、操作简单、易于产业化等优点。此外，超临界 CO₂ 对 PL 的溶解性极低^[65]，且与其他有机溶剂比起来，乙醇溶剂能获得更高的油脂得率和 PL 含量^[19]。本章研究利用了这些特点，对 AKO 中的中性脂质与极性脂质进行了分步提取，使超临界 CO₂ 萃取的虾油中含有极高的中性脂质，而乙醇溶剂萃取超临界 CO₂ 剩余的虾粉粕能获得高极性脂质组成的 AKO。采用单因素试验与响应面试验优化两步的工艺条件，得到富含 TG 的虾油（S-AKO）与富含 PL 的虾油（E-AKO），为 AKO 的开发利用提供参考。

2.2 实验材料与仪器

2.2.1 实验材料与试剂

南极磷虾粉来自山东农场生物技术有限公司；无水乙醇、丙酮、氢氧化钠、甲醇、二氯甲烷（色谱纯）、甲醇（色谱纯）、氯仿、正庚烷、无水乙醚、甲酸购买于国药集团化学试剂有限公司；TG 标品（G104094 三棕榈酸甘油酯）、PL 标品（L105732 大豆卵磷脂）、虾青素标品（A141428）、维生素 A 标品（V111674）、生育酚标品（T433011）购于阿拉丁生化科技股份有限公司。

2.2.2 实验仪器与设备

SFE220-50-0.5 型超临界 CO₂ 萃取设备购于南通仪创实验仪器有限公司；2695 高效液相色谱仪购于美国 Waters 公司；Trace GC Ultra 气相色谱仪购于美国 ThermoFisher 公司；IATROSCAN MK-7S 棒状薄层色谱仪购于日本雅特隆公司。

2.3 试验方法

2.3.1 超临界 CO₂ 萃取法提取富含中性脂质的 AKO

将原料南极磷虾粉用烘箱加热干燥至恒重，取出后称量一定质量的干燥南极磷虾粉放入萃取器中，按照设定的压强、时间和流速在萃取罐中进行萃取。萃取结束后，减压分离，得到 AKO 中性脂质（S-AKO），烘箱干燥后称重用于后续脂质提取率的计算。萃取过后残余的虾粉烘干备用，作为下一步提取的原料。

2.3.2 乙醇提取法提取富含极性脂质的 AKO

将 2.3.1 提取之后残存虾粉干燥并称重，使用无水乙醇按照设定的温度、时间和料液比从虾粉中萃取提油。萃取液使用布氏漏斗抽滤，去除滤渣。滤渣继续用少量乙醇冲洗抽滤，合并滤液。采用真空旋转蒸发仪脱除滤液中乙醇溶剂，得到 AKO 极性脂质（E-AKO），烘箱干燥后称重用于后续脂质提取率的计算。

2.3.3 脂质提取率的计算

$$\text{脂质提取率} = \frac{\text{提取虾油质量}}{\text{总脂质量}} \times 100\% \quad (\text{公式 2-1})$$

总脂质量的测定参考谢丹^[66]的 Folch 提取法。

2.3.4 AKO 中 TG 与 PL 含量的测定

使用赵泓博^[67]的方法，将南极磷虾样品溶解于三氯甲烷溶液中，样品溶液点在各色谱棒的零点位置。把点样好的色谱棒架竖直放在装有无水乙醚、正庚烷、甲酸的混合溶液的展开槽中进行展开。展开结束后将色谱棒架放入棒状色谱分析仪中进行扫描，得各个样品脂质组成的 TLC-FID 薄层色谱图，依据标准曲线计算 TG 和 PL 含量。

2.3.5 AKO 中微量物质含量的测定

采用 LC-20AT 紫外高效液相色谱仪对 AKO 中的虾青素、生育酚、维生素 A

进行测定，分析方法参考谢丹^[66]的方法。

2.3.6 AKO 中脂肪酸含量的测定

AKO 中脂肪酸组成采用 Agilent7820 气相色谱仪分析，参考谢丹^[66]报道的方法。

2.3.7 分离不同极性脂质的工艺优化

2.3.7.1 超临界 CO₂ 提取富含中性脂质的 AKO

以 TG 含量为主要评价指标，萃取温度、萃取压强、萃取时间为因素，设计单因素实验考察各因素对 TG 含量的影响，结合油脂提取率和 PL 含量辅助分析选择最佳萃取条件。固定萃取压强为 35 MPa、萃取时间 1.5 h，超临界 CO₂ 萃取温度选取 30°C、35°C、40°C、45°C、50°C 共 5 个水平，考察不同萃取温度对提取 AKO 中性脂质中的 TG 含量的影响。固定萃取温度为 45°C、萃取时间 1.5 h，萃取压强选取 25 MPa、30 MPa、35 MPa、40 MPa、45 MPa 共 5 个水平，考察不同萃取压强对 S-AKO 的 TG 含量影响。固定萃取温度为 45°C、萃取压强为 40 MPa，萃取时间选取 1 h、1.25 h、1.5 h、1.75 h、2 h 共 5 个水平，考察不同萃取时间对 AKO 中性脂质中的 TG 含量影响。

在单因素试验的基础上，以 TG 含量 (Y) 作为响应值，萃取时间 (A)、萃取温度 (B)、萃取压强 (C) 为因素，使用 Design-Expert 13 软件进行三因素三水平 17 个试验点的响应面试验。

2.3.7.2 乙醇溶剂提取富含极性脂质的 AKO

以 PL 含量为主要评价指标，萃取温度、萃取时间、萃取料液比为因素，设计单因素实验考察各因素对 PL 含量的影响，结合油脂提取率和 TG 含量辅助分析选择最佳萃取条件。固定萃取料液比为 1:3 (g:mL)、萃取时间为 1.5 h，萃取温度分别选择 40°C、45°C、50°C、55°C、60°C 共 5 个水平，探究萃取温度对 AKO 极性脂质中 PL 含量的影响。固定萃取料液比为 1:3 (g:mL)、萃取温度为 50°C，萃取时间分别选择 1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h 共五个水平，探究不同萃取时间对 E-AKO 中 PL 含量的影响。固定萃取温度 50°C、萃取时间 1.5 h，料液比 (g:mL) 分别选择 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5，共 5 个水平，探究不同的萃取料液比对 E-AKO 中 PL 含量的影响。

在单因素试验的基础上，以 PL 含量 (Y) 作为相应值，萃取时间 (A)、萃取温度 (B)、萃取料液比 (C) 为因素，使用 Design-Expert 13 件进行三因素三水平 17 个试验点的响应面试验。

2.3.8 数据统计与分析

实验所有对象均设置 3 组平行，采用 Design-Expert 13 和 SPSS 软件进行数据分析处理，显著性检验水平 $p < 0.05$ 表示差异显著。图表的绘制采用 Origin 软件。

2.4 结果与讨论

2.4.1 超临界 CO₂ 提取富含中性脂质的 AKO

2.4.1.1 超临界 CO₂ 提取富含中性脂质 AKO 的单因素试验结果分析

各个单因素对超临界 CO₂ 提取 AKO 中性脂质中 TG 含量、PL 含量和总提取率的影响如图 2-1 所示。由图 2-1A 可以看出，AKO 中性脂质中的 TG 含量随着温度的升高而增加，并在温度为 45°C 时达到最高点，但随着萃取温度继续上升，AKO 中性脂中的 TG 含量反而下降。这可能是由于一方面温度的升高可增大溶剂的扩散系数，使得 TG 在超临界 CO₂ 中的溶解度上升，有利于萃取；另一方面，过高的萃取温度下，超临界流体的密度会显著降低，这会降低 CO₂ 流体的溶剂化效应，最终导致 TG 在二氧化碳流体中的溶解度下降，TG 在其中的溶解度降低，不利于萃取^[68]。因此，萃取温度以 45°C 为最佳；由图 2-1B 可以看出，当压强小于 40 MPa 时，AKO 中性脂质中 TG 含量随萃取压强增加而增加，在萃取压强大于 40 MPa 时，中性脂质中的 TG 含量略有下降。这是因为随着萃取压力增大，CO₂ 流体对溶质溶解度增加，使得提取出的油脂中含有较高比例的 TG，但继续增加压力，溶质溶解能力会降低，导致 TG 含量的下降^[69]。因此萃取压强采用 40 MPa 最佳；由图 2-1C 可以看出，随着萃取时间的延长，AKO 中的脂质提取率、TG 含量以及 PL 含量持续增加，但当萃取时间超过 1.75 h 后 TG 的含量略有下降，这是由于随着萃取时间的增加，也加大了除了 TG 以外其他脂质组成在超临界 CO₂ 中的溶解率，使得其他组分（如 PL）略有萃出，从而导致 TG 的含量相对下降。由于萃取时间 1.5 h 所提虾油与 1.75 h 所提虾油中的 TG 含量并无

显著差异 ($p<0.05$), 同时考虑到萃取时间过长会导致成本增加以及效率下降, 因此选择 1.5 h 为最适萃取时间。

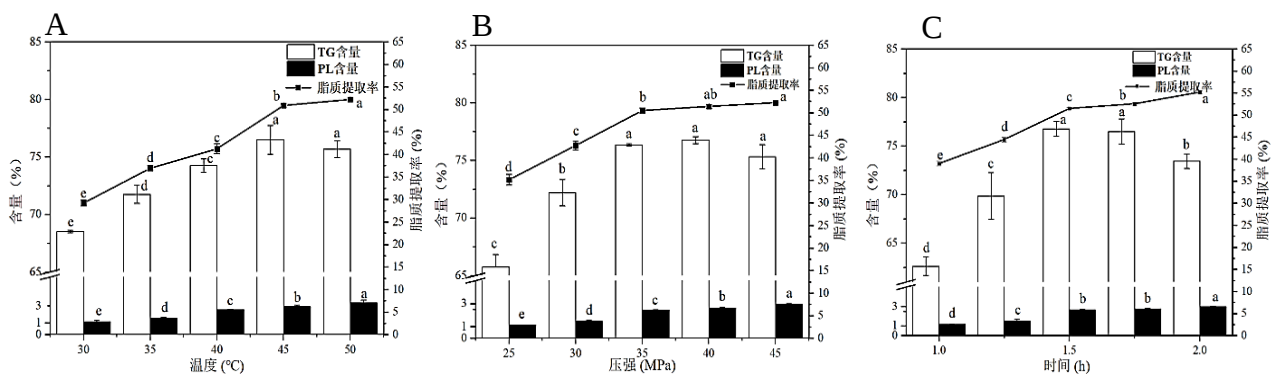


图 2-1 各因素对超临界 CO₂ 提取 AKO 中 TG 含量、PL 含量以及脂质提取率的影响

A: 萃取温度; B: 萃取压强; C: 萃取时间

Figure 2-1 Effect of factors on TG content, PL content and lipid extraction rate of AKO by supercritical CO₂ extraction

A: extraction temperature; B: extraction pressure; C: extraction time

注: TG, 甘三酯; PL, 磷脂。

2.4.1.2 超临界 CO₂ 提取富含中性脂质 AKO 的响应面优化试验结果分析

根据单因素试验结果, 以 TG 含量 (Y) 为指标, 萃取时间 (A)、萃取温度 (B)、萃取压强 (C) 为因素, 进行三因素三水平 17 个试验点的响应面试验, 响应面试验因素与水平见表 2-1。

表 2-1 超临界 CO₂ 提取富含中性脂质 AKO 的响应面试验因素与水平

Table 2-1 Response surface test factors and levels for supercritical CO₂ extraction of neutral lipids rich AKOs

水平	A 萃取时间/h	B 萃取温度/°C	C 萃取压强/MPa
-1	1.25	40	35
0	1.5	45	40
1	1.75	50	45

响应面试验设计与结果见表 2-2。

表 2-2 超临界 CO₂ 提取富含中性脂质 AKO 的响应面实验设计及结果

Table2-2 Response surface experimental design and results of supercritical CO₂
extraction of neutral lipids rich AKOs

试验号	A	B	C	Y/%
1	0	0	0	76.86
2	0	0	0	75.66
3	-1	0	-1	68.79
4	0	0	0	76.01
5	0	0	0	76.12
6	0	-1	1	73.95
7	1	1	0	74.56
8	0	1	1	73.69
9	-1	-1	0	67.06
10	-1	1	0	68.86
11	0	1	-1	73.89
12	0	0	0	75.74
13	-1	0	1	70.29
14	1	-1	0	73.26
15	0	-1	-1	73.24
16	1	0	-1	75.66
17	1	0	1	74.62

2.4.1.3 模型的建立与显著性的分析

运用 DesignExpert 13 对表 2-2 试验结果进行多元回归拟合，得超临界 CO₂ 提取出来的 AKO 中的 TG 含量与各因素的二次多项式回归模型：

$$Y=76.08+2.89A+0.4363B+0.1213C-0.125AB-0.6350AC-0.2275BC-3.25A^2-1.9B^2-0.4902C^2。$$

对回归模型进行方差分析和回归系数显著性检验，结果见表 2-3

表 2-3 超临界 CO₂ 提取富含中性脂质 AKO 的回归模型方差分析Table 2-3 Analysis of variance of regression models for the extraction of neutral lipids rich AKOs by supercritical CO₂

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	135.21	9	15.02	55.75	< 0.0001	**
A-时间	66.70	1	66.70	247.51	< 0.0001	**
B-温度	1.52	1	1.52	5.65	0.0491	*
C-压强	0.1176	1	0.1176	0.4364	0.5300	
AB	0.0625	1	0.0625	0.2319	0.6448	
AC	1.61	1	1.61	5.98	0.0443	*
BC	0.2070	1	0.2070	0.7682	0.4098	*
A ²	44.41	1	44.41	164.80	< 0.0001	**
B ²	15.12	1	15.12	56.12	0.0001	*
C ²	1.01	1	1.01	3.76	0.0938	
残差	1.89	7	0.2695			
失拟向	0.9796	3	0.3265	1.44	0.3560	
纯误差	0.9069	4	0.2267			
总和	137.10	16				
R ²	0.9862					
R ² _{Adj}	0.9685					

注:*为差异显著($P < 0.05$);**为差异极显著($P < 0.01$)。

由表可知, 该二次回归方程模型极显著 ($P < 0.0001$), 模型的相关系数 $R^2=0.9862$, 表明该模型可以解释 98.62% 的响应值 Y 的变化。失拟项 P 值为 0.3560, 不显著, 回归方程的相关系数 $R^2_{Adj}=0.9685$ 表明模型方程能够较好地反映真实的试验值。该方程与实际情况拟合很好, 较好地反映了 TG 含量与萃取时间 (A)、萃取温度 (B) 和萃取压强 (C) 的关系; 模型一次项 A 对响应值 Y 影响极显著 ($P < 0.01$), B 对响应值 Y 影响显著 ($P < 0.05$); 交互项 AC、BC 对响应值 Y 影响显著 ($P < 0.05$); 二次项 A²、B² 对响应值 Y 影响都显著 ($P < 0.05$), 说明

分析结果可靠。根据 F 值大小, 可知各因素对 TG 含量影响的程度大小依次是萃取时间 (A) > 萃取温度 (B) > 萃取压强 (C)。

2.4.1.4 响应面分析

运用 Design-Expert 13 软件做出各因素之间交互作用对提取高 TG 含量的 AKO 影响的等高线及响应曲面图, 见图 2-2。对等高线和响应曲面图进行分析可以得出: 时间(A)和压强(C)、温度(B)和压强(C)之间交互作用显著($P<0.05$), 其他因素的交互作用不显著。单因素时间(A)对 AKO 甘三酯含量影响最明显, 其次是温度 (B), 影响最小的是压强 (C)。

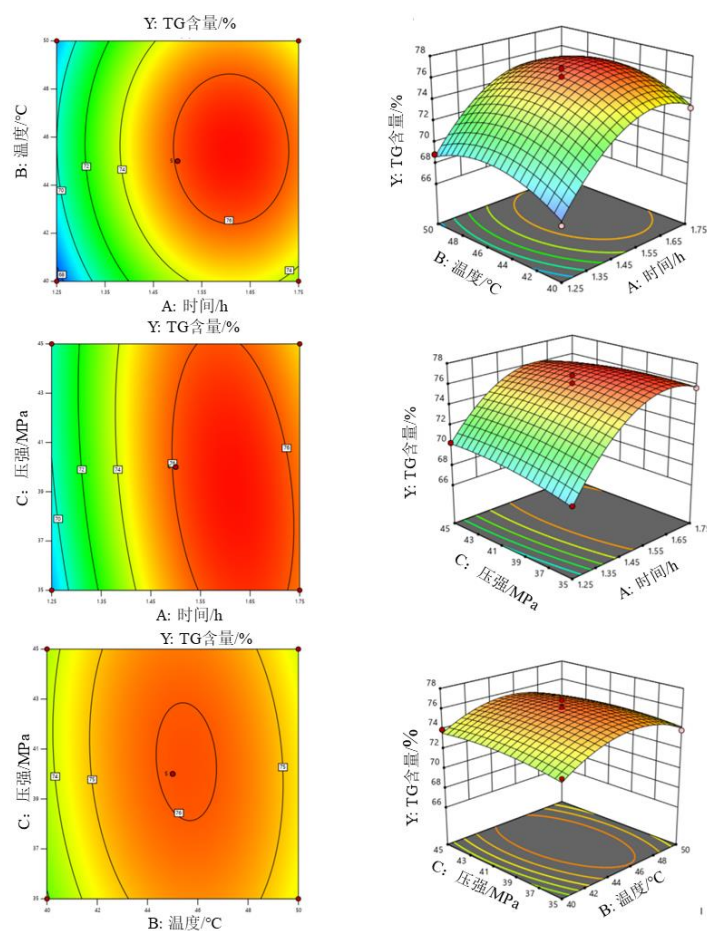


图 2-2 三个因素之间交互作用对超临界 CO₂ 提取 AKO 中 TG 含量影响的等高线图及响应面图

Figure 2-2 Contour plots and response surface plots of the effect of interaction among three factors on TG content in AKO extracted by supercritical CO₂

注: TG, 甘三酯含量。

2.4.1.5 最佳工艺条件预测及验证

运用 DesignExpert 13 软件, 采用 Box-Behnken 对以上得到的试验结果进行优化, 从而确定了最佳萃取条件为: 萃取时间 1.75 h, 萃取温度 45°C, 萃取压强 45 MPa。在最佳萃取条件下预测 TG 含量为 74.71%。采用上述优化条件进行 3 次验证试验, TG 含量实测值为 $(73.68 \pm 0.71)\%$, 表明实测值与预测值基本吻合, 该模型可用于超临界制备 AKO 中性脂质的工艺优化。

2.4.2 乙醇溶剂提取富含极性脂质的 AKO

2.4.2.1 乙醇溶剂提取富含极性脂质 AKO 的单因素试验结果分析

各个因素对乙醇溶剂提取虾粉粕所得 AKO 中 PL 含量的影响如图 2-3 所示。由图 2-3A 可知, AKO 组分中的 PL 含量随萃取时间的延长而增加, 且 2.5 h 与 3 h 所提虾油中的 PL 含量并无显著差异 ($p < 0.05$), 由于萃取时间直接关系着生产成本, 因此选择 2 h 作为最适提取时间即可; 由图 2-3B 可知, AKO 极性脂质组分中 PL 含量随着温度的增加而升高, 这可能是由于温度升高使得分子的热运动加剧, 溶剂和油的粘度下降, 二者的扩散速率加快, 此外, 乙醇对油的溶解能力也会随温度升高而增大^[70]。当温度超过 50°C 后, PL 含量的增加速率趋于平缓, 因此选择 50°C 作为最佳萃取温度; 由图 2-3C 可知, PL 含量随着南极磷虾残粉与无水乙醇之间料液比的增加而增加, 在料液比达到 1:4 (g:mL) 之后 PL 得率达到最高, 且与 1:3 (g:mL) 和 1:5 (g:mL) 有显著性差异, 因此选择料液比 1:4 (g:mL) 为最佳无水乙醇提油的料液比。

2.4.2.2 乙醇溶剂提取富含极性脂质 AKO 的响应面试验结果分析

根据单因素试验结果, 以 PL 含量 (Y) 为指标, 萃取时间 (A)、萃取温度 (B)、萃取料液比 (C) 为因素, 进行三因素三水平的响应面优化试验, 响应面试验因素与水平见表 2-4。

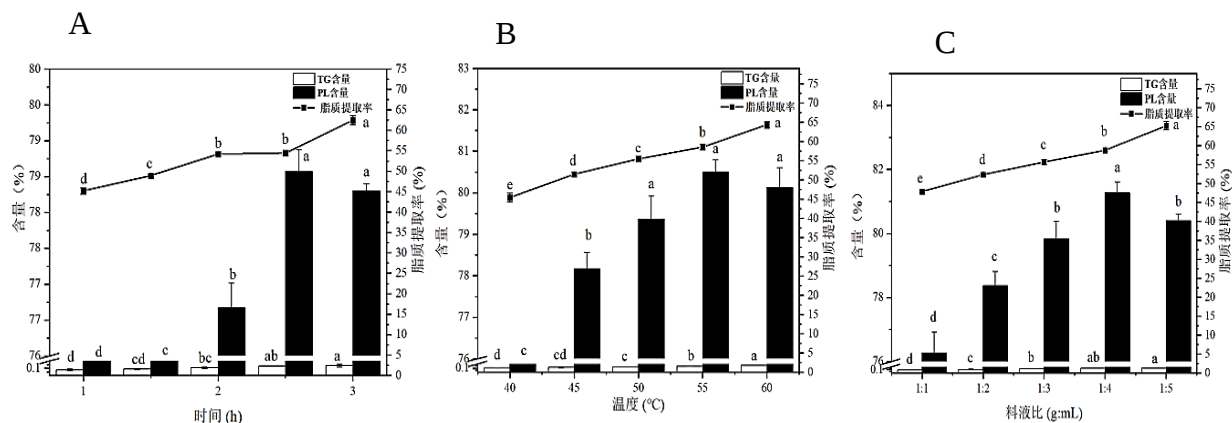


图 2-3 各因素对乙醇溶剂提取 AKO 中 PL 含量、TG 含量以及脂质提取率的影响 A：萃取时间；B：萃取温度；C：萃取料液比

Figure 2-3 Effect of factors on PL content, TG content and lipid extraction rate in ethanol solvent extracted AKO

A: extraction time; B: extraction temperature; C: extraction material-liquid ratio

注：TG，甘三酯；PL；磷脂。

表 2-4 乙醇萃取富含极性脂质 AKO 的响应面试验因素与水平

Table2-4 Factors and levels of response surface test for ethanol extraction of polar lipids rich AKOs

水平	A 萃取时间/h	B 萃取温度/°C	C 萃取料液比/g:mL
-1	2	50	1:3
0	2.5	55	1:4
1	3	60	1:5

响应面试验设计与结果见表 2-5。

表 2-5 乙醇萃取富含极性脂质 AKO 的响应面实验设计及结果

Table 2-5 Response surface experimental design and results for ethanol extraction of polar lipids rich AKOs

试验号	A	B	C	Y/%
1	0	0	0	81.32
2	0	0	0	80.41
3	-1	0	-1	77.84
4	0	0	0	79.42
5	0	0	0	81.85
6	0	-1	1	77.71
7	1	1	0	78.67
8	0	1	1	77.93
9	-1	-1	0	75.96
10	-1	1	0	77.23
11	0	1	-1	80.35
12	0	0	0	80.83
13	-1	0	1	78.39
14	1	-1	0	76.55
15	0	-1	-1	76.50
16	1	0	-1	79.8
17	1	0	1	79.81

2.4.2.3 模型的建立与显著性的分析

运用 DesignExpert 13 软件对表 2-5 试验结果进行多元回归拟合,得乙醇提取出来的 AKO 中的 PL 含量与各因素的二次多项式回归模型:

$$Y=80.74+0.6762A+0.9250B-0.0762C+0.2AB-0.1475AC-0.9BC-1.42A^2-2.27B^2-0.3712C^2$$
对回归模型进行方差分析和回归系数显著性检验,结果见表 2-6。

表 2-6 乙醇萃取富含极性脂质 AKO 回归模型方差分析

Table 2-6 Analysis of variance for regression modelling of ethanol-extracted polar lipids rich AKOs

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	47.14	9	5.24	9.06	0.0041	**
A-时间	3.66	1	3.66	6.33	0.0401	*
B-温度	6.85	1	6.85	11.84	0.0108	*
C-料液比	0.0465	1	0.0465	0.0805	0.7849	
AB	0.1600	1	0.1600	0.2768	0.6150	
AC	0.0870	1	0.0870	0.1506	0.7095	
BC	3.24	1	3.24	5.61	0.0498	*
A ²	8.51	1	8.51	14.71	0.0064	**
B ²	21.67	1	21.67	37.50	0.0005	**
C ²	0.5803	1	0.5803	1.00	0.3497	
残差	4.05	7	0.5780			
失拟向	0.6940	3	0.2313	0.2761	0.8407	
纯误差	3.35	4	0.8380			
总和	51.18	16				
R ²	0.921					
R ² _{Adj}	0.8193					

注:*为差异显著 ($P<0.05$); **为差异极显著 ($P<0.01$)。

由表可知, 该二次回归方程模型极显著, 失拟项 $P=0.8407$ 不显著, 说明该模型与实际情况拟合较好。模型的相关系数 $R^2=0.921$, 即该模型可以解释 92.1% Y 值的变化。 $R^2_{Adj}=0.8193$ 表明模型与实际情况拟合很好, 较好地反映了 PL 含量与萃取时间 (A)、萃取温度 (B) 和萃取料液比 (C) 的关系; 模型一次项 A、B 对响应值 Y 影响显著 ($P<0.05$); 交互项 BC 对响应值 Y 影响显著 ($P<0.05$); 二次项 A²、B² 对响应值 Y 影响都极显著 ($P<0.01$), 说明分析结果可靠。F 值的大小可反映各因素对 Y 值影响的大小, 顺序依次为: 萃取温度 (B)、萃取时

间 (A) 和萃取料液比 (C)。

2.4.2.4 响应面分析

运用 Design-Expert 13 软件做出各因素之间交互作用对提取高 PL 含量的 AKO 影响的等高线及响应曲面图, 见图 2-4。对等高线和响应曲面图进行分析可以得出: 温度 (B) 和料液比 (C) 之间交互作用显著 ($P<0.05$), 其他因素的交互作用不显著。单因素时间 (A)、温度 (B) 对 PL 含量影响最明显, 影响最小的是压强 (C)。

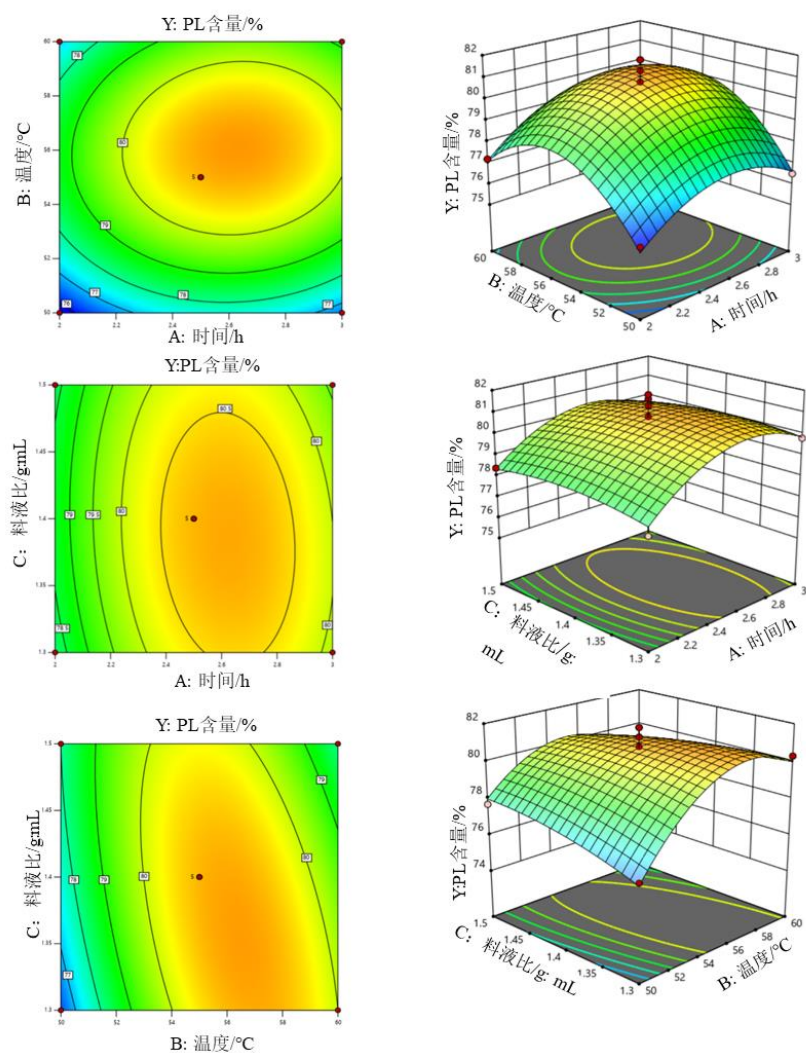


图 2-4 三个因素之间交互作用对乙醇提取 AKO 中 PL 含量影响的等高线图及响应面图

Figure 2-4 Contour plots and response surface plots of the effect of interaction among three factors on PL content in ethanol extracted AKO

注: PL, 磷脂

2.4.2.5 最佳工艺条件预测及验证

运用 DesignExpert 13 软件,采用 Box—Behnken 对所得到的试验结果进行优化分析,确定最佳萃取条件为:萃取时间 3 h,萃取温度 57℃,萃取料液比 1:3。在最佳萃取条件下预测 PL 含量为 80.31%。采用上述优化条件进行 3 次验证试验,PL 含量实测值为 $(80.19 \pm 0.68)\%$,表明实测值与预测值基本吻合,该模型可用于无水乙醇制备 AKO 极性脂质的工艺优化。

2.4.3 两种极性不同的 AKO 脂质组成

根据上述单因素试验与响应面试验优化后的最佳工艺参数进行放大化制备,得到的两种 AKO,分别为富含极性脂质的 E-AKO 和富含中性脂质的 S-AKO。对两种 AKO 的主要脂质组分进行检测,如表 2-7 所示。

由表可知,采用超临界 CO₂ 萃取法提取的 S-AKO 中,富含中性脂质的同时还含有丰富的虾青素,维生素 A、生育酚。这些有益脂质组分增加了中性脂质的功能性。而剩余的虾粉粕采用乙醇提取法提取的富含极性脂的 E-AKO 中的微量成分含量较低,但是含有丰富的 PUFA,如 EPA 和 DHA。PUFA 对人体具有抗血栓,降血脂,预防心血管疾病的功能,AKO 极性脂质因多结合 EPA 与 DHA,是一种具有保健作用的潜在油脂资源。

表 2-7 S-AKO 与 E-AKO 中主要的脂质组分

Table 2-7 Major lipid components in S-AKO and E-AKO

指标	S-AKO	E-AKO
得率 (%)	40.81±0.56	58.37±0.69
PL (%)	1.72±0.02	80.19±0.81
TG (%)	73.68±0.83	0.14±0.01
虾青素 (mg/kg)	74.91±1.10	3.29±0.09
生育酚 (mg/kg)	44.96±0.18	4.22±1.28
维生素 A (mg/kg)	448.31±2.12	221.55±1.74
脂肪酸组成 (%，wt)		
14:0	14.83±1.82	4.13±0.21
16:0	21.52±1.45	26.24±0.88
16:1	7.13±0.12	2.17±0.11
17:0	2.69±0.01	0.61±0.02
18:0	1.31±0.03	1.07±0.01
18:1T	13.24±1.08	7.21±0.01
18:1C	7.88±0.89	7.07±0.42
18:2C	2.59±0.59	2.26±0.11
18:3n-3	2.64±0.17	2.29±0.05
20:1	0.52±0.02	0.39±0.01
20:4n-6	0.3±0.03	0.69±0.04
20:3n-3	0.5±0.05	0.45±0.04
20:5	7.68±0.12	20.74±0.05
22:1	0.26±0.06	0.71±0.01
22:6n-3	2.22±0.2	11.43±0.08

注：S-AKO，富含中性脂质的南极磷虾油；E-AKO，富含极性脂质的南极磷虾油；PL，磷脂；TG，甘三酯。

2.5 本章小结

本章以南极磷虾粉为原料采用两步提取法分级提取富含中性脂质的 S-AKO 和富含极性脂质的 E-AKO。采用单因素实验和响应面实验分别优化萃取 S-AKO 和 E-AKO 的加工工艺条件，并检测两种 AKO 中的 TG、PL 和微量物质含量。结论如下：

（1）经过单因素试验以及响应面优化试验，并结合成本、能耗等因素，确定最佳的提取 S-AKO 的工艺条件为：萃取压强 45 MPa、萃取温度 45℃、萃取时间 1.75 h，在该条件下所得虾油 TG 含量为 $73.68 \pm 0.23\%$ ；最佳提取 E-AKO 的工艺条件为：萃取时间 3 h，萃取温度 57℃，萃取料液比 1:3 (g:mL)，在该条件下所得虾油 PL 含量高达 $80.19 \pm 0.81\%$ 。

（2）S-AKO 中的虾青素、生育酚、维生素 A 的含量分别为 74.68 mg/kg、44.96 mg/kg、448.31 mg/kg；E-AKO 中的虾青素、生育酚、维生素 A 的含量分别为 3.29 mg/kg、4.22 mg/kg、221.55 mg/kg。S-AKO 中的微量物质的含量远高于 E-AKO 中的微量物质含量。

（3）经过以上处理，可实现 AKO 中性脂质与极性脂质最大程度的分离。超临界 CO₂ 萃取与乙醇提取可作为分离 AKO 不同极性成分的有效方法，有利于扩展 AKO 作为保健食品开发的重要价值，也为后续研究提供了实验原料。

第3章 AKO 脂质组成对其氧化稳定性的影响

3.1 引言

AKO 脂质组成复杂,不同原料来源以及各异的加工工艺都会导致 AKO 产品脂质组成的差异。物质的组成决定其性质,对于不同脂质组成的 AKO 的自动氧化行为是否存在着差异这一问题,现今仍缺少系统的研究。基于此,探讨不同脂质组成的 AKO 体系在自动氧化过程中的脂质劣变行为差异对于阐明其整个氧化机制具有至关重要的作用。

本章以第 2 章提取的 S-AKO 和 E-AKO 为原材料,两者按照一定比例进行复配,构建出 11 种不同脂质组成的 AKO 体系。在明确 11 种 AKO 脂质组成(如 TG、PL、虾青素、生育酚和维生素 A)的基础上,通过 Oxitest 仪得到各个体系的氧化诱导时间,并研究脂质组分含量与氧化诱导时间的关系,得到 Pearson 相关系数。进一步通过烘箱加速氧化实验,监测 11 种 AKO 中(EPA、DHA、虾青素、生育酚和维生素 A)的氧化降解趋势;建立 11 种不同脂质组成 AKO 中的 EPA、DHA 的氧化动力学模型,为不同脂质组成的 AKO 氧化劣变行为提供理论研究。

3.2 材料与方法

3.2.1 实验材料

实验原材料采用第二章所述的分步提取的方法进行放大化制备。两种 AKO 原料(分别为富含中性脂质的 S-AKO 和富含极性脂质的 E-AKO)的主要组成如表 3-1 所示。

3.2.2 实验试剂

同 2.2.1

3.2.3 实验设备

同 2.2.2。

表 3-1 两种 AKO 原材料的主要脂质组成

Table 3-1 Main lipid composition of AKO material

指标	S-AKO	E-AKO
PL (%)	1.72 $\pm$ 0.02	80.19 $\pm$ 0.81
TG (%)	73.68 $\pm$ 0.83	0.14 $\pm$ 0.01
虾青素 (mg/kg)	74.91 $\pm$ 1.10	3.29 $\pm$ 0.09
生育酚 (mg/kg)	44.96 $\pm$ 0.18	4.22 $\pm$ 1.28
维生素 A (mg/kg)	448.31 $\pm$ 2.12	221.55 $\pm$ 1.74
20:5 (%)	7.68 $\pm$ 0.12	20.74 $\pm$ 0.05
22:6n-3 (%)	2.22 $\pm$ 0.2	11.43 $\pm$ 0.08

注：PL，磷脂；TG，甘三酯；S-AKO，富含中性脂质的南极磷虾油；E-AKO，富含极性脂质的南极磷虾油。

3.2.4 实验方法

3.2.4.1 不同脂质组成的 AKO 体系的构建

对第二章得到的 AKO 极性脂质和中性脂质按照表 3-2 进行复配，并对实际脂质体系的各脂质组成含量进行测定，得到 11 种不同脂质组成的 AKO 体系。

3.2.4.2 不同脂质组成的 AKO 的组成分析

(1) 11 种 AKO 中 TG 含量和 PL 含量的测定

同 2.3.4。

(2) 11 种 AKO 中脂肪酸组成的测定

同 2.3.6。

(3) 11 种 AKO 中微量物质含量的测定

同 2.3.5。

3.2.4.3 不同脂质组成 AKO 氧化诱导时间的测定

精确称取 8 g AKO 样品（精确至 0.0001 g），均匀放入 Oxitest 食品氧化仪的样品盘中，在温度 90℃和 0.6 MPa 的空气压力下测定氧化诱导时间。

3.2.4.4 不同脂质组成 AKO 的烘箱加速氧化实验

将 11 种 AKO 分装于 50 mL 棕色样品瓶，每个样品质量为 30 g，旋盖后，

置于 50℃、50%湿度的恒温恒湿培养箱中储存，每隔 6 d 将每一种 AKO 取出一些样品储藏于-20℃，待测定各项指标。

- (1) 不同脂质组成 AKO 加速氧化过程中，微量物质含量的测定
- 同 2.3.5
- (2) 不同脂质组成 AKO 氧化过程中 EPA 和 DHA 氧化动力学模型的建立
- 11 种不同脂质组成的 AKO 氧化过程中 EPA 和 DHA 的氧化动力学模型按照以下公式建立。

零级动力学： $C_t=C_0-kt$

(公式 3-1)

一级动力学： $\ln(C_t)=\ln(C_0)-kt$

(公式 3-2)

式中， C_0 为物质氧化初始含量， C_t 为氧化到 t 时物质当前的含量。 k 为氧化速率常数。

表 3-2 复配 AKO 配置比例

Table 3-2 Proportion of AKO allocation

样品编号	E-AKO（%）	S-AKO（%）
AKO1	0	100
AKO2	10	90
AKO3	20	80
AKO4	30	70
AKO5	40	60
AKO6	50	50
AKO7	60	40
AKO8	70	30
AKO9	80	20
AKO10	90	10
AKO11	100	0

注：S-AKO，富含中性脂质的南极磷虾油；E-AKO，富含极性脂质的南极磷虾油。

3.2.4.5 数据分析

所有数据以平均值±标准误差表示，借助 SPSS 19.0 软件对数据进行分析处

理，采用方差分析（ANOVA）对所有数据的显著性进行评价， $p < 0.05$ 时认为数据间具有显著性差异。所有图均由 Origin 分析制作。

3.3 结果与分析

3.3.1 不同脂质组成的 AKO 的组成分析

3.3.1.1 TG 含量与 PL 含量

由图 3-1 可见，11 种 AKO 样品中，AKO1 含有最高的极性脂含量（ $80.19 \pm 0.81\%$ ）和最低的中性脂质含量（ $0.14 \pm 0.01\%$ ），AKO11 含有最高的中性脂含量（ $73.68 \pm 0.83\%$ ）和最低的极性脂质含量（ $1.72 \pm 0.02\%$ ）。AKO6 中的极性脂质（ $31.44 \pm 1.17\%$ ）与中性脂质含量（ $36.08 \pm 1.01\%$ ）差别不大。从 AKO1 到 AKO11，TG 含量依次递增，PL 含量依次递减。11 种 AKO 的检测结果符合复配的标准，可以作为研究不同脂质组成 AKO 氧化行为差异的原材料，进行进一步的研究。

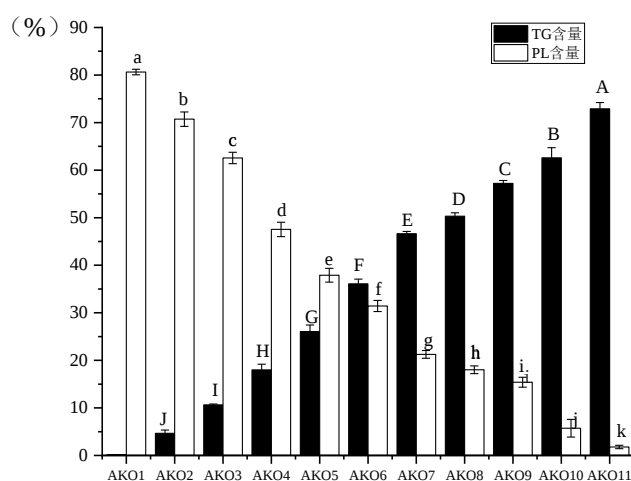


图 3-1 11 种不同脂质组成的 AKO 的 TG 和 PL 含量比较

Figure 3-1 Comparison of TG and PL content of 11 AKOs

注：AKO，南极磷虾油；TG，甘三酯；PL，磷脂。

3.3.1.2 脂肪酸组成

由表 3-3 可知，从 AKO1 到 AKO11，SFA 和 MUFA 的含量逐渐增加，与 PL 含量呈现相反的变化趋势。这是由于 AKO 中 SFA 和 MUFA 大多与 TG 结合，而 AKO1 到 AKO11 中，TG 含量逐渐增加，因此相应的 SFA 和 MUFA 的含量也呈现逐渐增加的趋势。Castro-Gómez 等人^[5]研究发现，AKO 中有近一半的 SFA

(52.98%) 与 TG 结合, 此外, 没有一种 TG 分子是完全饱和的, 这是由于大量的 MUFA (35.59%) 与 TG 相结合。

AKO1 中含有较高浓度的 PUFA ($38.05 \pm 1.24\%$), 其中 EPA 和 DHA 的含量分别为 $20.74 \pm 0.05\%$ 和 $11.43 \pm 0.08\%$ 。从 AKO1 到 AKO11 中的 PUFA 的含量逐渐降低, 其中 EPA, DHA 的含量也逐渐降低, 与 PL 含量的变化呈现相同的变化趋势。这是由于 AKO 中的 PUFA, 如 EPA 和 DHA, 大多结合在 PL 分子结构上。因此, 富含 PL 的 AKO 中通常也含还有较高的 PUFA。而 AKO 的中性脂质则结合少量的 PUFA, 如表 3-3 所示, AKO11 中 PUFA 的含量为 $16.34 \pm 0.04\%$, 其中 EPA 和 DHA 的含量仅有 $7.68 \pm 0.12\%$ 和 $2.22 \pm 0.22\%$ 。

表 3-3 11 种不同脂质组成的 AKO 的脂肪酸的组成 (%, wt)

Table 3-3 Fatty acid composition of AKO with 11 different lipid compositions (%, wt)

脂肪酸	AKO1	AKO2	AKO3	AKO4	AKO5	AKO6	AKO7	AKO8	AKO9	AKO10	AKO11
12:0	0.05±0.00 ^j	0.08±0.03 ^j	0.10±0.01 ⁱ	0.13±0.03 ^h	0.15±0.15 ^g	0.18±0.17 ^f	0.20±0.12 ^e	0.22±0.12 ^d	0.25±0.05 ^c	0.28±0.27 ^b	0.30±0.30 ^a
14:0	4.13±0.21 ^k	5.31±0.28 ^j	6.51±0.46 ⁱ	7.75±0.67 ^h	8.48±0.60 ^g	9.80±0.70 ^f	10.94±0.91 ^e	11.85±0.59 ^d	12.91±0.94 ^c	13.98±0.96 ^b	14.83±0.82 ^a
15:0	0.34±0.01 ^k	0.35±0.16 ^j	0.37±0.27 ⁱ	0.38±0.19 ^h	0.40±0.04 ^g	0.42±0.12 ^f	0.43±0.24 ^e	0.44±0.15 ^d	0.46±0.27 ^c	0.48±0.48 ^b	0.50±0.50 ^a
16:0	26.24±0.8	25.15±0.56 ^b	24.62±0.95 ^c	24.23±0.58 ^d	24.13±0.21 ^e	23.8±0.81 ^f	23.30±0.32 ^g	22.97±0.11 ^h	22.62±0.60 ⁱ	22.07±0.07 ^j	21.52±0.45 ^k
16:1	2.17±0.11 ^k	2.72±0.67 ^j	3.28±0.27 ⁱ	3.85±0.82 ^h	4.19±0.19 ^g	4.76±0.78 ^f	5.36±0.36 ^e	5.80±0.66 ^d	6.32±0.27 ^c	6.75±0.76 ^b	7.13±0.20 ^a
17:0	0.61±0.00 ^k	0.85±0.89 ^j	1.08±0.12 ⁱ	1.30±0.35 ^h	1.47±0.51 ^g	1.77±0.74 ^f	1.97±0.00 ^e	2.13±0.11 ^d	2.37±0.41 ^c	2.57±0.56 ^b	2.69±0.71 ^a
18:0	1.07±0.05 ^k	1.01±0.15 ^k	1.11±0.13 ^j	1.13±0.18 ⁱ	1.13±1.18 ^h	1.19±0.21 ^h	1.20±0.21 ^d	1.22±0.19 ^c	1.25±0.22 ^b	1.21±0.25 ^c	1.31±0.33 ^a
18:1T	7.21±0.01 ^k	7.96±0.26 ^j	8.65±0.81 ⁱ	9.31±0.46 ^h	9.81±0.02 ^g	10.68±0.54 ^f	11.18±0.23 ^e	11.69±0.57 ^d	12.31±0.42 ^c	12.86±0.77 ^b	13.24±0.18 ^a
18:1C	7.07±0.42 ^g	6.87±0.27 ^h	7.06±0.21 ^g	7.15±0.29 ^f	7.3±0.47 ^e	7.56±0.42 ^{bc}	7.48±0.53 ^d	7.54±0.57 ^c	7.64±0.78 ^b	7.80±0.75 ^{ab}	7.88±0.89 ^a
18:2C	2.26±0.11 ^f	2.24±0.27 ^g	2.28±0.29 ^f	2.33±0.33 ^e	2.36±0.37 ^d	2.41±0.40 ^c	2.45±0.45 ^{bc}	2.48±0.47 ^b	2.53±0.53 ^{ab}	2.57±0.57 ^a	2.59±0.59 ^a
18:3 n-6	0.19±0.02 ⁱ	0.20±0.01 ⁱ	0.21±0.01 ^h	0.22±0.02 ^g	0.23±0.03 ^f	0.24±0.04 ^e	0.25±0.16 ^d	0.26±0.16 ^c	0.27±0.07 ^b	0.28±0.18 ^a	0.29±0.09 ^a
18:3 n-3	2.29±0.15 ⁱ	2.24±0.22 ^j	2.29±0.27 ^h	2.34±0.31 ^g	2.36±0.39 ^f	2.43±0.41 ^e	2.47±0.46 ^d	2.49±0.5 ^c	2.54±0.57 ^b	2.64±0.63 ^a	2.64±0.67 ^a
20:1	0.39±0.01 ⁱ	0.39±0.02 ^j	0.41±0.02 ^h	0.42±0.04 ^g	0.44±0.04 ^f	0.46±0.07 ^e	0.47±0.09 ^d	0.48±0.09 ^c	0.50±0.05 ^b	0.50±0.01 ^b	0.52±0.02 ^a
20:2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.12±0.04 ^a

续表 3-3

脂肪酸	AKO1	AKO2	AKO3	AKO4	AKO5	AKO6	AKO7	AKO8	AKO9	AKO10	AKO11
20:4 n-6	0.69±0.04 ^a	0.62±0.09 ^b	0.58±0.07 ^c	0.54±0.03 ^d	0.51±0.09 ^e	0.45±0.07 ^f	0.43±0.03 ^g	0.40±0.04 ^h	0.37±0.05 ⁱ	0.32±0.13 ^j	0.30±0.03 ^k
20:3 n-3	0.45±0.04 ^e	0.43±0.38 ^g	0.44±0.23 ^f	0.45±0.13 ^e	0.44±0.41 ^f	0.42±0.25 ^g	0.46±0.26 ^d	0.47±0.35 ^c	0.48±0.25 ^b	0.47±0.18 ^c	0.50±0.25 ^a
20:5	20.74±0.05 ^a	17.46±0.07 ^b	15.90±0.15 ^c	13.56±0.40 ^d	10.66±0.04 ^e	9.88±0.14 ^f	9.09±0.05 ^g	8.88±0.06 ^h	8.53±0.05 ⁱ	7.73±0.12 ^j	7.68±0.12 ^j
22:1	0.71±0.00 ^a	0.65±0.08 ^b	0.60±0.42 ^c	0.56±0.28 ^d	0.54±0.12 ^e	0.48±0.50 ^f	0.44±0.44 ^g	0.39±0.41 ^h	0.35±0.34 ⁱ	0.29±0.30 ^j	0.26±0.16 ^k
22:6 n-3	11.43±0.08 ^a	10.29±0.08 ^b	9.52±0.29 ^c	8.26±0.05 ^d	7.56±0.20 ^e	6.48±0.27 ^f	5.31±0.12 ^g	4.36±0.13 ⁱ	3.50±0.08 ^j	3.27±0.03 ⁱ	2.22±0.02 ^k
Σ SFA	32.44±0.63 ^k	32.75±0.33 ^j	33.79±0.49 ⁱ	34.92±0.49 ^h	35.76±0.60 ^g	37.16±0.27 ^f	38.04±0.24 ^e	38.83±0.13 ^d	39.86±0.52 ^c	40.59±0.51 ^b	41.15±0.24 ^a
Σ MUFA	17.55±0.38 ^d	18.59±0.52 ^f	20.00±0.51 ^e	21.29±0.21 ^e	22.28±0.45 ^d	23.94±0.31 ^c	24.93±0.11 ^c	25.9±0.41 ^{bc}	27.12±0.24 ^b	28.20±0.24 ^a	29.03±0.41 ^a
Σ PUFA	38.05±1.24 ^a	33.48±1.42 ^b	31.22±1.15 ^c	27.70±0.83 ^d	24.12±0.14 ^e	22.31±1.43 ^f	20.46±0.53 ^g	19.34±0.21 ^h	18.22±0.19 ^j	17.28±0.33 ^j	16.34±0.04 ^k
Σ PUFA(n-3)	14.17±1.43 ^a	12.96±1.35 ^b	12.25±2.40 ^b	11.05±0.42 ^c	10.36±0.82 ^d	9.33±0.16 ^e	8.24±1.63 ^f	7.32±0.25 ^g	6.52±1.35 ^h	6.30±0.33 ^j	5.36±0.14 ^j

注：SFA，饱和脂肪酸；MUFA，单不饱和脂肪酸；PUFA，多不饱和脂肪酸；PUFA（n-3），n-3 多不饱和脂肪酸；“—”，未检出。

3.3.1.3 微量物质

图 3-3 为 11 种不同脂质组成的 AKO 中微量物质的液相色谱图, 图 3-3A 为虾青素的液相色谱图, 虾青素成分在 4 min 左右出峰, 虾青素含量从 AKO1 到 AKO11 逐渐升高, 图 3-3B 为生育酚的液相色谱图, 由图可见生育酚成分在 7 min 左右出峰, 生育酚含量从 AKO1 到 AKO11 逐渐升高, 图 3-3C 为维生素 A 的液相色谱图, 由图可见维生素 A 成分在 4 min 左右出峰, 维生素 A 含量从 AKO1 到 AKO11 逐渐升高。虾青素、生育酚和维生素 A 在 11 种 AKO 中的分布趋势一致, 即 AKO1 中含有最少的虾青素 ($3.01 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$)、生育酚 ($221.17 \pm 0.41 \mu\text{g/g}$) 和维生素 A ($4.08 \pm 0.17 \mu\text{g/g}$), 随样品编号逐渐升高, 在 AKO11 中含有最多的虾青素 ($77.04 \pm 1.24 \mu\text{g/g}$)、生育酚 ($448.16 \pm 5.12 \mu\text{g/g}$) 和维生素 A ($45.08 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$)。11 种 AKO 之间微量成分含量的变化趋势与 11 种 AKO 之间 TG 的变化呈现相同的趋势, 与 11 种 AKO 之间 PL 的变化呈现相反的趋势。因此 AKO 中的中性脂质越高, 说明其中伴随的微量成分也越高。这一结论与 Xie^[19]的研究一致, Xie 采用三步提取法, 分别以丙酮、己烷和乙醇为提取溶剂, 对三种不同成分的 AKO 进行选择提取。其中丙酮法提取的 A-KO 中 PL 和 n-3 PUFA 含量最低 (2.32%), 但微量成分含量最高 (虾青素 505.00 mg/kg、生育酚 29.39 mg/100 g、维生素 A 34.32 mg/100 g、胆固醇 27.95 mg/g)。使用乙醇提取的 E-KO 中, 尽管存在微量成分, 但 PL (59.52%) 和 n-3 PUFA (41.74%) 含量最高。用己烷提取的 H-KO 中的 PL 达到中等含量, 其余各项检测指标均为中等含量。

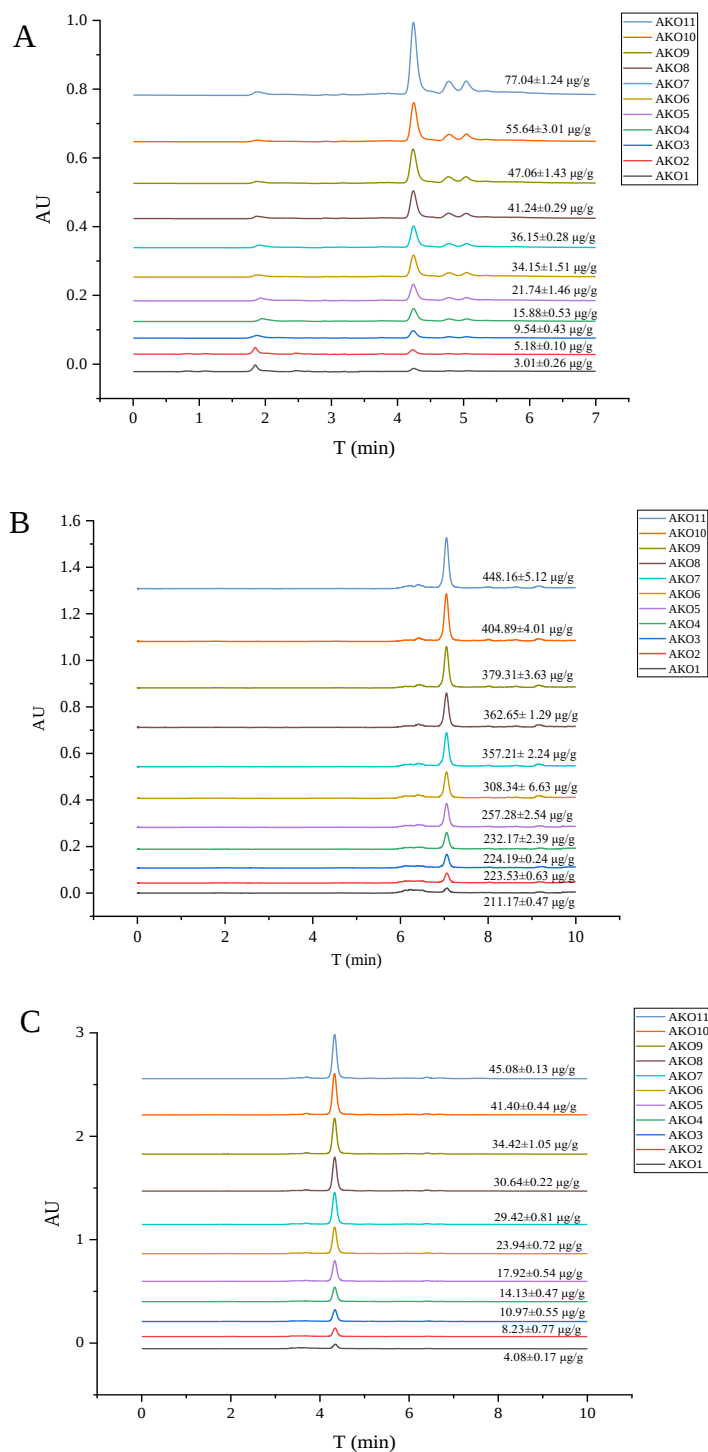


图 3-2 11 种不同脂质组成的 AKO 中微量物质的 HPLC 图。图 A: 虾青素；图 B: α -生育酚；图 C: 维生素 A

Figure 3-2 HPLC graphs of trace substances in 11 AKOs. A: Astaxanthin; B: α -Tocopherol; C: Vitamin A

3.3.2 AKO 脂质组成与氧化稳定性的相关性

3.3.2.1 不同脂质组成的 AKO 氧化诱导时间

Oxitest 仪是一种适用范围广泛的食品氧化稳定测试仪，其基于食品氧化过程中氧气压力的变化，计算得到食品的氧化诱导时间^[71,72]。表 3-4 为 11 种不同脂质组成的 AKO 经 Oxitest 仪测试得到氧化诱导时间，氧化诱导时间越长说明氧化稳定性越好。可看出，AKO4 的氧化诱导时间最长，表明其具有最强的氧化稳定性，其次则为 AKO2、AKO3、AKO5，氧化诱导时间最短的是 AKO10，说明 AKO10 的氧化稳定性最差。

一般认为抗氧化微量物质是油脂体系抗氧化能力的主要原因，但从表 3-4 可知，含有微量成分最高的 AKO11、AKO10 和 AKO9 的氧化稳定性相对于其他 AKO 体系较低，说明含微量成分越高的 AKO 并不等于拥有较高的抗氧化能力。但这并不意味着这些微量成分不具备抗氧化能力，只是在 AKO 氧化初期这些成分就被很快降解了，同时也说明 AKO 中的其他成分对 AKO 氧化稳定性的贡献高于虾青素、维生素 A 和生育酚。还有研究认为^[20]，由于 AKO 中的 PL 成分较为稳定不易氧化，因此 PL 越高其氧化稳定性也越高。但从表中结果可知，含 PL 最高的 AKO1 的氧化稳定性并不是最高的，氧化稳定性最高的是含有 $47.53 \pm 1.17\%$ PL 和 $17.98 \pm 1.21\%$ TG 的 AKO4。本研究可认为，当 AKO 中的脂质组分为一定比例存在时，氧化稳定性才能达到最高。这是由于 AKO 中的氧化机制复杂，这些脂质组分不仅自己单独存在时具有抗氧化活性，当它们同时存在时还会产生抗氧化协同作用，使得氧化稳定性提高。

表 3-4 11 种不同脂质组成 AKO 的氧化诱导时间

Table 3-4 Oxidative induction time of AKO for 11 different lipid compositions

样品	氧化诱导时间 (h)
AKO1	4.24 ±0.05 ^f
AKO2	6.41 ±0.06 ^b
AKO3	6.63 ±0.06 ^b
AKO4	7.65 ±0.12 ^a
AKO5	6.03 ±0.14 ^c
AKO6	5.02 ±0.23 ^e
AKO7	5.47 ±0.34 ^d
AKO8	3.41 ±0.14 ^g
AKO9	2.96 ±0.26 ^h
AKO10	2.91 ±0.24 ^h
AKO11	3.55 ±0.2 ^g

注：AKO，南极磷虾油。

3.3.2.2 脂质组成与氧化诱导时间的相关性系数分析

为了研究脂质组分与 Oxitest 氧化稳定系数之间的相关性，测定了不同成分之间的 Pearson 相关系数(PCC)^[73]。数据如表 3-5 所示。根据 PCC 的 *p* 值，发现 TG、虾青素、维生素 A、生育酚和 PL 含量都与 AKO 氧化稳定性高度相关。但只有 PL 与 AKO 的抗氧化能力呈正相关，说明 AKO 的抗氧化能力主要由 PL 含量决定。这是由于 PL 可以：1、螯合金属离子^[74]；2、发生美拉德反应形成抗氧化物吡咯^[75]；3、改变初级抗氧化剂的位置使其接近最大氧化应激部位^[56]；4、再生初级抗氧化剂如生育酚^[76]。其他物质的 *P* 值为负值，但并不意味着这些微量成分不具备抗氧化作用。由于本课题并未详细检测各样品的化学自由基清除能力，而仅采用 Oxitest 仪检测食品整体体系的氧化稳定系数，评判标准较单一，从而导致微量成分与 PL 比起来对 AKO 氧化稳定性的贡献并没有起到积极作用。

表 3-5 AKO 氧化稳定性与主要化学成分含量的 Pearson 相关系数(PCC)

Table 3-5 PPC of oxidative stability of AKO with the main chemical components

	TG	PL	虾青素	维生素 A	生育酚
相关性系数	-0.707**	0.614**	-0.696**	-0.701**	-0.766**

注：*为差异显著($P < 0.05$)；**为差异极显著($P < 0.01$)。

3.3.3 不同脂质组成 AKO 的加速氧化实验

3.3.3.1 不同脂质组成 AKO 加速氧化过程中 EPA 与 DHA 的变化

EPA 和 DHA 是 AKO 中主要的 PUFA，是脂质氧化的主要底物，在氧化过程中的变化可以反映出 AKO 的氧化劣变行为。根据 EPA 和 DHA 加速氧化过程中含量的变化，拟合零级氧化动力学与一级氧化动力学方程。表 3-6 和表 3-7 分别为 11 种不同脂质组成的 AKO 氧化过程中 EPA 和 DHA 的氧化动力学模型。

结果表明，EPA 和 DHA 在 11 种 AKO 中的变化符合零级动力学模型和一级动力学模型。通过比较模型 R^2 可知，一阶动力学模型拟合较好，这与 Xie 等^[22]的研究一致。通过比较一级氧化动力学方程的斜率，即氧化速率（ k 值），可知 k （AKO11-EPA） $> k$ （AKO1-EPA）， k （AKO11-DHA） $> k$ （AKO1-DHA）说明 AKO11 中的 EPA 和 DHA 的降解速度高于 AKO1，即 TAG 形式存在的 EPA 和 DHA 氧化速率高于 PL 形式存在的 EPA 和 DHA。此外，EPA 和 DHA 在 AKO4 中的氧化速率最低，分别比 k （AKO11-EPA）和 k （AKO11-DHA）低 0.167 和 0.296 倍，比 k （AKO1-EPA）和 k （AKO1-DHA）低 0.13 和 0.147 倍。EPA 和 DHA 在 AKO10 中的氧化速率最高， k （AKO10-EPA）分别比 k （AKO11-EPA）、 k （AKO1-EPA）和 k （AKO4-EPA）高 1.083、1.130 和 1.3 倍， k （AKO10-DHA）分别比 k （AKO11-DHA）、 k （AKO1-DHA）和 k （AKO4-DHA）高 1.097、1.956 和 2.25 倍，说明 EPA 和 DHA 在 AKO4 中的氧化稳定性较好，而在 AKO10 中的氧化稳定性较差。

表 3-6 不同脂质组成 11 种 AKO 中的 EPA 氧化降解的氧化动力学模型

Table 3-6 Oxidative kinetic modelling of the oxidative degradation of EPA in 11 AKOs

样品	氧化动力学模型	方程	R ²
AKO1	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.023t + 0.009$	0.939
	零级氧化动力学	$C_T = -0.467t - 0.247$	0.924
AKO2	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.022t + 0.023$	0.933
	零级氧化动力学	$C_T = -0.415t - 0.845$	0.895
AKO3	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.022t + 0.009$	0.924
	零级氧化动力学	$C_T = -0.398t - 0.955$	0.882
AKO4	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.02t + 0.024$	0.928
	零级氧化动力学	$C_T = -0.356t - 0.747$	0.889
AKO5	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.023t + 0.005$	0.930
	零级氧化动力学	$C_T = -0.373t - 0.465$	0.903
AKO6	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.023t + 0.018$	0.919
	零级氧化动力学	$C_T = -0.361t - 0.046$	0.913
AKO7	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.023t + 0.013$	0.905
	零级氧化动力学	$C_T = -0.327t - 0.159$	0.903
AKO8	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.023t + 0.002$	0.932
	零级氧化动力学	$C_T = -0.309t - 0.301$	0.918
AKO9	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.025t + 0.006$	0.911
	零级氧化动力学	$C_T = -0.283t - 0.377$	0.874
AKO10	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.026t + 0.025$	0.908
	零级氧化动力学	$C_T = -0.282t - 0.592$	0.863
AKO11	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.024t + 0.018$	0.920
	零级氧化动力学	$C_T = -0.244t - 0.426$	0.885

注：AKO，南极磷虾油；EPA，二十碳五烯酸。

表 3-7 不同脂质组成 11 种 AKO 中的 DHA 氧化降解的氧化动力学模型
Table 3-7 Oxidative kinetic modelling of oxidative degradation of DHA in 11 AKOs

样品	氧化动力学模型	方程	R ²
AKO1	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.034t + 0.068$	0.971
	零级氧化动力学	$C_T = -0.272t - 14.967$	0.981
AKO2	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.032t + 0.106$	0.906
	零级氧化动力学	$C_T = -0.246t - 13.422$	0.909
AKO3	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.030t + 0.082$	0.929
	零级氧化动力学	$C_T = -0.222t - 13.243$	0.926
AKO4	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.029t + 0.079$	0.903
	零级氧化动力学	$C_T = -0.186t - 13.785$	0.904
AKO5	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.033t + 0.096$	0.941
	零级氧化动力学	$C_T = -0.183t - 13.651$	0.934
AKO6	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.034t + 0.089$	0.923
	零级氧化动力学	$C_T = -0.162t - 14.023$	0.905
AKO7	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.039t + 0.103$	0.909
	零级氧化动力学	$C_T = -0.147t - 13.234$	0.889
AKO8	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.04t + 0.090$	0.921
	零级氧化动力学	$C_T = -0.121t - 13.287$	0.887
AKO9	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.042t + 0.15$	0.901
	零级氧化动力学	$C_T = -0.099t - 11.239$	0.881
AKO10	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.043t + 0.534$	0.907
	零级氧化动力学	$C_T = -0.097t - 11.239$	0.865
AKO11	一级氧化动力学	$\ln C_t = -0.041t + 0.129$	0.929
	零级氧化动力学	$C_T = -0.061t - 11.239$	0.902

注：AKO，南极磷虾油；DHA，二十二碳六烯酸。

3.3.3.2 不同脂质组成 AKO 加速氧化过程中虾青素的变化

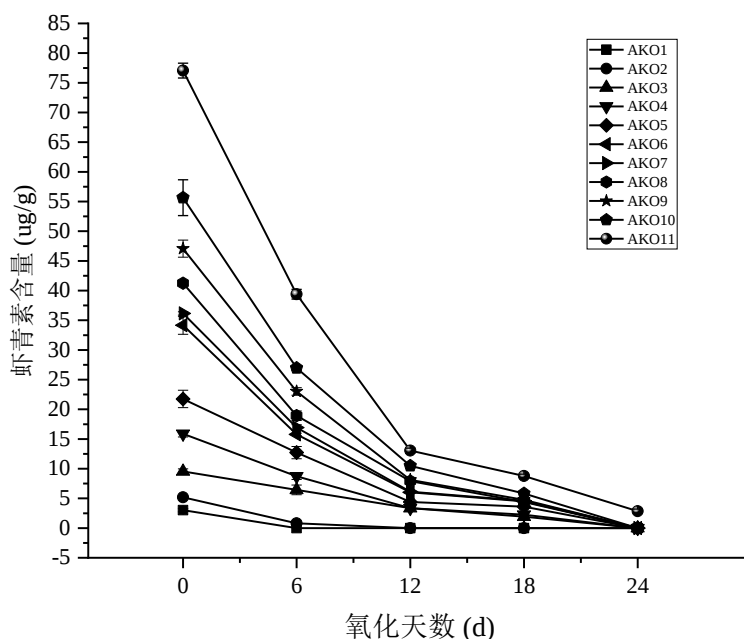


图 3-4 11 种 AKO 中虾青素在氧化 24d 过程中的降解趋势

Figure 3-4 Degradation trends of astaxanthin in 11 AKOs during oxidation for 24 d

由图 3-4 可知，在氧化初期，AKO11 种含有较高浓度的虾青素，虾青素的含量随样品编号依次递减，AKO1 中含有最低的虾青素含量。随着氧化天数的增加，所有 AKO 样品中的虾青素含量逐渐降低直到降解到检测不到（第 24 d）。在氧化第 6 d 时，AKO1 中已不能检测到虾青素含量，说明在氧化前 6 d 时，AKO1 中少量的虾青素已被氧化降解，同阶段其他样品组中的虾青素也显著降低。在氧化第 12 d 时，AKO2 中的虾青素也完全降解不能被检测到。在氧化第 24 d 时，绝大多数 AKO 样品中已不能检测到虾青素，只有 AKO11 中还含有少量的虾青素。所有的虾油虾青素的降解趋势都相似，说明不管 AKO 的脂质组成如何，对虾青素的氧化降解行为都没有差异性。

在氧化初期时虾青素的显著下降可能是由于虾青素在 AKO 氧化过程中，作为油脂体系中的抗氧化剂被优先氧化分解了。Song 等^[48]监测了 AKO 在贮藏期间的虾青素含量变化，虾青素的含量从 269.67 mg/kg 降到 120.00 mg/kg，虾青素含量的快速下降表明，虾青素在 AKO 的储藏过程中充当了氧化底物，从而保护了 AKO 使其不被氧化。Wang 等^[77]也得出了相同的结论，在添加了促氧化金属离子的 AKO 中，抗氧化物虾青素的含量随着储藏时间的推移而降解，共轭双键（色基）被降解为类胡萝卜素醛和碳链较短的酮。这说明南极磷

虾青素是一种抗氧化活性很高的物质，它天然存在于 AKO 中，为提高 AKO 的储藏稳定性做出了较大贡献。

3.3.3.3 不同脂质组成 AKO 加速氧化过程中维生素 A 的变化

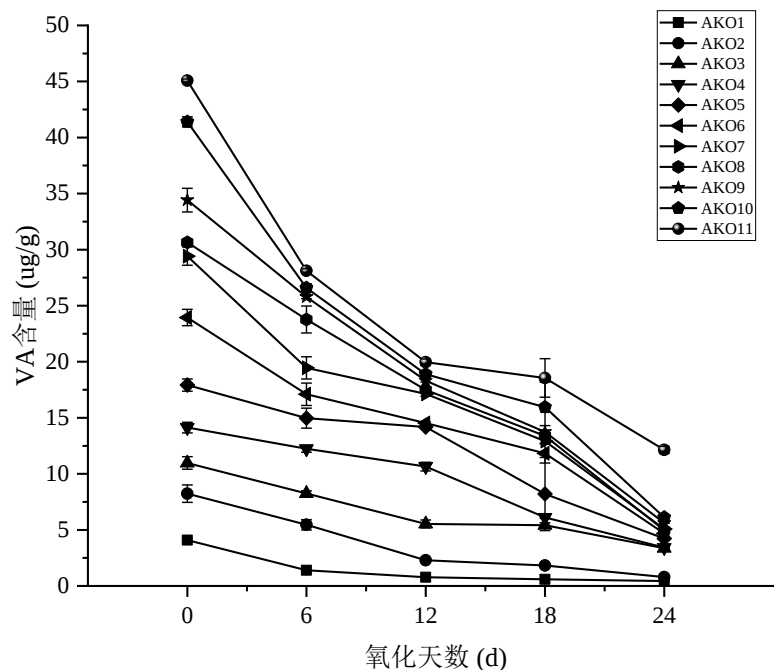


图 3-5 11 种 AKO 中维生素 A 在氧化 24 d 过程中的降解趋势

Figure 3-5 Trends in the degradation of vitamin A in 11 AKOs during oxidation for 24 d

如图 3-5 所示，维生素 A 作为一种在 AKO 中存在的微量活性物质，在 AKO11 中的含量最高，在 AKO1 中的含量最低，随样品编号依次递减。在 AKO 加速氧化过程中，维生素 A 的含量在所有样品组中呈现逐渐降低的趋势。这是由于维生素 A 在 AKO 氧化过程中作为抗氧化剂自身被氧化降解。在钱时权等^[78]的研究中证实了维生素 A 具有抗氧化活性，通过人工模拟贮藏条件，研究了维生素 A 单独作用于高油脂性稀奶油的抗氧化作用。随着储藏时间的延长，空白组油样的过氧化值先维持恒定，当处理时间超过 60 min 以后，空白组油样的过氧化值呈增加趋势。而在油样中添加维生素 A 质量浓度在 0.0003~0.0015 mg/mL 范围内时，则会对油脂体系产生明显的抗氧化效果。这是由于维生素 A 作为阻断反应链的抗氧化剂，与有机过氧化自由基结合，使得自身水平的下降。维生素 A 的演化机制可能是由于维生素 A 是含有 β -白芷酮环和 2 分子 2-甲基丁二烯构成的不饱和一元醇，自身容易被氧化，从而避免了机体内脂质过氧化反应的发生^[79]；而且维生素 A 结构侧链中含有的双烯共轭键，能够有效地淬灭和捕捉过氧化反应中产生的单线态氧、羟自由基、脂质

过氧化自由基等，防止过氧化物对机体的伤害^[81]。

3.3.3.4 不同脂质组成 AKO 加速氧化过程中生育酚的变化

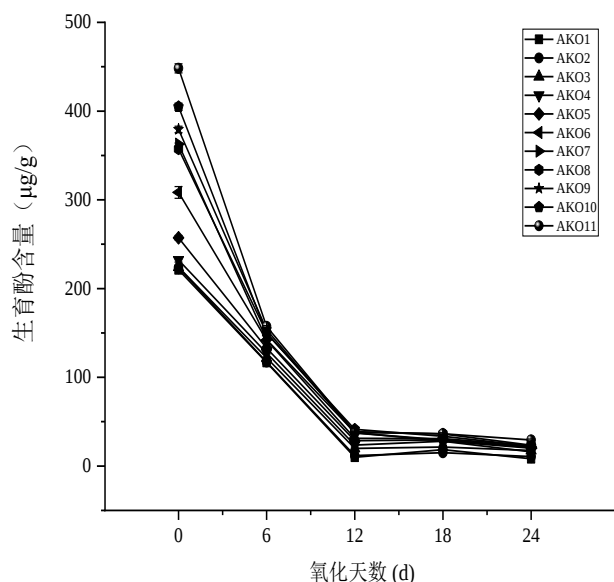


图 3-6 11 种 AKO 中生育酚在氧化 24 d 过程中的降解趋势

Figure 3-6 Degradation trends of tocopherols in 11 AKOs during oxidation for 24 d

如图 3-6 所示，生育酚作为一种有益活性物质在所有 AKO 体系氧化过程中呈现逐渐氧化降解的趋势。在前 12 d，所有的 AKO 样本组中的生育酚显著下降，可能是作为抗氧化剂被氧化降解。在第 18 d 时，AKO7~AKO11 中的生育酚继续下降，而 AKO1~AKO6 样品中的生育酚相对于第 12 d 却表现出略有增加的现象，这可能是在这些 AKO 中发生了 PL 与生育酚的抗氧化协同效应，使得生育酚再生，导致其含量增加^[55]。

3.4 本章小结

本章以第二章制备所得的富含中性脂质的 S-AKO 和富含极性脂质的 E-AKO 为基料，复配制得 11 种不同脂质组成的 AKO（命名为 AKO1~11），测定氧化诱导时间，明确其脂质组分（TG、PL、虾青素、生育酚和维生素 A）并探讨各组分与氧化诱导时间之间的相关性，进一步通过加速氧化实验研究 11 种 AKO 氧化劣变行为差异，结论如下：

（1）从 AKO1 到 AKO11，TG 和微量成分的含量逐级递增，PL 和 PUFA 的含量逐级递减。氧化稳定时间测定结果显示，AKO4 氧化诱导时间最长，其次则为 AKO2、AKO3、AKO5，最短的是 AKO10，说明当 AKO 中的脂质组分为一定比例存在时，氧化稳定性才

能达到最高。进一步分析不同脂质组分与氧化诱导时间之间的 PCC，发现 TG、虾青素、维生素 A、生育酚和 PL 含量都与 AKO 氧化稳定性高度相关，但只有 PL 与 AKO 的抗氧化能力呈正相关。

(2) 在加速氧化过程中，EPA 和 DHA 在 11 种 AKO 中的变化符合零级动力学模型和一级动力学模型。通过比较模型 R^2 可知，一阶动力学模型拟合较好。通过比较 k 值，可知 AKO11 中的 EPA 和 DHA 的降解速度高于 AKO1，即 TAG 形式存在的 EPA 和 DHA 氧化速率高于 PL 形式存在的 EPA 和 DHA。此外，在 AKO4 中 EPA 与 DHA 表现的氧化速率最低，说明相对于其他 AKO 而言，EPA 和 DHA 在 AKO4 中氧化较慢。这与 Oxitest 氧化诱导时间表现出来的结果相似，这说明在 11 种 AKO 体系中，AKO4 有着较好的氧化稳定性。

(3) 在 24 d 的加速氧化过程中，具有抗氧化功能的虾青素、维生素 A 和生育酚总体呈现下降趋势，但 PL 含量较高的 AKO1~6 种的生育酚含量在第 18 d 时呈现略回升现象，这与 PL 对生育酚的再生作用有关，证实了 PL 与生育酚的抗氧化协同作用。

第4章 加速氧化过程对不同脂质组成 AKO 脂质氧化的影响

4.1 引言

AKO 脂质组成复杂，现阶段还没有系统地研究其加速氧化时脂质劣变的相关报道。前两章在脂质组成的方向上研究了不同种 AKO 在氧化过程中，组成脂质的变化情况，但无法从观察到脂质分子层面的变化。脂质组学是一种基于高通量分析技术，系统性的解析样品脂质组成与表达变化的研究模式，能够高效的研究脂质分子在氧化过程中的改变。本章以第3章复配的11种AKO中的三种脂质差异悬殊的AKO为原料，即AKO1、AKO4、AKO11。其中，AKO1富含中性脂质，AKO11富含极性脂质，两种油组成差异极端，同时由第三章的结论可知，AKO4具有较好的氧化稳定性因此三种AKO相比于其他几种具有较高的研究价值。本章将它们重新编号为HPL、MPL和LPL。采用脂质组学方法监测并分析这三种AKO在加速储存24d期间的脂质变化，筛选显著差异脂质，作为鉴别AKO贮藏品质的脂质标记物，并比较三种不同脂质组成的AKO氧化过程的差异。

4.2 试验材料与仪器设备

4.2.1 药品与试剂

乙腈；异丙醇；甲醇；甲基叔丁基醚购于阿拉丁。

4.2.2 仪器与设备

LHP-160 恒温恒湿培养箱（上海三发科学仪器有限公司）；低温高速离心机（Eppendorf 5430R）；Q-Exactive Plus 质谱仪（Thermo Scientific）；UHPLC Nexera LC-30A 超高效液相色谱仪（SHIMADZU）。

4.3 实验方法

4.3.1 样本的制备

本章所用的样本为第3章制备的AKO1；AKO4；AKO11，将其分别重新编号为LPL；MPL；HPL。

质控样本（QC）的制备：等量取各组 AKO 样品混合为 QC 样本。QC 样本不仅用于测定进样前仪器状态及平衡色谱-质谱系统，也穿插在待测样本检测过程中，用于评价整个实验过程中系统稳定性。

4.3.2 AKO 的加速氧化

利用 Schaal 烘箱加速氧化法用于模拟 AKO 在室温下的贮藏。将 AKO 置于棕色样品瓶中，在恒温恒湿（50℃，50%rh）的培养箱中氧化 24 d。每隔一段时间调整样品瓶在培养箱中的位置。分别在氧化第 0 d、6 d、12 d、18 d 和 24 d 这 5 个时间段从样品瓶中取出适量的 AKO，储存于-20℃的冰箱中待检测。

4.3.3 样本预处理方法

在样品中加入水、内标以及预冷甲醇涡旋混匀，低温水浴中超声 20 min 后离心 15 min，取上层有机相。复溶于 90%异丙醇/乙腈溶液，取 90 μ L 离心 15 min，取上清进样分析。

4.3.4 色谱-质谱分析

色谱条件：C18 色谱柱；流速为 300 μ L/min；柱温为 45℃。流动相组成 A：乙腈水溶液（乙腈:水=6:4，v/v）+0.1%甲酸+0.1mM 甲酸铵，B：乙腈异丙醇溶液（乙腈:异丙醇=1:9，v/v）+0.1% 甲酸+0.1 mM 甲酸铵。梯度洗脱程序如下：0~3.5 min，B 维持在 40%；3.5~13 min，B 从 40%线性变化至 75%；13~19min，B 从 75%线性变化至 99%；19~24min，B 维持在 40%。

质谱条件：样品经 UHPLC 分离后采用 Q Exactive 系列质谱仪（Thermo Scientific™）进行质谱分析。脂质分子和脂质碎片的质量电荷比，按照下列方法采集：每次全扫描后采集 10 个碎片图谱（MS2 scan，HCD）。

4.3.5 数据分析流程

采用 LipidSearch 对脂质分子及脂质分子进行峰识别、峰提取、脂质鉴定（二级鉴定）等处理。对 LipidSearch 提取得到的数据首先进行质量评价，通过后再进行数据分析。数据分析内容包括鉴定数量统计、脂质组成分析和脂质差异分析。

数据分析和图表制作通过中科新生命云平台和迈维代谢云平台完成。

4.4 结果与分析

4.4.1 AKO 脂质的数据质量评价

采用基于 UHPLC-MS/MS 技术的脂质学方法，对三种 AKO 的 QC 样品进行了正负离子模式测试。通过质控内容对仪器的稳定性、实验的重复性、数据质量的可靠性进行了全面评价。图 4-1 为 QC 样品正离子模式 BPC 重叠图谱，图 4-2 为 QC 样品负离子模式 BPC 重叠图谱。

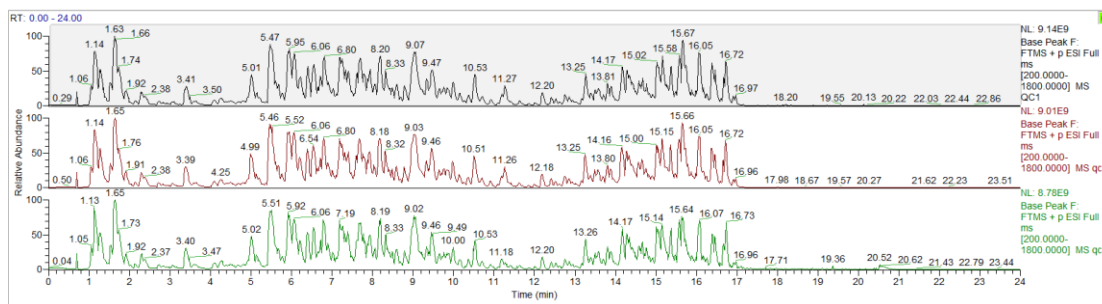


图 4-1 QC 样品正离子模式 BPC 重叠图谱

Figure 4-1 Positive ion mode BPC overlap mapping of QC samples

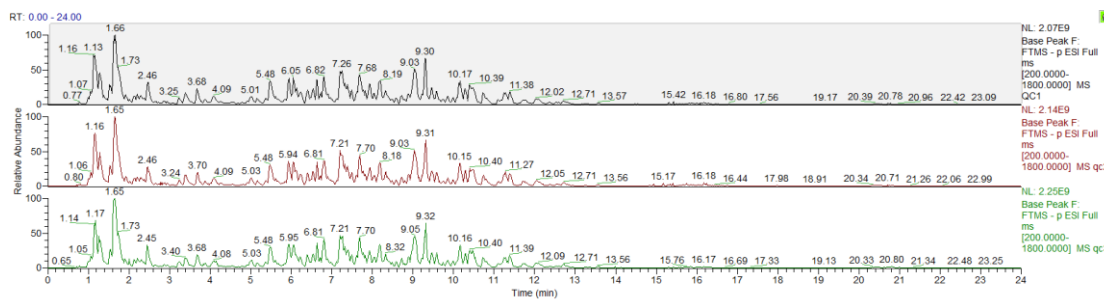


图 4-2 QC 样品负离子模式 BPC 重叠图谱

Figure 4-2 Negative ion mode BPC overlap mapping of QC samples

图中横坐标为出峰时间，纵坐标表示峰的强度值。由图可见，各 QC 样本的色谱峰响应强度和保留时间基本重叠，离子的保留时间和峰强度一致。这表明当通过液质联用技术在不同时间检测相同样品时，仪器的信号稳定性较好，实验数据重复性较好，可以进行后续分析。

4.4.2 AKO 脂质鉴定数量统计和脂质轮廓分析

脂类化合物包括八大类，分别为甘油酯类（glycerolipids，GLs）、甘油磷脂类（glycerophospholipids，GPs）、鞘脂类（sphingolipids，SPs）、固醇脂类（sterol lipids，STs）、脂肪酸类（fatty acids，FAs）、孕烯醇酮脂类（prenol lipids，PRs）、糖脂类（saccharolipids，

SLs) 和多聚烯类 (polyketides, PKs) [80]。每个大类又可以根据头基的不同细分为不同的亚类, 每一亚类又基于碳链饱和度和长度的不同分为不同的脂质分子, 由此构成了脂类化合物大类-亚类-分子三级分类体系。

本实验 UHPLC-MS/MS 技术的脂质学方法总共鉴定出 41 种脂质亚类以及 4812 种脂质分子。根据 Gerhard 等人 [81] 提供的 Lipid Maps 数据库可将这 4812 种脂质分子分为七大类, 每一大类又可分为不同的小类, 如图 4-3 所示。

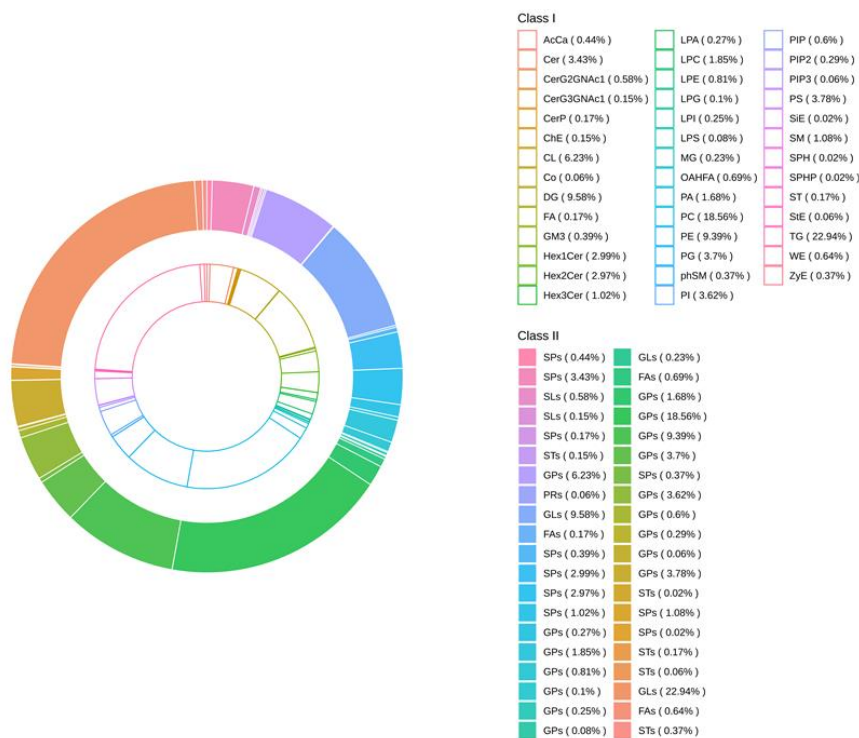


图 4-3 AKO 中脂质亚类和大类的百分比

Figure 4-3 Percentage of lipid subclasses and macroclasses in AKO

图中外环为本章所测 AKO 样品中包含的七种脂质大类, 包括 72 个脂肪酸类 (FAs, 1.49%), 1576 个甘油酯类 (GLs, 32.75%), 2468 个甘油磷脂类 (GPs, 51.29%), 3 个孕烯醇酮脂类 (PRs, 0.06%), 35 个糖脂类 (SLs, 0.72%), 621 个鞘脂类 (SPs, 12.9%) 和 37 个固醇脂类 (STs, 0.77%)。每一大类又可进一步分为不同的亚类, 如内环所示: FAs 中有三个亚类 (FA 脂肪酸、OAHFA 羟基脂肪酸、WE 蜡萃取物); GLs 中有三个亚类 (MG 甘油一酯、DG 甘油二酯、TG 甘油三酯); GPs 中有十六个亚类 (CL 心磷脂、LPA 溶血磷脂酸、LPC 溶血磷脂酰胆碱、LPE 溶血磷脂酰乙醇胺、LPG 溶血磷脂酰甘油、LPI 溶血磷脂

酰肌醇、LPS 溶血磷脂酰丝氨酸、PA 磷脂酸、PC 磷脂酰胆碱、PE 磷脂酰乙醇胺、PG 磷脂酰甘油、3 种 PI (PIP、PIP₂、PIP₃) 磷脂酰肌醇、PS 磷脂酰丝氨酸); PRs 中有一个亚类 (Co 辅酶); SLs 中有两个亚类 (CerG2GNAC1/CerG23GNAC2 两种糖基神经酰胺); SPs 中有 11 个亚类 (AcCa 脂肪酰肉碱、Cer 神经酰胺、Cerp 磷酸神经酰胺、GM3 神经节苷脂、HeX1Cer/HeX2Cer/HeX3Cer 几种己糖神经酰胺、phSM 植物鞘氨醇、SM 鞘磷脂、SPH 鞘氨醇、SPHP 磷酸鞘氨醇); STs 中有五个亚类 (ChE 胆固醇酯、ZyE 酵母甾醇、SiE 谷甾醇酯、ST 硫脂、StE 豆甾醇酯)。AKO 的脂质组成相比于其他油脂而言非常丰富,如,孙嘉阳^[82]检测的榛子油中仅含有 98 种脂质分子和 10 种亚类脂质;肖明飞^[83]检测的猪油中仅含有 1179 种脂质分子和 35 种亚类脂质;周湘人^[80]检测的鱼油中含有 43 种亚类脂质和 1433 种脂质分子;而本章检测的 AKO 样品中总共检测出 41 种脂质亚类以及 4812 种脂质分子。以上结果说明 AKO 的脂质组成丰富多样,不仅使得 AKO 的营养价值较高,这些复杂的脂质组成也将导致 AKO 氧化劣变行为的多样化。

4.4.3 低、中、高磷脂含量的三种 AKO 氧化前的脂质组成差异

4.4.3.1 三种未氧化 AKO 中各亚类脂质含量占比

分别计算 LPL、MPL、HPL 三种磷虾油在氧化前 (分别编号为 LPL1、MPL1、HPL1),其中各脂质亚类的含量及比例,明确了三种磷虾油中各亚类脂质占总脂质含量的百分比情况,如图 4-4 展示的是三种 AKO 脂质组成分析结果,图中仅展示含量高于 1%的亚类脂质。

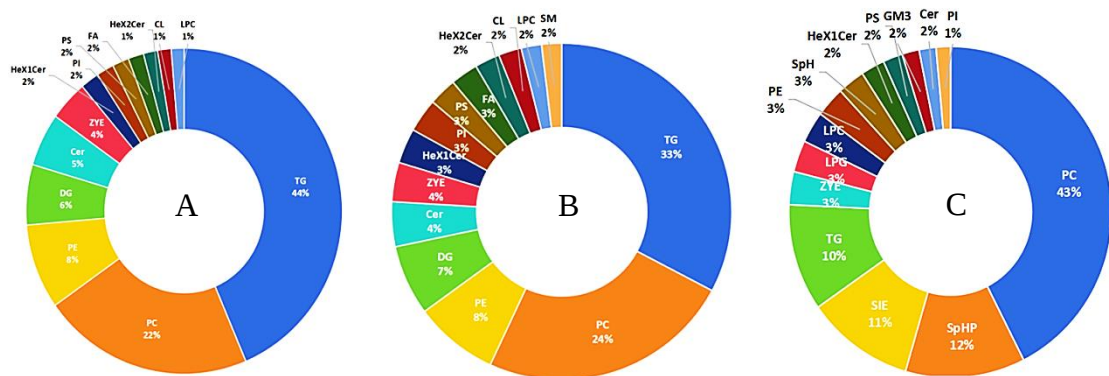


图 4-4 (A) LPL1 脂质亚类百分比 (B) MPL1 脂质亚类百分比 (C) HPL1 脂质亚类百分比

Figure 4-4 (A)Percentage of LPL1 lipid subclasses (B) Percentage of MPL1 lipid subclasses (C) Percentage of HP1L lipid subclasses

由图可见, LPL1 中占比最高的是 TG (44%), 其次为 PC (22%)。MPL1 中占比最高

的为 TG (33%), PC (24%) 含量略低于 TG。在 HPL1 中含量最高的为 PC (43%), 其次为 SpHP (12%)。由图中数据可计算得出, GLs 在 LPL1、MPL1、HPL1 中的含量分别为 50%、40%、10%, GPs 在 LPL1、MPL1、HPL1 中的含量分别为 36%、42%、55%。即中性脂质含量在三种油中逐渐下降, 而极性脂质含量在三种油中逐渐升高。这一现象与第三章中测得的这三种 AKO 中的 TG 与 PL 含量的变化趋势一致, 说明了数据的可靠性。但本课题为了仪器测定的稳定性, 初期制备的样品需要在冰箱冻存一段时间, 与后续制备的样品一起检测。导致 AKO 在-20℃的冰箱中储藏的时间过久可能发生了缓慢的氧化水解反应, 使得其中脂质的含量与第三章所测有差异, 此外, 本章于第三章检测方法的不同也会导致结果具有差异。一般来讲, 溶血磷脂作为一种 PL 的氧化水解产物, 在未氧化的 AKO 中的含量较低, 如: 李雅婷等人^[84]测得新鲜提取的 AKO 中的 LPC 的含量为 0.79~1.16%。胡劼等人^[85]采用高效液相色谱法测得 AKO 中的 LPC 含量为 2.6%。而 HPL1 中的溶血磷脂在 6% 以上 (其中 LPC 为 3%), 且含磷量本来就低的 MPL1 和 LPL1 中也分别检测到了 2% 和 1% 的溶血磷脂, 说明了这三种 AKO 样品在冰箱中储藏时, PL 可能在磷脂酶的作用下发生了氧化水解反应, 这种酶在-20℃时 also 具有很高的活性, 进而导致 AKO 部分脂质的降解以及部分脂质的生成, 从而使得本章 AKO 样品中的脂质含量与第三章比起来有所不同。

除了常关注的 GLs 和 GPs 外, 在这三种虾油中还发现了甾醇成分, ZyE 是一种酵母甾醇, 在三种虾油中的表达量相似, 但这种甾醇目前在 AKO 中鲜有研究报道。在其他研究中^{[41][42]}, AKO 中的甾醇主要为胆固醇、去甲甾醇、22-脱氢胆固醇、以及其他甾醇。比较三种 AKO 可发现, LPL1 与 MPL1 中的亚类脂质组成极为相似只是含量略有不同。在含量高于 1% 的亚类脂质中, MPL1 仅比 LPL1 多了一种 SM。SM 是一种鞘磷脂, 不仅是一种膜磷脂, 也是一种诱导细胞凋亡的调节因子^[86]。与 LPL1 和 MPL1 比起来, HPL1 中含有较多的 SP 和 ST。如在 HPL1 中含量第二和第三高的分别为一种 SP (SpHP, 12%) 和一种 ST (SiE, 11%)。其中, SpHP 是鞘氨醇在是鞘氨醇激酶作用下产生的磷脂信号分子, 可调节多种生理功能^[87]。SiE 广泛存在于谷物和油料植物中, 具备多种生理活性, 如降低胆固醇、抗炎抑菌等^[88]。目前对 AKO 脂质组学的研究主要集中于 PC、TG 型脂肪酸的组成, 但本章发现 AKO 中, 尤其 HPL 中含有较高比例的 SPs 和 STs, 甚至超过了 TG 的含量。由于物质的组成决定其性质, 因此大量的 SPs 和 STs 是否对 AKO 的氧化劣变行为有影响, 这一问题有待后续的研究。

4.4.3.2 三种未氧化 AKO 的脂质组学数据多元统计分析

(1) 主成分分析

主成分分析 (PCA) 是一种无监督识别模式的多维统计分析方法^[89], 通过 PCA 对三种 AKO 样品 (LPL1、HPL1 和 MPL1) 的脂质组成数据进行数据降维分析, 可以更为直观的观察 LPL、MPL 和 HPL 这三种虾油差异度的大小。图 4-5 为这三种 AKO 的 PCA 得分图。

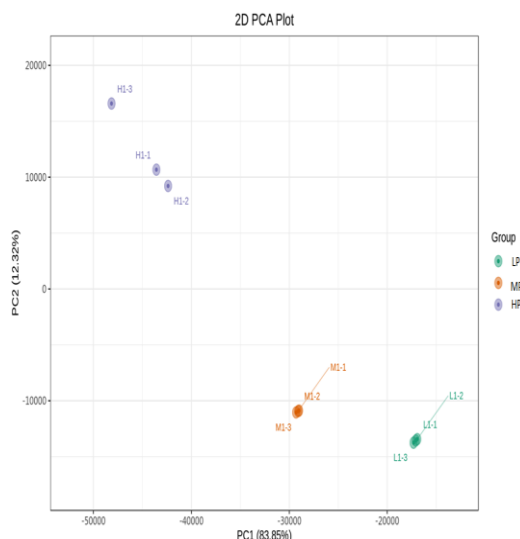


图 4-5 LPL、MPL、HPL 的 PCA 分析图

Figure 4-5 PCA analysis of LPL、MPL、HPL

图中样本点之间的距离表示了各样本数据之间的相似性差异大小。距离越近, 相似性越高。可以观察到, 同种 AKO 之间有明显聚集趋势; 而不同种 AKO, 即 LPL1、HPL1 和 MPL1 三种 AKO 之间则在 PCA 得分图中有明显的分离趋势, 组与组之间没有聚集现象。这说明三种 AKO 的脂质组成有着明显区别。此外, 第一主成分 (PC1) 和第二主成分 (PC2) 的累积贡献率达到 96.17%, 表明模型拟合度高, 多维统计分析结果可靠, 可进行进一步的分析。

(2) 正交偏最小二乘法判别分析

PCA 模型有时候不能敏锐感知到微小的变量, 不利于寻找差异代谢物, 可以建立正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 分析解决此问题。如图 4-6 所示, OPLS-DA 模型中, 三种 AKO 分离明显, 说明 OPLS-DA 可以有效区分 LPL1、HPL1 和 MPL1 这三种 AKO 样品, 且模型中得到的 VIP 得分值还可用于后续筛选不同种类 AKO 之间的显著差异脂质。

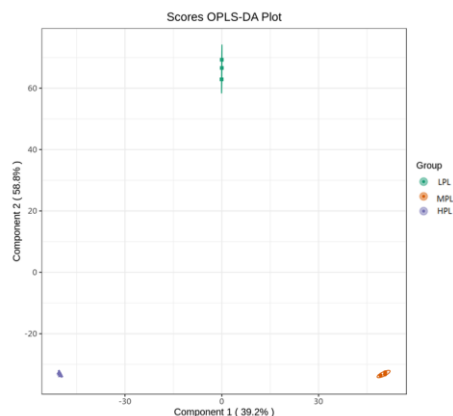


图 4-6 LPL1、MPL1、HPL1 的 OPLS-DA 分析图

Figure 4-6 OPLS-DA analysis of LPL1, MPL1, HPL1

4.4.3.3 三种未氧化 AKO 的显著差异脂质筛选

本实验采用单变量分析差异倍数 FC 和 T.test 统计检验, 得到 FC 值和 P 值 (P-Value), 结合 OPLS-DA 得到的 VIP 值, 筛选差异脂质。以 $VIP \geq 1$, $FC \geq 2$ 和 $FC \leq 0.5$, $P < 0.005$ 为阈值筛选差异脂质。火山图可以直观的展示差异脂质的整体分布情况, 可视化两组样品之间脂质分子表达水平的差异以及统计显著性^[90]。以代谢离子在比较组中的差异倍数 $\log_2$ (FC) 为横坐标, $-\log_{10}$ (P-value) 为纵坐标绘制图。其中, 火山图中的每个点代表一种脂质, 红色散点代表脂质分子显著上调的脂质, 绿色散点代表脂质分子显著下调的脂质, 灰色散点代表不存在显著差异的脂质。图 4-7 为 LPL1、MPL1 和 HPL1 三组之间两两比较得到的显著差异代谢物火山图。

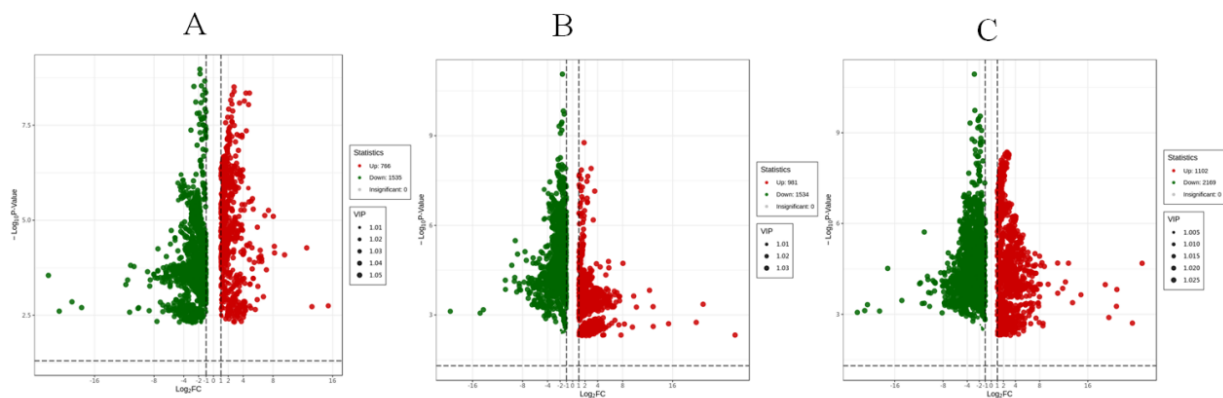


图 4-7 差异脂质代谢物火山图

Figure 4-7 Volcanic map of differential lipid metabolites

注: A, LPL1 vs MPL1 差异脂质代谢物火山图; B, MPL1 vs HPL1 差异脂质代谢物火山图; C, LPL1 vs HPL1 差异脂质代谢物火山图。

由图可知, LPL1 vs MPL1 组中共鉴定到的 2301 个差异脂质中, 包含 766 个上调脂质, 1535 个下调脂质。MPL1 vs HPL1 组中共鉴定到的 2515 个脂质中, 包含 981 个上调脂质, 1534 个下调脂质。LPL1 vs HPL1 组中共鉴定到的 3271 个差异脂质中, 包含 1102 个上调脂质, 2109 个下调脂质。

将火山图筛选出来的各比较组 (LPL1 vs MPL1、MPL1 vs HPL1 和 LPL1 vs HPL1) 之间的差异脂质, 进一步通过韦恩图筛选它们特有的差异脂质及共同差异脂质, 展示各组差异脂质之间的关系, 如图 4-8 所示。

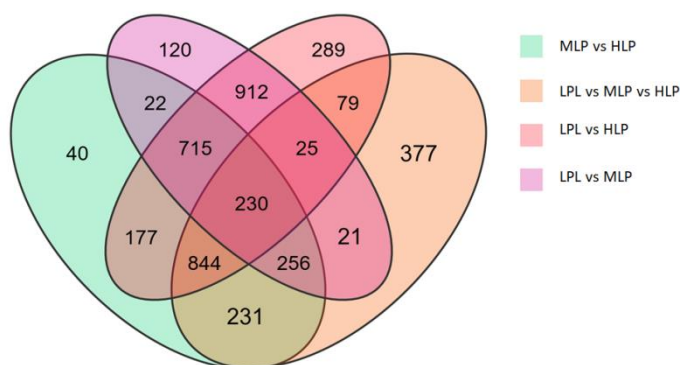


图 4-8 LPL1、MPL1、HPL1 差异代谢韦恩图

Figure 4-8 Venn plots of differentially metabolised lipids in LPL1, MPL1 and HPL1

LPL1 vs MPL1 和 LPL1 vs HPL1 两组的共同差异脂质有 912 个; LPL1 vs MPL1 和 HPL1 vs MPL1 两组的共同差异脂质有 22 个; LPL1 vs MPL1 和 LPL1 vs MPL1 vs HPL1 两组的共同差异脂质有 21 个; LPL1 vs HPL1 和 HPL1 vs MPL1 两组的共同差异脂质有 177 个; LPL1 vs MPL1、HPL1 vs MPL1、LPL1 vs HPL1 和 LPL1 vs MPL1 vs HPL1 四组的共同差异脂质有 230 个。这 230 个核心显著差异代谢脂质分子分别为 74 种 TG、39 种 PC、21 种 PE、15 种 DG、14 种 PS、12 种 CL、8 种 PG、7 种 Cer、6 种 PA、5 种 WE、3 种 Hex2Cer、3 种 PI、2 种 SM、2 种 ZyE、PIP3、ST、LPA、PE、GM3 各一种。这些每组间特殊的差异脂质以及共同的差异脂质分子可能在对于 LPL1、HPL1、MPL1 三种 AKO 的区分及氧化行为差异中可能起到重要作用。

将韦恩图筛选出来的 230 个共同差异脂质, 使用 OPLS-DA 模型中的 VIP 得分来筛选 LPL1、MPL1 和 HPL1 之间的显著差异脂质。因为 VIP 值表示此变量对模型的贡献率, 所

以当 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 时, 该脂质被认为存在显著差异。每种代谢物的 VIP 值不同代表对模型的贡献率不同, VIP 值越大的代表该脂质对模型的贡献率越大, 可将其作为比较组中的显著差异脂质。由于符合条件的脂质数量过多, 将 VIP 值最高的前十种脂质分子视为这三种 AKO 之间的显著差异脂质分子, 采用 VIP 得分图 4-9 展示。

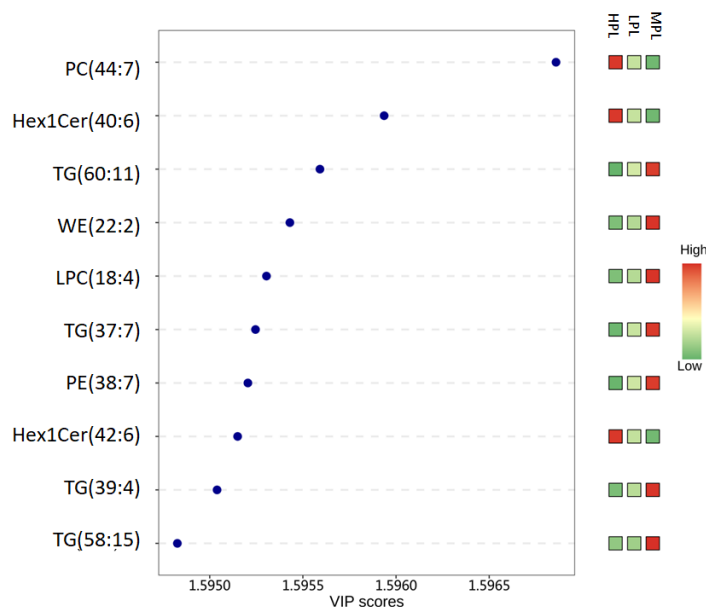


图 4-9 显著差异脂质筛选结果

Figure 4-9 Screening results of significantly different lipids

由图可知, 这十种显著差异脂质分别为 PC(44:7)|PC(22:1-22:6)、Hex1Cer(40:6)|Hex1Cer(18:0-22:6)、TG(60:11)|TG(16:1-22:5-22:5)、WE(22:2)|WE(2:0-20:2)、LPC(18:4)|LPC(18:4)、TG(37:3)|TG(20:0-6:0-11:3)、PE(38:7)|PE(16:1-22:6)、Hex1Cer(42:6)|Hex1Cer(20:0-22:6)、TG(39:4)|TG(6:0-11:4-22:0)和 TG(58:15)|TG(22:6-14:3-22:6)。其中 PC (44:7) |PC(22:1-22:6) 的 VIP 得分值最高, 说明这种脂质作为区别这三种 LPL1、MPL1 和 HPL1 这三种 AKO 的显著差异脂质, 其有着较强的贡献度和解释能力。同时 VIP 得分图右部的热图显示, 这种 PL 分子在 HPL1 中的表达量相对于 LPL1 和 MPL1 而言呈上调的趋势。其余脂质分子中有四种 TG 分子, 分别为 TG(60:11)|TG(16:1e-22:5-22:5)、TG(37:3)|TG(20:0-6:0-11:3)、TG(39:4)|TG(6:0-11:4-22:0)和 TG(58:15)|TG(22:6-14:3-22:6), 它们的表达量均在 MPL1 中与其他两组 AKO 比起来有着相对上调的趋势。

将 VIP 得分图中筛选出来的十种显著差异脂质的 FC 值进行进一步的分析。两两比较三种 AKO 中显著差异脂质的 FC 值差异, 取 FC 值的对数绘制 FC 直方图, 直观的比较这

十种显著差异脂质在两两对比组之间的变化趋势，如图 4-10 所示。

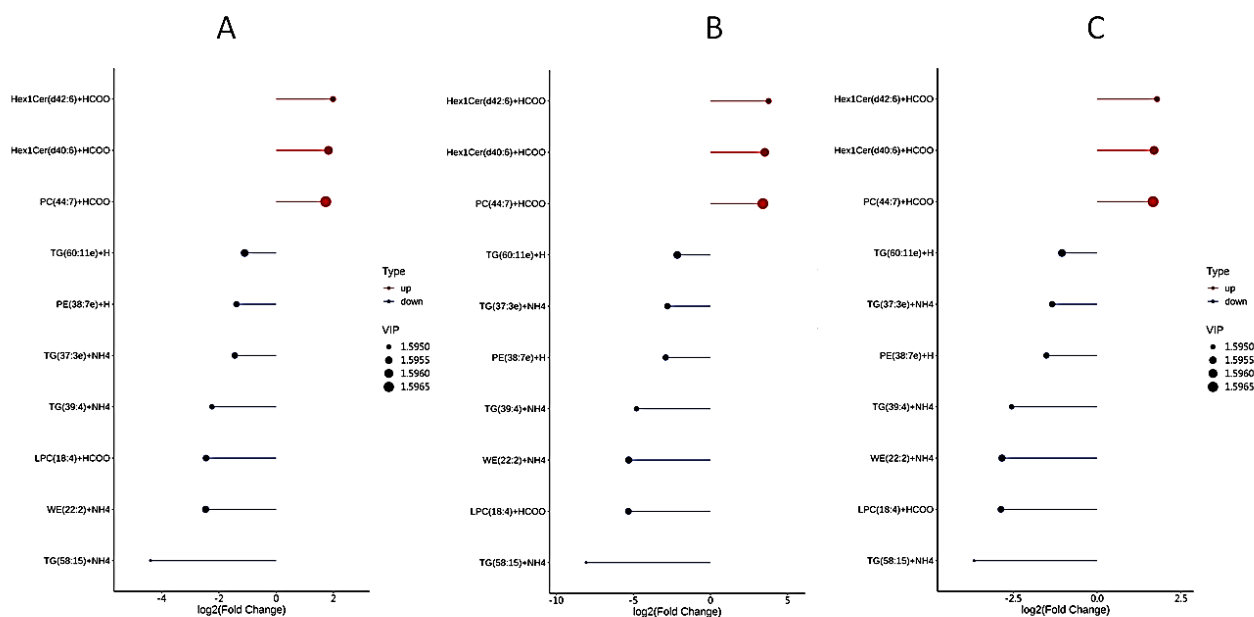


图 4-10 倍数变化直方图

Figure 4-10 Fold-change histogram

注：（A）LPL1 和 MPL1 间倍数变化直方图（B）HPL1 和 MPL1 间倍数变化直方图（C）HPL1 和 LPL1 间倍数变化直方图

结果显示，与 MPL1 相比，Hex1Cer(40:6)|Hex1Cer(18:0-22:6)、Hex1Cer(42:6)|Hex1Cer(20:0-22:6)和 PC(44:7)|PC(22:1-22:6)在 LPL 和 HPL 中都呈现上调变化，且在 HPL1 和 LPL1 两组间，这三种脂质在 HP1L 中相对于 LPL1 又呈现上调变化。其余七种显著差异脂质在 MPL1 和 HPL1 中都相对于 LPL 呈现上调变化，且在 HPL1 和 MPL1 两组间，这七种脂质在 HPL1 中与 MPL1 相比又呈上调变化，这一结果可与 VIP 得分图右部的热图结果相对应。此外，在这十种显著差异脂质中，TG(58:15)|TG(22:6-14:3-22:6)在三个对比组中的相对变化均较大，且在 MPL1 中的表达量最大。这些显著差异脂质含量的变化可能对三种 AKO 的品质和特征产生影响，从而可以作为区分不同脂质组成 AKO 的特征性代谢物。

4.4.4 低、中、高含量的三种 AKO 氧化 24 d 后的脂质组成差异

4.4.4.1 三种氧化 AKO 中各亚类脂质含量占比

分别计算 LPL、MPL、HPL 三种磷虾油在氧化 24 d 后（分别编号为 LPL5、MPL5、HPL5），其中各脂质亚类的含量及比例，明确了三种磷虾油中各亚类脂质占总脂质含量的

氧化 24 d 后各组之间仍表现出明显的分离聚集趋势，说明三种 AKO 具有很大差别，PCA 可以较好地处理三种样品之间的差异并做到有效分离。OPLS-DA 分析得到的 VIP 值可用于后续显著差异脂质的筛选。

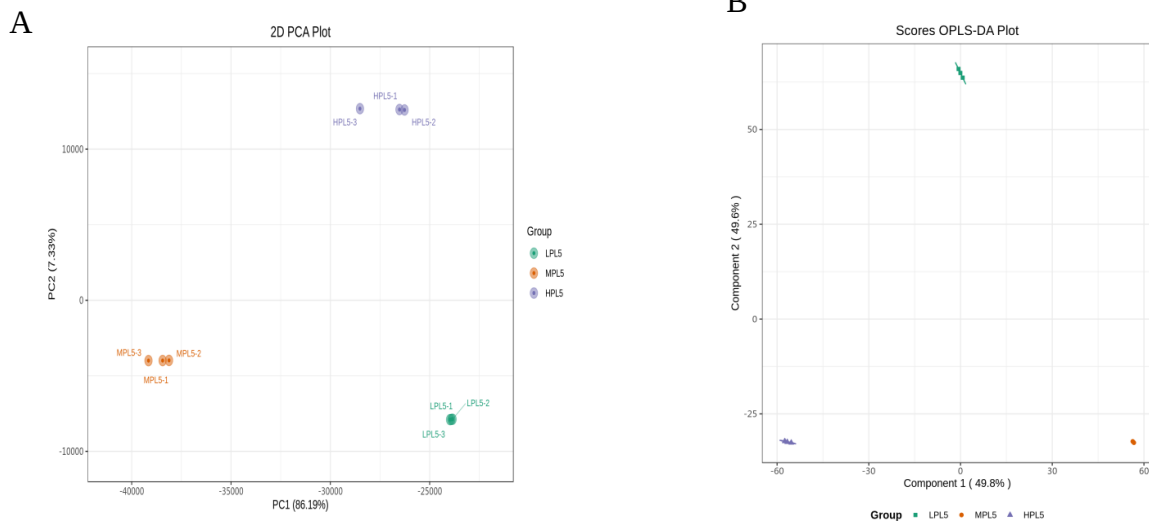


图 4-12 (A)PCA 得分图 (B) OPLS-DA 得分图

Figure 4-12 (A)PCA score plot (B)OPCA-DA score plot

4.4.4.3 三种氧化 AKO 的显著差异脂质筛选

采用与 4.4.3.3 相同的分析方法筛选 LPL5、MPL5、HPL5 氧化 24 d 后三种油的显著差异脂质。省略推导过程。图 4-13 为 VIP 值最高的前十种显著差异脂质分子的 VIP 得分图。

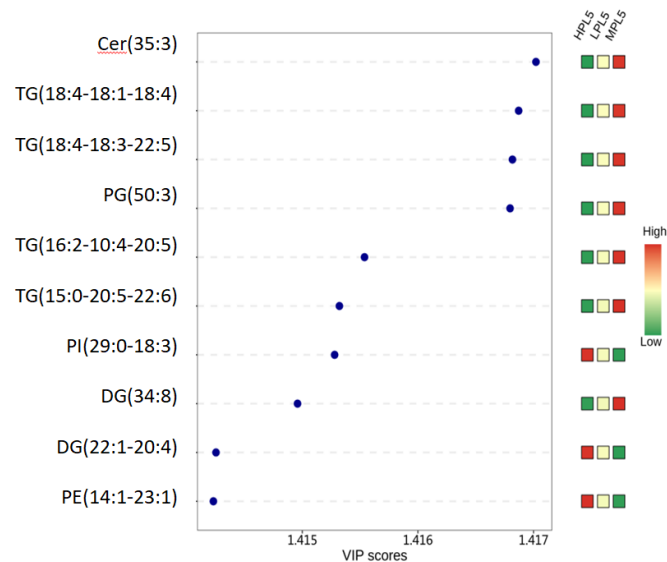


图 4-13 显著差异脂质筛选结果

Figure 4-13 Screening results of significantly different lipids

由图可知,这十种显著差异脂质包括:1种 Cer,6种 GLs和3种 GPs。具体为: Cer(35:3)、TG(54:9)|TG(18:4-18:1-18:4)、TG(58:12)|TG(18:4-18:3-22:5)、PG(50:3)、TG(46:11)|TG(16:2-10:4-20:5)、TG(59:11)|TG(15:0-20:5-22:6)、PI(47:3)|PI(29:0-8:3)、DG(34:8)、DG(42:5)|DG(22:1-20:4)、PE(37:2)|PE(14:1e-23:1)。其中, Cer(35:3)的 VIP 值最高,说明这种脂质作为区别这三种 LPL5、MPL5 和 HPL5 这三种 AKO 的显著差异脂质,其有着较强的贡献度和解释能力,从右侧的热图可以看出 Cer 在 MPL5 中的表达量较高。有研究指出, Cer 是一种神经酰胺,其与细胞的分化、增殖、凋亡及衰老等生命活动息息相关^[91]。

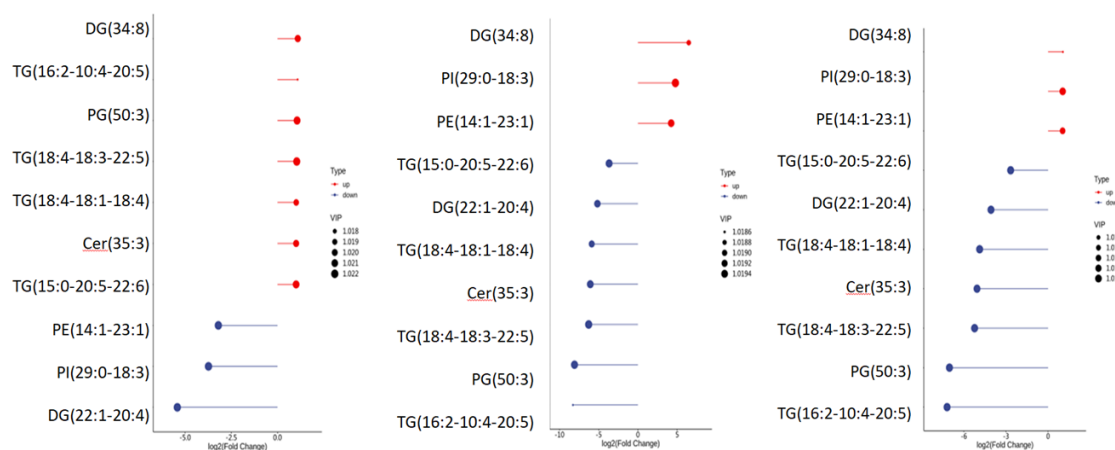


图 4-14 (A) LPL5 和 MPL5 间变化的差异倍数直方图 (B) LPL5 和 HPL5 间变化的差异倍数直方图 (C) MPL5 和 HPL5 间变化的差异倍数直方图

Figure 4-14 (A) Fold-change histogram between LPL5 and MPL5 (B) Fold-change histogram between LPL5 and HPL5 (C) Fold-change histogram between MPL5 and HPL5

通过直方图 4-14 可以观察到这 10 种显著差异脂质在三个对比组中的上下调情况。由图可知,与 LPL5 相比, HPL5 中有 3 个显著差异脂质成上调趋势, 7 个脂质成下调趋势, 其中变化最大的为 TG(46:11)|TG(16:2-10:4-20:5), 表现为下调。这种脂质中含有一分子的二十二碳五烯酸, 是一种 PUFA, 极易被氧化。由于 PUFA 结合到 TG 上比结合到 PL 上易受到氧化, 因此这类脂质会表现出下调趋势。与 LPL5 相比, MPL5 组有 7 中显著差异脂质成上调趋势, 3 个显著差异脂质成下调趋势, 其中变化最大的 DG (42:5) |DG (22:1-20:4), 表现为下调。与 MPL5 相比, HPL5 有 3 个显著差异脂质成上调趋势, 7 个成下调趋势, 其中变化最大的是 DG (42:5) |DG (22:1-20:4), 表现为上调。说明 DG (42:5) |DG (22:1-20:4)

这一脂质在三种油中的差异较大，且在 LPL5 和 HPL5 中的表达量高于 MPL5。

4.4.5 加速储藏过程对低、中、高磷脂含量的三种 AKO 脂质代谢的影响

4.4.5.1 三种 AKO 在加速氧化过程中各亚类脂质含量的变化

为比较加速氧化过程三种 AKO 各亚类脂质含量的变化差异，采用热图 4-15 展示了各亚类脂质在加速储藏后的含量变化^[92]。

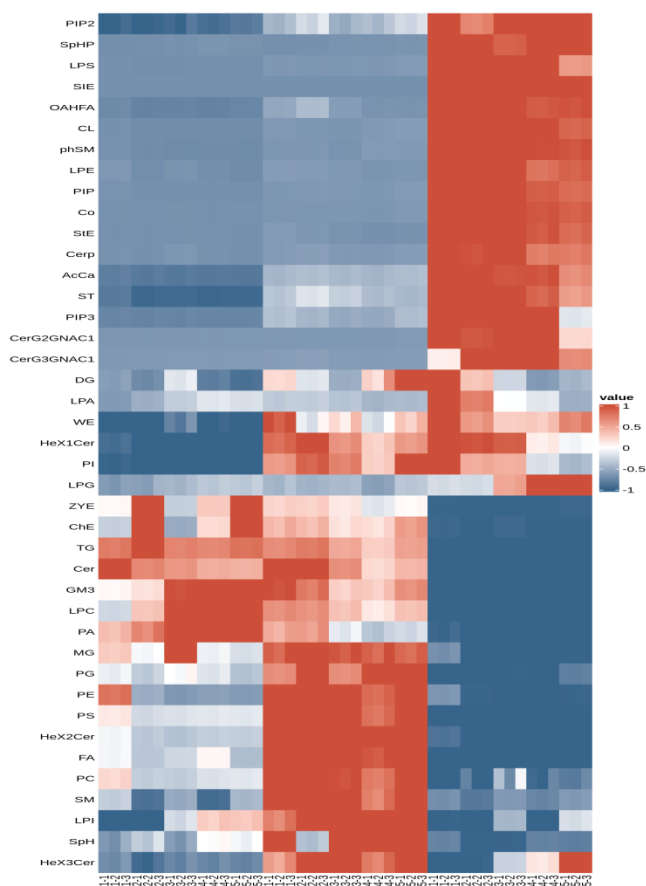


图 4-15 三种 AKO 储藏期间各亚类脂质含量变化热图

Figure 4-15 Heat map of changes in lipid content of each subclass during storage of the three AKOs

注：L1~L5 分别为 LPL 氧化 0 d、氧化 6 d、氧化 12 d、氧化 18 d、氧化 24 d；

M1~M5 分别为 MPL 氧化 0 d、氧化 6 d、氧化 12 d、氧化 18 d、氧化 24 d；

H1~H5 分别为 HPL 氧化 0 d、氧化 6 d、氧化 12 d、氧化 18 d、氧化 24 d

结果可见，不同脂质组成的 AKO（LPL、MPL、HPL）在氧化 24 d 的过程中，亚类脂质的趋势聚类较明显。说明这三种 AKO 氧化以及未氧化的脂质组成都有着显著区别。在 LPL 中，TG、Cer 的含量相对较高，在氧化 12 天后生成了较多的 GM3、LPC、PA、MG，其中 MG 含量在继续氧化过程中被消耗下降。在 MPL 中，MG、PG、PE、PS、PC、FA、

SM、LPI、SpH、HEX3Cer 的含量相对较高,可见 PL 在 MPL 中占比较高。在 HPL 中, LPA、LPG、LPE、LPS、CL、PIP、SpHp、SIE、OAHFA、Co、Cer、Acca 的含量相对较高,可见 HPL 中亚类脂质的种类较多且含有较多的溶血磷脂。在加速氧化 24d 过程中, PL 系列的脂质呈现下降趋势,溶血磷脂呈现上升趋势,这是由于溶血磷脂为 PL 氧化分解生成。甘油酯呈现先上升后下降的趋势,是由于 PL 失去一个极性头基产生,而后又被氧化分解。FA 在氧化中期突然的上升可能是由于其他脂质氧化分解产生 FFA 的缘故。

4.4.5.2 三种 AKO 在加速氧化过程中脂质变化多元统计分析

(1) 加速氧化过程 PCA 分析

为了探究不同脂质组成 AKO 氧化过程中脂质变化的差异,对 LPL、MPL 和 HPL 氧化第 0 d、6 d、12 d、18 d 和 24 d 的脂质组成分别进行 PCA 主成分分析,将数据可视化。图 4-16 为 LPL、MPL、HPL 三种 AKO 各氧化 5 个阶段的 PCA 得分图。

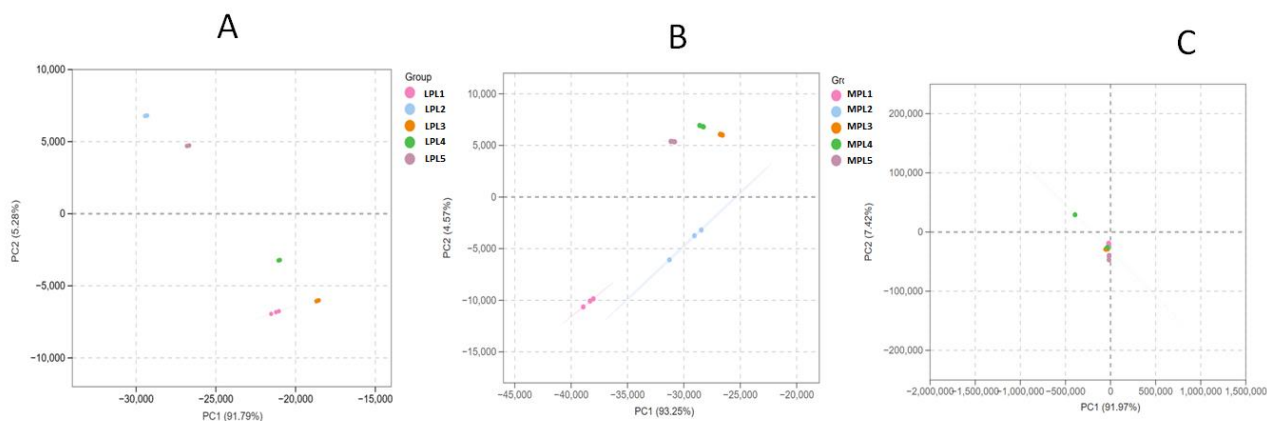


图 4-16 PCA 得分图

Figure 4-16 PCA score plot

注：(A) LPL 氧化不同阶段的 PCA 得分图 (B) MPL 氧化不同阶段的 PCA 得分图 (C) HPL 氧化不同阶段的 PCA 得分图

如图所示,各组样品的平行组之间距离较近且部分平行组几乎聚集在一个点,说明实验数据重复性较好。此外,LPL 和 MPL 中氧化不同阶段的脂质分离较明显,而 HPL 氧化不同阶段的脂质则离得较近不能很好的区分。这说明该分析方法可以有效的分离 LPL 和 MPL 不同氧化阶段的脂质样品,而对于 HPL 而言,还需要更进一步的分析,来使得 HPL 不同氧化阶段的脂质能获得更有效分离。

(2) 加速氧化过程 OPLS-DA 分析

为了进一步阐述未氧化 AKO 和氧化 AKO 之间的差异性,筛选差异性脂质,建立了

OPLS-DA 模型，滤除与分类信息无关的噪音，提高了模型的解析能力和有效性，如图 4-17 所示。

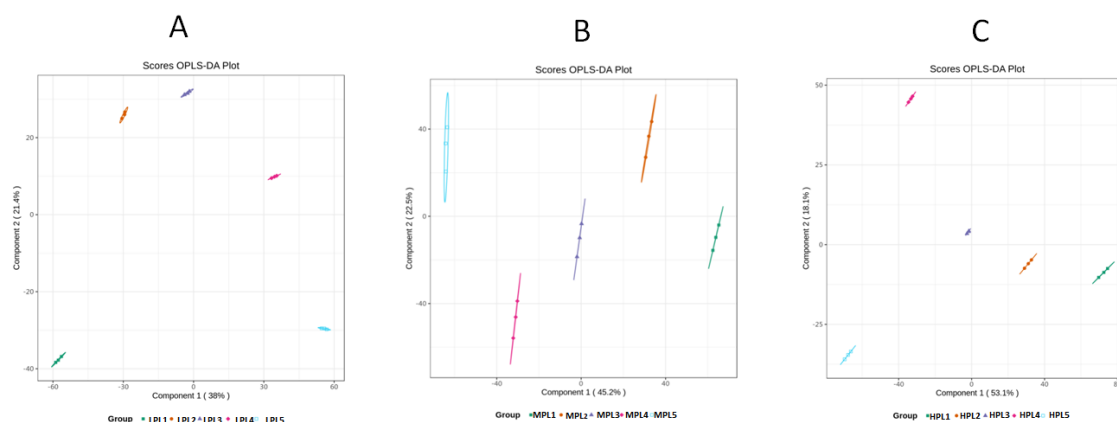


图 4-17 OPLS-DA 得分图

Figure 4-17 OPLS-DA score plot

注：(A) LPL 氧化不同阶段的 OPLS-DA 得分图 (B) MPL 氧化不同阶段的 OPLS-DA 得分图 (C) HPL 氧化不同阶段的 OPLS-DA 得分图

由图可知，三种 AKO 氧化不同阶段的样品组之间相对距离较大差异明显。尤其对于 HPL 而言，从图 (C) 中可以发现，与 HLP 的 PCA 分析结果相比，OPLS-DA 可以更有效地处理数据中的差异，获得更理想的分离效果，这与它们各自的算法有关。此外，LPL 组和 HPL 组的平行组基本聚集在同一点，虽然 MPL 组 (图 B) 的平行组在 component 2 上的距离较大，但在 component 1 上的分布也基本属于同一位置，说明样本组内的相关性和重复性较好，可进行下一步的分析。

4.4.5.3 三种 AKO 在加速氧化过程中的显著差异脂质筛选

本实验通过单变量统计分析包括差异倍数分析得到差异倍数 FC 值和 T.test 统计检验得到 P 值，结合多变量统计分析 OPLS-DA 得到的 VIP 值，筛选差异脂质。满足 $VIP > 1$, $FC > 2$, $P \text{ value} < 0.05$ 或者 $VIP > 1$, $FC < 0.5$, $P \text{ value} < 0.05$ 的脂质分子即可视为差异脂质。采用韦恩图将这些差异脂质可视化，图 4-18 为三种 AKO 氧化过程中显著差异脂质韦恩图。

韦恩图中每个圈代表一个比较组，圈和圈重叠部分的数字代表比较组之间共有的差异脂质个数，没有重叠部分的数字代表比较组特有差异脂质个数。加工过程中，各个阶段既有与其它阶段相同的差异脂质，也有各自独特的差异脂质。由图可知，LPL 氧化 0 d~6 d 的特有脂质有 119 个，6 d~12 d 特有脂质有 57 个，12 d~18 d 特有脂质 88 个，18 d~24 d 特有

脂质 73 个。共同显著差异脂质分子一共有 33 个,其中包括 1 种 Cer、4 种 CL、2 种 Hex1Cer、1 种 LPA、1 种 LPE、2 种 PA、7 种 PC、9 种 PE、1 种 phSM、2 种 PI、1 种 PS、1 种 TG 和 1 种 ZyE。

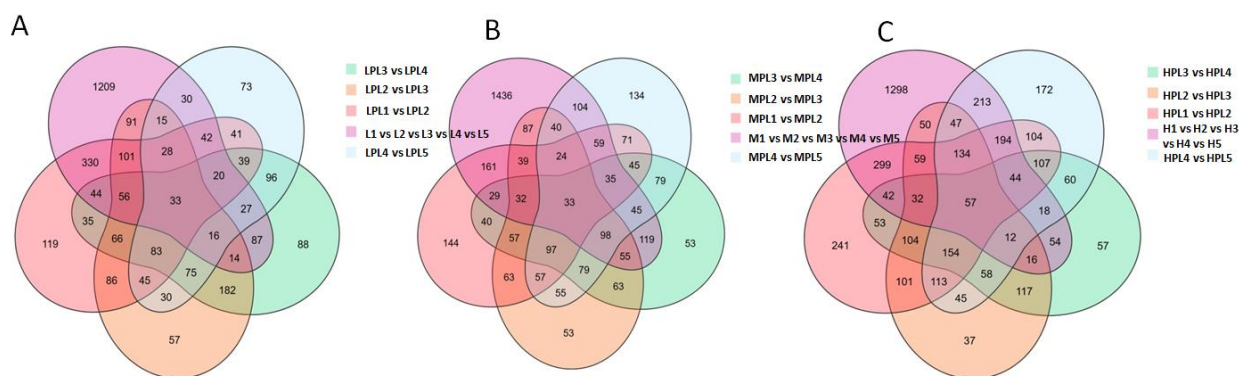


图 4-18 三种 AKO 氧化过程中显著差异脂质韦恩图

Figure 4-18 Venn diagram of differential lipid metabolites

注: (A) LPL 氧化不同阶段韦恩图 (B) MPL 氧化不同阶段韦恩图 (C) HPL 氧化不同阶段韦恩图。

MPL 氧化 0 d~6 d 的特有脂质有 144 个, 6 d~12 d 特有脂质有 53 个, 12 d~18 d 特有脂质 53 个, 18 d~24 d 特有脂质 134 个。共同显著差异脂质分子一共有 33 个, 其中包括 5 种 CL、5 种 DG、1 种 Hex1Cer、1 种 Hex2Cer、1 种 LPC、2 种 LPE、1 种 LPI、1 种 OAHFA、4 种 PA、4 种 PC、1 种 PE、1 种 PG 和 6 种 TG。

HPL 氧化 0 d~6 d 的特有脂质有 241 个, 6 d~12 d 特有脂质有 37 个, 12 d~18 d 特有脂质 57 个, 18 d~24 d 特有脂质 172 个。共同显著差异脂质分子一共有 57 个, 其中包括 1 种 ChE、2 种 CL、3 种 DG、1 种 Hex1Cer、1 种 Hex3Cer、1 种 LPC、13 种 PC、14 种 PE、4 种 PG、2 种 PI、1 种 PS、1 种 SM 和 13 种 TG。总体而言, 这三种 AKO 氧化不同阶段的四个组之间存在的大量特有脂质, 说明氧化过程中的脂质类别存在明显的区别, AKO 氧化过程具有很大的多样性和复杂性。

利用火山图可对三种 AKO 氧化过程中满足条件的差异性脂质进行筛选, 并直观的展示氧化不同阶段所有差异脂质的整体上下调情况。FC 值为氧化相邻的两个阶段两两比较计算所得, $FC > 2$ 的脂质表现为上调, $FC < 0.5$ 的脂质表现为下调。火山图中红色散点代表上调的脂质, 绿色散点代表下调的脂质, 灰色散点代表不存在显著差异的脂质。图 4-19 为 LPL、MPL 和 HPL 三种 AKO 氧化 24 d 过程中, 第 0 d、第 6 d、第 12 d、第 18 d、第 24 d 这五

个氧化阶段的脂质变化火山图。

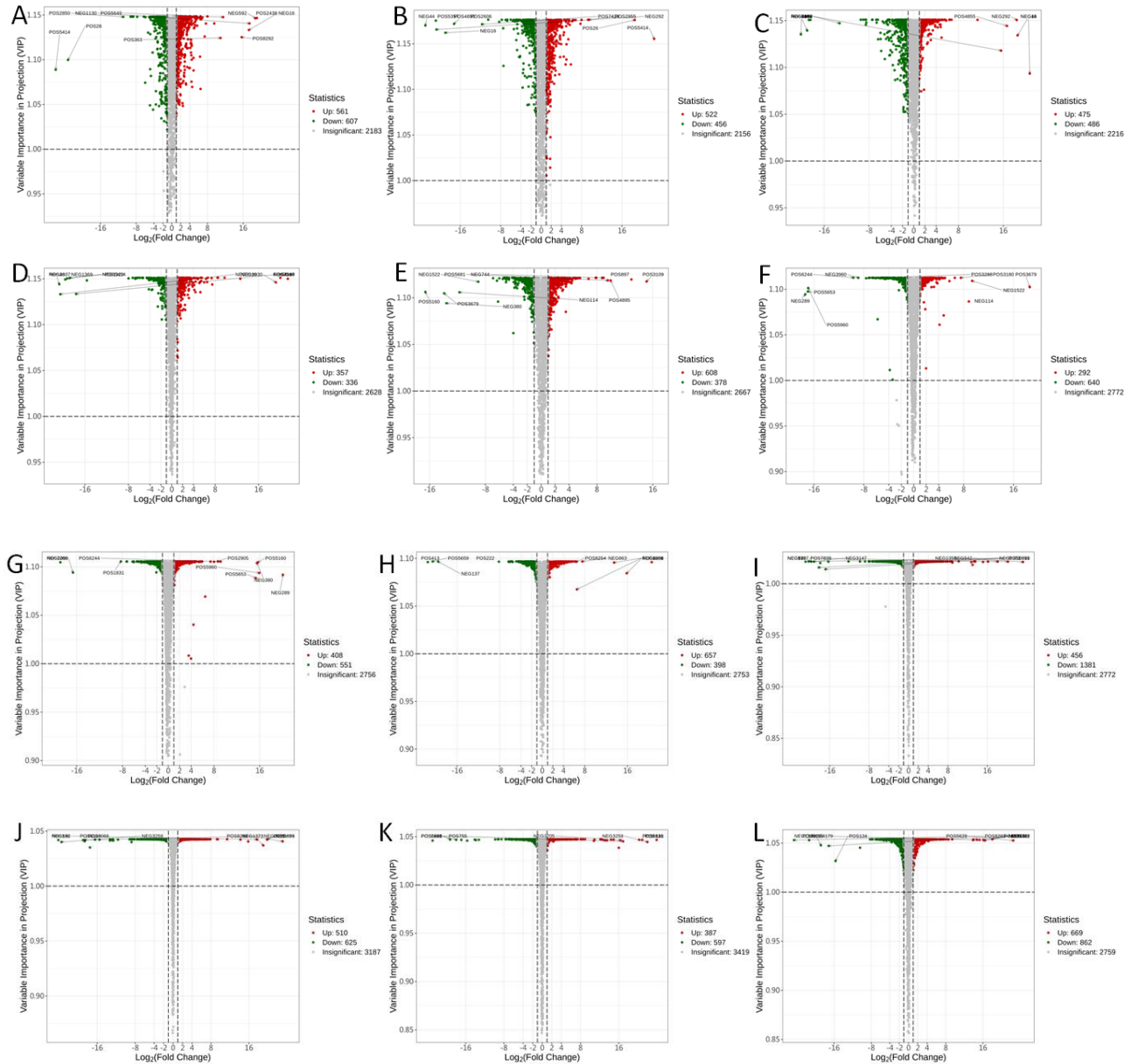


图 4-19 LPL、MPL 和 HPL 三种 AKO 氧化 24 d 脂质变化火山图

Figure 4-19 Differential lipid metabolite volcano plots

注：图 A~图 D 分别为 LPL 氧化 0 d vs 6 d、6 d vs 12 d、12 d vs 18 d、18 d vs 24 d 四个比较组的脂质变化火山图；图 E~图 H 分别为 MPL 氧化 0 d vs 6 d、6 d vs 12 d、12 d vs 18 d、18 d vs 24 d 四个比较组的脂质变化火山图；图 I~图 L 分别为 HPL 氧化 0 d vs 6 d、6 d vs 12 d、12 d vs 18 d、18 d vs 24 d 四个比较组的脂质变化火山图。

由火山图可知不同氧化阶段的显著差异脂质的变化情况，将筛选出的显著差异脂质及其变化情况通过表 4-1 汇总。

表 4-1 三种 AKO 加速氧化期间差异代谢物数量统计表

Table 4-1 Summary of the number of differential metabolites during accelerated oxidation of the three AKOs

AKO 种类	差异脂质分组	总差异脂质数量	下调数量	上调数量
LPL	6d vs 0d	1168	607	561
	12d vs 6d	978	456	522
	18d vs 12d	961	486	475
	24d vs 18d	693	336	357
MPL	6d vs 0d	986	378	608
	12d vs 6d	932	640	292
	18d vs 12d	959	551	408
	24d vs 18d	1055	398	657
HPL	6d vs 0d	1837	1381	456
	12d vs 6d	1135	625	510
	18d vs 12d	984	597	387
	24d vs 18d	1531	862	669

结合图 4-19 和表 4-1 对比可以看出, 不同脂质组成的 AKO 的氧化过程具有较大的多样性和复杂性。在同种样品中, LPL 加速氧化前 6 d 过程中脂类物质的变化更为剧烈; MPL 加速氧化最后一个阶段(第 18 d~第 24 d)过程中, 脂类物质的变化对比前期更为剧烈; 在 HPL 氧化过程中, 前 6d 和最后 6d 的脂质变化较为剧烈。对比不同种 AKO 样品的氧化过程可知, HPL 在氧化 24d 全过程中, 其中的脂质分子的变化比 LPL 和 MPL 都要剧烈。

由于显著差异脂质较多, 为了进一步筛选关键显著差异脂质, 将三种 AKO 氧化过程中的四个比较组中的显著差异脂质进行归纳整理, 筛选出每一氧化阶段变化最显著的前 10 种脂质, 如表 4-2 所示。

表 4-2 LPL、MPL、HPL 氧化过程种不同阶段显著差异代谢脂质信息

Table 4-2 Significantly different metabolic lipid information at different stages in the oxidation of three AKOs

样品组	氧化阶段	显著差异脂质	VIP	Log ₂ FC	趋势
LPL	0 d~6 d	DG(18:1/24:1)	1.146655	19.06659	↑
		Cer(36:3)	1.146437	18.7183	↑
		LPA(16:1)	1.140633	17.41049	↑
		CL(17:0/15:0/16:0/16:0)	1.133296	17.29133	↑
		TG(27:1/12:4/22:5)	1.125228	15.66312	↑
		TG(12:1/6:0/14:2)	1.147665	11.50694	↑
		DG(16:0/14:0)	1.124331	10.92856	↑
		LPE(20:4)	1.147898	-10.8698	↓
		CL(75:2)	1.099791	-23.2474	↓
		PS(10:1/10:2)	1.08888	-26.0099	↓
	6 d~12 d	PS(10:1/10:2)	1.15537	22.36503	↑
		CL(75:2)	1.176125	18.52584	↑
		PC(8:0/6:0)	1.176359	9.475436	↑
		LPC(14:0)	1.176363	9.298427	↑
		TG(53:15)	1.171386	-11.6966	↓
		PE(20:3/16:0)	1.171836	-17.243	↓
		CL(17:0/15:0/16:0/16:0)	1.162099	-18.9546	↓
		CL(22:6/20:0/18:1/22:5)	1.165626	-20.7205	↓
		PI(16:0/18:1)	1.175386	-20.8465	↓
		CL(68:8)	1.170078	-22.9206	↓
	12 d~18 d	CL(68:8)	1.093472	20.72714	↑
		CL(17:0/15:0/16:0/16:0)	1.134283	18.54663	↑
		CL(22:6/20:0/18:1/22:5)	1.150659	18.3996	↑
		PE(20:3/16:0)	1.144345	16.65449	↑
		PI(16:0/18:1)	1.117972	15.60792	↑
		PE(18:1/18:1)	1.147196	-13.2505	↓
		PI(20:2/20:5)	1.150833	-18.4462	↓
		PIP(56:4)	1.150765	-18.7247	↓
		PS(43:5)	1.139441	-19.036	↓
		TG(16:0/13:0/22:5)	1.135268	-20.1487	↓
	18 d~24 d	PIP(56:4)	1.149981	21.38248	↑
		TG(16:0/13:0/22:5)	1.151109	20.00788	↑
		PI(20:2/20:5)	1.14612	19.17697	↑
		PE(18:1/18:1)	1.150045	12.6291	↑
		CL(17:0/15:0/16:0/16:0)	1.133438	-17.6212	↓
		LPE(18:2)	1.150965	-18.7763	↓

MPL	0 d~6 d	PS(10:1/10:2)	1.150353	-19.2872	↓
		PIP(36:1/16:0)	1.149258	-19.6295	↓
		PC(14:022:4)	1.13318	-20.5405	↓
		CL(75:2)	1.144096	-20.7275	↓
	6 d~12d	PC(17:0/8:0)	1.117447	15.1212	↑
		DG(22:5/11:2)	1.119634	12.94323	↑
		PE(16:0/20:5)	1.118578	9.958218	↑
		TG(16:0/6:0/12:3)	1.118675	9.555383	↑
		FA(22:6)	1.121449	8.952369	↑
		PA(37:5)	1.117207	-9.01444	↓
		CL(73:7)	1.105867	-11.7192	↓
		CL(89:19)	1.094179	-13.5799	↓
		PC(34:5)	1.10476	-13.9086	↓
		PG(16:1/16:1)	1.106217	-16.6081	↓
	12 d~18d	PC(34:5)	1.10238	18.59484	↑
		PA(37:5)	1.109228	9.358389	↑
		CL(73:7)	1.086612	8.836109	↑
		PC(28:1)	1.112572	7.551672	↑
		PC(32:0)	1.112089	-7.63695	↓
		PI(29:1/18:1)	1.112584	-8.88125	↓
		TG(12:1/10:0/22:6)	1.112647	-9.67866	↓
		TG(12:0/10:3/18:0)	1.10134	-16.9097	↓
		TG(6:0/12:1/14:3)	1.097486	-16.9606	↓
		CL(21:0/22:3/16:0/22:6)	1.094368	-17.382	↓
	18d~24 d	CL(21:0/22:3/16:0/22:6)	1.091818	20.04768	↑
		TG(12:0/10:3/18:0)	1.093696	15.92367	↑
		PG(16:1/16:1)	1.104593	15.68072	↑
		CL(89:19)	1.10387	15.52049	↑
		TG(6:0/12:1/14:3)	1.08838	15.31273	↑
		TG(12:1/10:0/22:6)	1.105358	9.176349	↑
		MG(20:4)	1.10554	8.664771	↑
		DG(18:0/20:5)	1.105544	-8.26517	↓
		DG(40:3)	1.094058	-16.6409	↓
		Hex3Cer(16:2/22:6)	1.104652	-18.8425	↓
	18d~24 d	Hex3Cer(16:2/22:6)	1.096119	20.57926	↑
		DG(40:3)	1.084453	15.8752	↑
		TG(20:5/17:1/20:5)	1.095693	13.49055	↑
		Hex1Cer(24:0/20:5)	1.096885	7.532104	↑
		PE(24:1/22:6)	1.067605	6.517789	↑
		DG(25:5)	1.096652	-8.14672	↓
		CL(18:3/18:1/16:0/22:6)	1.096746	-19.5649	↓
		TG(12:1/6:0/14:3)	1.096845	-20.5842	↓

		DG(12:0/18:2)	1.096196	-21.5038	↓
		Cer(42:2)	1.021129	23.23151	↑
		LPI(16:0)	1.021427	20.18898	↑
		LPI(18:1)	1.021477	18.10497	↑
		TG(10:0/10:2/20:5)	1.021455	16.14115	↑
		TG(18:4/18:1/20:5)	1.020179	-17.9046	↓
	0 d~6 d	OAHA(22:6/16:0)	1.015789	-18.1961	↓
		PE(16:1/14:0)	1.021458	-19.2162	↓
		Cer(36:3+2O)	1.021511	-19.7431	↓
		TG(20:5/10:3/12:4)	1.0216	-20.2788	↓
		Hex1Cer(38:6)	1.0214	-20.8887	↓
		TG(19:0/20:5/22:6)	1.040772	23.1145	↑
		TG(20:5/10:3/12:4)	1.042567	19.85073	↑
		Hex1Cer(38:6)	1.042328	19.82658	↑
		OAHA(22:6/16:0)	1.03704	19.02366	↑
		Cer(16:2/25:2)	1.035183	-17.5195	↓
	6 d~12 d	TG(20:3/10:3/11:3)	1.040859	-18.6284	↓
		PG(32:3)	1.041877	-18.6814	↓
		TG(42:7)	1.041975	-18.9509	↓
		PE(15:0/20:4)	1.040162	-23.5375	↓
		Cer(32:0)	1.041963	-24.1858	↓
		Cer(32:0)	1.046704	23.90456	↑
		PE(15:0/20:4)	1.044567	21.96053	↑
		TG(4:0/11:4/23:0)	1.046828	20.88494	↑
		TG(42:7)	1.046807	20.24715	↑
HPL	12 d~18 d	TG(20:3/10:3/11:3)	1.045227	16.8905	↑
		PG(32:3)	1.0464	16.34343	↑
		TG(8:0/10:4/20:5)	1.046825	-17.9539	↓
		TG(12:0e/10:3/22:6)	1.047083	-19.2229	↓
		TG(4:0/10:3/16:0)	1.045992	-22.8969	↓
		TG(4:0/10:3/16:0)	1.052619	22.50688	↑
		SM(20:1/24:2)	1.053903	17.99679	↑
		CL(18:4/22:6/22:6/22:6)	1.052698	16.35397	↑
		DG(18:4/14:0)	1.053301	16.05334	↑
		TG(8:0/10:4/20:5)	1.053258	15.26751	↑
	18 d~24 d	Cer(17:0/18:2)	1.031826	-15.6644	↓
		LPE(18:1)	1.047147	-17.1465	↓
		LPE(20:4)	1.04778	-18.8073	↓
		PS(40:7)	1.052971	-21.3377	↓
		TG(19:0/20:5/22:6)	1.053051	-24.5805	↓

由表可知，纵观三种 AKO 的氧化过程，GP 型的显著差异脂质数量最多，其次为 GL

型。在 LPL 的 24 d 氧化过程中, 变化较大的显著差异脂质大多为 GL 和 GP。且在氧化初期 (前 6 d), GL 型的脂质变化较为显著, 6 种显著上调的脂质中由 4 种都为 GP, 其中包括两种 TG 和两种 DG, 大多都是不饱和脂肪酸。这是由于 LPL 本就含有较高浓度的中性脂质, 中性脂质结合不饱和脂肪酸使其更易被氧化。在 MPL 的 24 d 氧化过程中, 变化较大的显著差异脂质大多也为 GL 和 GP。在氧化初期, MPL 中的一种 FA 型 DHA (22:6) 表现出显著上调趋势, 同时 PA(37:5)、CL(73:7)、CL(89:19)、PC(34:5)、PG(16:1-16:1) 表现显著下调趋势。这表明随着加工的进行, 脂肪组织中的 PL 在一系列脂肪酶的作用下被分解生成极性头基和脂肪酸, 导致不饱和脂肪酸大量升高。在 MPL 氧化后期时, 有两种 SP 型脂质发生显著上调现象 Hex3Cer(16:2-22:6) 和 Hex1Cer(24:0-20:5)。与 LPL 和 MPL 比起来, HPL 氧化 24d 过程中的显著差异脂质的种类较多。除了 GP 和 GP 外, 还含有较多的 SP 类, 如 Cer(42:2)、OAHFA(22:6-16:0)-H、Hex1Cer(38:6)、Cer(16:2-25:2)、SM(20:1-24:2) 等。表中筛选出的这些显著差异脂质可用于区别不同脂质组成 AKO 氧化过程中的潜在氧化标记物。

4.5 本章小结

采用 UPLC-QTOF-MS 对加速贮藏 24 d 期间 AKO 进行了非靶向脂质组学分析, 鉴定了 41 种脂质亚类以及 4812 种脂质分子。

(1) 筛选不同脂质组成 AKO 以及相同脂质组成 AKO 在不同氧化阶段的显著差异脂质。氧化第 0 d 和氧化第 24 d 的三种 AKO 分别筛选出了 VIP 值排前 10 的显著差异脂质, 其中氧化第 0 d 时 VIP 值最大的脂质分子 PC(44:7)|PC(22:1-22:6) 可作为区别未氧化 AKO (LPL1、MPL1、HPL1) 之间的脂质标记物; 氧化第 24 d 时 VIP 值最大的脂质分子 Cer(35:3) 可作为区别氧化 AKO (LPL5、MPL5、HPL5) 之间的脂质标记物。

(2) 分别筛选三种 AKO 加速氧化过程中各个阶段的氧化标记物, 即每一氧化阶段变化最显著的前 10 种脂质, 可以观察到 LPL 和 MPL 中变化显著的差异脂质主要为 GP 和 GL, 而 HPL 中则是较多的 SP 型的显著差异脂质, 如 Cer(42:2)、OAHFA(22:6-16:0)、Hex1Cer(38:6)、Cer(16:2-25:2)、SM(20:1-24:2) 等, 表示了不同脂质 AKO 贮藏期内的变化差异。

(3) 这些不同脂质组成 AKO 之间的显著差异脂质, 以及同种 AKO 氧化过程中显著差异脂质的变化, 可作为鉴别 AKO 贮藏品质的脂质标记物, 展示不同脂质组成的 AKO 氧化过程脂质变化的差异, 用于不同脂质组成 AKO 的检测以及质量评估。

第5章 主要结论与展望

5.1 主要结论

(1) 经过单因素试验以及相应面优化试验, 确定最佳的提取 AKO 中性脂质的工艺条件为: 萃取压强 45 MPa、萃取温度 45°C、萃取时间 1.75 h。在最佳萃取条件下所得虾油 TG 含量为 73.68%。醇提工艺经过单因素实验与响应面优化, 确定最佳提取富含 AKO 极性脂的工艺条件为: 萃取时间 3 h, 萃取温度 57°C, 萃取料液比 1:3, 在最佳萃取条件下所得 PL 含量高达 80.19%。经过以上处理, 可实现 AKO 中性脂质与极性脂质最大程度的分离。超临界 CO₂ 萃取与乙醇提取可作为分离 AKO 不同极性成分的有效方法, 有利于扩展 AKO 作为保健食品开发的重要价值。

(2) 以上一部分所制两种不同极性的 AKO 为原料, 复配具有不同脂质组成的 AKO (命名为 AKO1~11)。从 AKO1 到 AKO11, TG 和微量成分的含量逐级递增, PL 和 PUFA 的含量逐级递减。对 11 种不同脂质组成的 AKO 经 Oxitest 仪测试得到氧化诱导时间, 可得出, AKO4 的具有最强的氧化稳定性。根据不同成分与抗氧化能力之间的 PCC, 发现 TG、虾青素、维生素 A、生育酚和 PL 含量都与抗氧化能力高度相关。但只有 PL 与 AKO 的抗氧化能力呈正相关, 说明 AKO 的抗氧化能力主要由 PL 含量决定。

(3) 11 种 AKO 进行加速氧化实验, 发现 EPA 和 DHA 在 11 种 AKO 中的变化符合零级动力学模型和一级动力学模型。通过比较氧化速率常数, 可知 AKO11 中的 EPA 和 DHA 的降解速度高于 AKO1, 且 AKO4 中 EPA 与 DHA 表现的氧化速率最低, 说明相对于其他 AKO 而言, EPA 和 DHA 在 AKO4 中氧化较慢。这与 Oxitest 氧化诱导时间表现出来的结果相似, 这说明在 11 种 AKO 体系中, 富含中等 PL 含量与一定微量成分含量的 AKO4 的具有较好的氧化稳定性。此外, 在 24 d 的加速氧化过程中, 具有抗氧化功能的虾青素、维生素 A 和生育酚总体呈现下降趋势, 但 PL 含量较高的 AKO1~6 种的生育酚含量在第 18 d 时呈现略回升现象, 这与 PL 对生育酚的再生作用有关, 证实了 PL 与生育酚的抗氧化协同作用。

(4) 筛选不同脂质组成 AKO 以及相同脂质组成 AKO 在不同氧化阶段的显著差异脂

质。其中氧化第 0 d 时 VIP 值最大的脂质分子 PC(44:7)|PC(22:1-22:6)可作为区别未氧化 AKO (LPL1、MPL1、HPL1)之间的脂质标记物;氧化第 24 d 时 VIP 值最大的脂质分子 Cer(35:3)可作为区别氧化 AKO (LPL5、MPL5、HPL5)之间的脂质标记物。氧化 24 d 过程中,观察到 LPL 和 MPL 中变化显著的异脂质主要为 GP 和 GL,而 HPL 中则是较多的 SP 型的差异脂质。

5.2 创新点

(1) 初步解析了 AKO 脂质组分与氧化稳定性的相关性,研究不同脂质组成 AKO 氧化行为差异。

(2) 从脂质组学的角度探讨不同极性脂质组成 AKO 氧化过程中的脂质变化差异,间接表示不同脂质组成的 AKO 氧化过程的区别,为进一步揭示其氧化劣变机制奠定了理论依据。

5.3 展望

(1) 在研究 AKO 脂质组分与氧化稳定性的关系中研究不够深入,只是从宏观的角度粗略的比较了二者的相互关系,后续应该全面监测 AKO 氧化过程中各种脂质的劣变过程,以及脂肪酸变化规律。揭示不同脂质组分的 AKO 氧化稳定性具有差异性的原因。

(2) AKO 加速氧化后的生成物更能反映不同脂质组成 AKO 氧化劣变行为的差异,因此需要结合 AKO 定量靶向氧化脂质的组学研究,进一步的对 AKO 氧化过程中涉及的代谢通路进行深入探讨。

参考文献

- [1] Candeias R, Teixeira S, Duarte C M, et al. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the Antarctic krill *Euphausia superba* [J]. BMC Research Notes, 2014, 7: 1-3.
- [2] Atkinson A, Siegel V, Pakhomov E, et al. A re-appraisal of the total biomass and annual production of Antarctic krill [J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2009, 56 (5): 727-740.
- [3] Reid K: Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources (CCAMLR): implementation of conservation of Southern Ocean marine living resources, Governing marine living resources in the polar regions: Edward Elgar Publishing, 2019: 30-42.
- [4] Phleger C F, Nelson M M, Mooney B D, et al. Interannual and between species comparison of the lipids, fatty acids and sterols of Antarctic krill from the US AMLR Elephant Island survey area [J]. Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology, 2002, 131 (4): 733-747.
- [5] Castro-Gómez M P, Holgado F, Rodríguez-Alcalá L M, et al. Comprehensive study of the lipid classes of krill oil by fractionation and identification of triacylglycerols, diacylglycerols, and phospholipid molecular species by using UPLC/QToF-MS [J]. Food Analytical Methods, 2015, 8: 2568-2580.
- [6] Fricke H, Gercken G, Schreiber W, et al. Lipid, sterol and fatty acid composition of Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana) [J]. Lipids, 1984, 19: 821-827.
- [7] Xie D, Jin J, Sun J, et al. Comparison of solvents for extraction of krill oil from krill meal: Lipid yield, phospholipids content, fatty acids composition and minor components [J]. Food Chemistry, 2017, 233: 434-441.
- [8] Tandy S, Chung R W, Wat E, et al. Dietary krill oil supplementation reduces hepatic steatosis, glycemia, and hypercholesterolemia in high-fat-fed mice [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57 (19): 9339-9345.

-
- [9] Wijendran V, Huang M-C, Diau G-Y, et al. Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates [J]. *Pediatric research*, 2002, 51 (3): 265-272.
- [10] Bonaterra G A, Driscoll D, Schwarzbach H, et al. Krill oil-in-water emulsion protects against lipopolysaccharide-induced proinflammatory activation of macrophages in vitro [J]. *Marine drugs*, 2017, 15 (3): 74.
- [11] Hals P A, Wang X, Xiao Y F. Effects of a purified krill oil phospholipid rich in long-chain omega-3 fatty acids on cardiovascular disease risk factors in non-human primates with naturally occurring diabetes type-2 and dyslipidemia [J]. *Lipids in health and disease*, 2017, 16: 1-16.
- [12] Zheng W, Wang X, Cao W, et al. E-configuration structures of EPA and DHA derived from *Euphausia superba* and their significant inhibitive effects on growth of human cancer cell lines in vitro [J]. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 2017, 117:47-53.
- [13] 林柳, 曹振海, 陶宁萍, 等. 南极磷虾油氧化稳定性及调控方法研究进展 [J]. *食品科学*, 2023, 44 (15): 310-320.
- [14] Fuller I D, Cumming A H, Card A, et al. Free fatty acids in commercial krill oils: concentrations, compositions, and implications for oxidative stability [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2020, 97 (8): 889-900.
- [15] Lu F, Bruheim I, Haugsgjerd B, 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] Shahidi F, Zhong Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability [J]. *Chemical Society reviews*, 2010, 39 (11): 4067-4079.
- [17] Hellessey N, Ericson J A, Nichols P D, et al. Seasonal and interannual variation in the lipid content and composition of *Euphausia superba* Dana, 1850 (Euphausiacea) samples derived from the Scotia Sea fishery [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2018, 38 (6): 673-681.

-
- [18] Ali-Nehari A, Chun B-S. Characterization of purified phospholipids from krill (*Euphausia superba*) residues deoiled by supercritical carbon dioxide [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2012, 29: 918-924.
- [19] Xie D, Mu H, Tang T, et al. Production of three types of krill oils from krill meal by a three-step solvent extraction procedure [J]. Food Chemistry, 2018, 248: 279-286.
- [20] Gigliotti J C, Davenport M P, Beamer S K, et al. Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*) [J]. Food Chemistry, 2011, 125 (3): 1028-1036.
- [21] Lu F, Nielsen N S, Baron C P, et al. Marine phospholipids: The current understanding of their oxidation mechanisms and potential uses for food fortification [J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2017, 57 (10): 2057-2070.
- [22] Xie H, Yin F, Liu Z, et al. Oxidation kinetics of polyunsaturated fatty acids esterified into triacylglycerols and phospholipids in dried scallop (*Argopecten irradians*) adductor muscles during storage [J]. Food & function, 2020, 11 (3): 2349-2357.
- [23] 廖妙飞, 付万冬, 孙继鹏, 等.富含 ω -3 多不饱和脂肪酸的磷脂酰丝氨酸制备工艺研究 [J]. 渔业研究, 2022, 44 (06): 599-605.
- [24] Song J-H, Inoue Y, Miyazawa T J B, Biotechnology,, et al.Oxidative stability of docosahexaenoic acid-containing oils in the form of phospholipids, triacylglycerols, and ethyl esters [J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1997, 61 (12): 2085-2088.
- [25] Chen B, Mcclements D J, Decker E, et al. Minor components in food oils: a critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions [J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2011, 51 (10): 901-916.
- [26] Choe E, Min D B, Safety F.Mechanisms and factors for edible oil oxidation [J]. Comprehensive reviews in food science and food safety, 2006, 5 (4): 169-186.
- [27] Waraho T, Mcclements D J, Decker E. Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions [J]. Food Chemistry, 2011, 129 (3): 854-859.

- [28] Aubourg S P, Agriculture. Fluorescence study of the pro-oxidant effect of free fatty acids on marine lipids [J]. *Journal of the science of food and agriculture*, 2001, 81 (4): 385-390.
- [29] Mistry B S, Min D B. Effects of fatty acids on the oxidative stability of soybean oil [J]. *Journal of food science*, 1987, 52 (3): 831-832.
- [30] Miyashita K, Takagi T. Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1986, 63 (10): 1380-1384.
- [31] Dobarganes C, Márquez-Ruiz G, Velasco J, et al. Interactions between fat and food during deep-frying [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015, 102 (8-9): 521-528.
- [32] Mistry B S, Min D B. Prooxidant effects of monoglycerides and diglycerides in soybean oil [J]. *Journal of food science*, 1988, 53 (6): 1896-1897.
- [33] Lambertsen G, Braekkan O, Agriculture. Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products [J]. *Journal of the science of food and agriculture*, 1971, 22 (2): 99-101.
- [34] Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea F, et al. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications [J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2006, 46 (2): 185-196.
- [35] Zhao T, Yan X, Sun L, et al. Research progress on extraction, biological activities and delivery systems of natural astaxanthin [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 91: 354-361.
- [36] Xie D, Mu H, Tang T, et al. Production of three types of krill oils from krill meal by a three-step solvent extraction procedure [J]. *Food chemistry*, 2018, 248: 279-286.
- [37] Gigliotti J C, Davenport M P, Beamer S K, et al. Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*) [J]. *Food Chemistry*, 2011, 125 (3): 1028-1036.

-
- [38] Lee J, Fujimoto K, Kaneda T. Antioxygenic and peroxide decomposition properties of antarctic krill [*Euphausia superba*] lipids [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan), 1981, 47 (7).
- [39] Kamal-Eldin A, Appelqvist L Å J L. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols [J]. Lipids, 1996, 31 (7): 671-701.
- [40] Yamauchi R, Kato K, Ueno Y J L. Formation of trimers of α -tocopherol and its model compound, 2, 2, 5, 7, 8-pentamethylchroman-6-ol, in autoxidizing methyl linoleate [J]. Lipids, 1988, 23 (8): 779-783.
- [41] Gordon M H, Magos P. The effect of sterols on the oxidation of edible oils [J]. Food Chemistry, 1983, 10 (2): 141-147.
- [42] Sims R, Fioriti J, Kanuk M. Sterol additives as polymerization inhibitors for frying oils: Wiley Online Library, 1972.
- [43] 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.
- [44] Otaegui-Arrazola A, Menendez-Carreño M, Ansorena D, et al. Oxysterols: A world to explore [J]. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 2010, 48 (12): 3289-3303.
- [45] Guardiola F, Codony R, Addis P, et al. Biological effects of oxysterols: current status [J]. Food and Chemical Toxicology, 1996, 34 (2): 193-211.
- [46] Sottero B, Gamba P, Gargiulo S, et al. Cholesterol oxidation products and disease: an emerging topic of interest in medicinal chemistry [J]. Current medicinal chemistry, 2009, 16 (6): 685-705.
- [47] Barriuso B, Ansorena D, Astiasarán I, et al. Oxysterols formation: A review of a multifactorial process [J]. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2017, 169: 39-45.
- [48] Song G, Wang H, Zhang M, et al. Real-time monitoring of the oxidation characteristics of Antarctic krill oil (*Euphausia superba*) during storage by electric

- p soldering iron ionization mass spectrometry-based lipidomics [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2020, 68 (5): 1457-1467.
- [49] Zamora R, Hidalgo F. The Maillard reaction and lipid oxidation [J]. Lipid Technology, 2011, 23 (3): 59-62.
- [50] Hidalgo F J, Zamora R, Chemistry F. Strecker-type degradation produced by the lipid oxidation products 4, 5-epoxy-2-alkenals [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2004, 52 (23): 7126-7131.
- [51] Thomsen B R, Haugsgjerd B O, Griinari M, et al. Investigation of oxidative degradation and non-enzymatic browning reactions in krill and fish oils [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2013, 115 (12): 1357-1366.
- [52] Ventanas S, Estévez M, Delgado C L, et al. Phospholipid oxidation, non-enzymatic browning development and volatile compounds generation in model systems containing liposomes from porcine Longissimus dorsi and selected amino acids [J]. European Food Research and Technology, 2007, 225: 665-675.
- [53] Lu F, Nielsen N S, Baron C P, et al. Impact of primary amine group from aminophospholipids and amino acids on marine phospholipids stability: Non-enzymatic browning and lipid oxidation [J]. Food chemistry, 2013, 141 (2): 879-888.
- [54] Lu F, Nielsen N S, Baron C P, et al. Oxidative degradation and non-enzymatic browning due to the interaction between oxidised lipids and primary amine groups in different marine PL emulsions [J]. Food Chemistry, 2012, 135 (4): 2887-2896.
- [55] Bandarra N M, Campos R M, Batista I, et al. Antioxidant synergy of α -tocopherol and phospholipids [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999, 76: 905-913.
- [56] Koga T, Terao J. Phospholipids increase radical-scavenging activity of vitamin E in a bulk oil model system [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1995, 43 (6): 1450-1454.

- [57] Wang X, Chen Y, McClements D J, et al. Recent advances in understanding the interfacial activity of antioxidants in association colloids in bulk oil [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2024: 103117.
- [58] Doert M, Jaworska K, Moersel J T, et al. Synergistic effect of lecithins for tocopherols: lecithin-based regeneration of α -tocopherol [J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 235: 915-928.
- [59] Weng X, Gordon M. Antioxidant synergy between phosphatidyl ethanolamine and α -tocopherylquinone [J]. *Food chemistry*, 1993, 48 (2): 165-168.
- [60] Shimajiri J, Shiota M, Hosokawa M, et al. Synergistic antioxidant activity of milk sphingomyeline and its sphingoid base with α -tocopherol on fish oil triacylglycerol [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2013, 61 (33): 7969-7975.
- [61] Ahmad I, Alaiz M, Zamora R, et al. Effect of oxidized lipid/amino acid reaction products on the antioxidative activity of common antioxidants [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1998, 46 (9): 3768-3771.
- [62] Hidalgo F J, León M M, Zamora R, et al. Effect of tocopherols in the antioxidative activity of oxidized lipid- amine reaction products [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2007, 55 (11): 4436-4442.
- [63] Akanbi T O, Barrow C. Compositional information useful for authentication of krill oil and the detection of adulterants [J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11: 178-187.
- [64] 宋泽宇. 南极磷虾油绿色提取工艺研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2014.
- [65] 刘芸杭, 林伟, 胥亚夫, 等. 南极磷虾油的分级制备及其品质分析 [J]. *水产学报*, 2022, 46 (03): 457-465.
- [66] 谢丹. 南极磷虾油的分级制备及功能评价 [D]. 江苏: 江南大学, 2019.
- [67] 赵泓博. 南极磷虾油分级制备及其品质分析 [D]. 大连: 大连工业大学, 2019.
- [68] 吴晓宗, 郝莉花, 赵光远, 等. 响应面法优化超临界 CO_2 萃取金花葵籽油工艺 [J]. *中国油脂*, 2017, 42 (07): 15-18.
- [69] 宋玉卿, 张雪, 李钊, 等. 稻米胚芽油的超临界 CO_2 萃取工艺优化 [J]. *中国油脂*, 2019, 44 (12): 20-24.

- [70] 王玥玮, 张斌, 温禄云, 等. 南极磷虾油提取工艺的优化 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37 (04): 105-107.
- [71] Cavazza A, Corti S, Mancinelli C, et al. Effect of the addition of chili pepper powder on vegetable oils oxidative stability [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2015, 92: 1593-1599.
- [72] Läubli M W, Bruttel P. Determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the rancimat method [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1986, 63 (6): 792-795.
- [73] 刘阳, 王春立, 曹培让, 等. 7 种食用植物油物性及氧化稳定性评价 [J]. 中国油脂, 2017, 42 (10): 63-68.
- [74] Yoshida K, Terao J, Suzuki T, et al. Inhibitory effect of phosphatidylserine on iron-dependent lipid peroxidation [J]. Biochemical and biophysical research communications, 1991, 179 (2): 1077-1081.
- [75] Hidalgo F J, León M M, Zamora R, et al. Antioxidative activity of amino phospholipids and phospholipid/amino acid mixtures in edible oils as determined by the Rancimat method [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54 (15): 5461-5467.
- [76] Cui L, Decker E, Agriculture. Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants? [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96 (1): 18-31.
- [77] Wang Y, Liu Y, Ma L, et al. The oxidation mechanism of phospholipids in Antarctic krill oil promoted by metal ions [J]. Food Chemistry, 2020, 333: 127448.
- [78] 钱时权, 冯结丽, 卢河东, 等. 人工孵育模拟贮藏条件下高油脂性稀奶油抗氧化工艺筛选 [J]. 中国粮油学报, 2015, 30 (08): 68-73.
- [79] 金鹿, 闫素梅, 史彬林, 等. 维生素 A 抗氧化功能的机制 [J]. 动物营养学报, 2015, 27 (12): 3671-3676.
- [80] 周湘人. 藏灵菇中抗氧化酵母筛选及抑制鱼肉脂质氧化研究 [D]. 湖南: 中南林业科技大学, 2022.

- [81] Liebisch G, Fahy E, Aoki J, et al. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures [J]. Journal of lipid research, 2020, 61 (12): 1539-1555.
- [82] 孙嘉阳. 基于脂质组学 UPLC-QTOF-MS 的榛子油自氧化规律研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2022.
- [83] 肖明飞. 添加不同浓度硒对育肥猪生产性能、肉品质及脂质代谢组学的影响 [D]. 贵州: 贵州大学, 2022.
- [84] 李雅婷, 刘小芳, 姜维, 等. 不同体长南极磷虾的脂质组成差异分析 [J]. 中国油脂, 2022, 47 (12): 90-96.
- [85] 胡劼, 俞博凯, 吕飞, 等. 水相体系中磷脂酶 A1 酶解南极磷虾磷脂制备溶血磷脂的分析 [J]. 食品科学, 2019, 40 (12): 92-97.
- [86] 张惠芳. 外周血中 Cer、SPH 和 SM 的含量与妊娠期肝内胆汁淤积症的相关性研究 [D]. 甘肃: 甘肃中医药大学, 2022.
- [87] 张文华, 李荀, 王孝强, 等. 运动对鞘氨醇-1-磷酸影响的研究进展 [C]. 2023 年中国生理学会运动生理学专业委员会学术会议暨运动生理学专业委员会成立 20 周年庆祝大会, 2023: 2.
- [88] 陈跃平, 谢婷, 张昊, 等. β -谷甾醇的生理功能及其在动物生产中的应用研究进展 [J]. 动物营养学报, 2022, 34 (05): 2721-2731.
- [89] Nemeth M A. Multi-and megavariate data analysis [J]. Taylor & Francis, 2003.
- [90] 郭新. 羊肉火腿加工及贮藏期间风味形成与脂质代谢的研究 [D]. 新疆: 石河子大学, 2022.
- [91] 徐亚洁, 张晓燕, 马淑晶, 等. 神经酰胺对肝纤维化治疗作用的初步研究 [J]. 天津医科大学学报, 2014, 20 (04): 260-263.
- [92] 弓宇. 蒙古牛和西门塔尔牛脂肪特性及脂质代谢组学分析 [D]. 2021.

攻读学位期间发表的学术论文

第一作者，南极磷虾油不同极性脂质的提取工艺优化[J/OL].中国油脂,1-18[2024-03-27，网络首发].<https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.240090>.

第二作者，杨梅核仁油的营养价值及其加工进展[J/OL].中国油脂,1-17[2024-04-11，网络首发].<https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.230446>.

致谢

岁月匆匆，转眼间三年的硕士研究生学习就已经接近了尾声，论文也马上要进入答辩阶段。在整个论文的整个写作过程，除了自己努力之外，离不开老师的指导、课题组师妹师弟的帮助以及家人朋友的支持。

首先，我要衷心的感谢我的导师——谢丹副教授与郭玉宝教授。导师一丝不苟、严谨细致、认真负责、精益求精的工作风格是我学习的榜样，深深地感染和激励着我。本文研究方向的选择、论文题目的确定、框架结构的形成，到论文的撰写反复修改定稿，都得到了导师们悉心、细致的指导。在此谨向我的两位导师致以诚挚的谢意和崇高的敬意。

此外，我还要感谢一起度过科研生活的师弟师妹们——杨云云、王太伟、张瑞涛等，正是他们的帮助和关心，使我的实验课题度过一次又一次的难关，也使我的求学经历更加丰富、充实。

最后，我还要感谢我的家人和朋友们对我的支持。他们的支持是我一路走来的动力。

此篇论文的写作虽告一段落，掩卷长思，仍觉许多遗憾。由于本人专业水平及精力等因素限制，文中仍有许多不足之处，恳请各位专家、学者给予批评指正。硕士阶段的学习即将告一段落，但是学习还没有结束，奋斗的路还很长，我将继续前行，争取更大的进步。

罗静茹

2024年5月30日