微藻功能脂质的超临界流体色谱–蒸发光散射检测方法的建立

徐梦洁，刘霖琳，徐杰，丛培旭，孟楠，宋雨，刘炎峻*

（中国海洋大学食品科学与工程学院，山东青岛 266100）

摘要：微藻脂质成分复杂且极性差异大，目前缺乏一种既不依赖质谱又能同时测定其多种功能脂质的方法。为了解决该难题，该研究建立了一种绿色环保的超临界流体色谱-蒸发光散射检测法。采用 Diol 色谱柱，以超临界二氧化碳-甲醇为流动相，进行梯度洗脱，流量 0.5 mL·min^{-1}，ELSD 检测器检测，外标法定量。结果表明，该方法可在 35 min 内实现 8 种功能脂质的分离测定。相比传统液相方法有机试剂约需 40 mL，该方法仅需 12.28 mL。在 0.01~1.0 mg·mL^{-1}线性关系良好（R^2≥0.990 2），检出限≤0.74 μg·mL^{-1}，精密度≤1.19%，加标回收率 92.12%~105.78%。六种微藻的功能脂质含量存在较为明显的差异。其中，小球藻和拟微球藻的甘油酯（分别约 53.08、57.91 mg·g^{-1}）、甘油糖脂（分别约 39.90、32.76 mg·g^{-1}）和磷脂含量（分别约 19.40、29.54 mg·g^{-1}）均较其它微藻高，有望作为甘油糖脂及磷脂的膳食补充来源。该方法灵敏、准确、绿色，可在一次进样中实现低极性至高极性脂质的分离测定。该方法能满足未来对微藻样本的快速精准脂质分析需求适用于各种含特定脂质成分的食品基质分析。

关键词：超临界流体色谱法（SFC）；蒸发光散射检测（ELSD）；功能脂质；食品；微藻

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0910

Methodological Development of Supercritical Fluid Chromatography Coupled with Evaporative Light Scattering Detector for Determining Microalgal Functional Lipids

XU Mengjie, LIU Linlin, XU Jie, CONG Peixu, MENG Nan, SONG Yu, LIU Yanjun*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Abstract: Due to the complexity of the lipid composition of microalgae and the large difference in polarity, there is a lack of a method to simultaneously determine its multiple functional lipids without relying on mass spectrometry. To tackle this challenge, a green and eco-friendly supercritical fluid chromatography-evaporative light scattering detection method had been developed. The separation was conducted using a Diol column through gradient elution with a mobile phase consisting of supercritical carbon dioxide, methanol. The flow rate was 0.5 mL·min^{-1}. Detection was performed using an ELSD, and the compounds were quantified using an external standard method. The eight functional lipids could be separated and determined within 35 minutes. Compared with traditional liquid phase methods, which require approximately 40 mL of organic reagents, this method requires only 12.28 mL. The method exhibited a good linear range (0.01~1.0 mg·mL^{-1}) with a correlation coefficient R^2≥0.990 2. The limits of detection were less than 0.74 μg·mL^{-1}. The relative standard deviation of all the standards was less than 1.19%, and the spiked recovery rates ranged from 92.12% to 105.78%. There were more significant differences in the content of functional lipids in different microalgae. Among them, *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis* sp. had the higher contents of glycerides (approximately 53.08 and 57.91 mg·g^{-1}, respectively), glycerolipidsand (approximately 39.90 and 32.76 mg·g^{-1}, respectively), phospholipids (approximately 19.40 and 29.54 mg·g^{-1}, respectively) than the other microalgae. They were expected to be used as dietary supplement sources of glycerolipids and phosphatidylinositol. The established method is highly sensitive, accurate and environmentally friendly. It enables the separation and quantification of lipids spanning a wide polarity range, from low-polarity to high-polarity, within a single injection. The method fulfills the need for rapid and precise lipid analysis of microalgae samples, and is applicable for lipid profiling in diverse food matrices containing specific lipid

收稿日期：2025-06-30；修回日期：2025-08-29；接受日期：2025-09-01

基金项目：国家重点研发计划项目（2023YFD2100605）；广西重点研发计划项目（桂科 AB25069010）

作者简介：徐梦洁（2001-），女，硕士研究生，研究方向：水产品功能脂质检测与营养功效，E-mail：21230713107@stu.ouc.edu.cn

通讯作者：刘炎峻（1991-），男，博士，副教授，研究方向：食品精准营养，E-mail：liuyanjun@ouc.edu.cn

components.

Key words: Supercritical fluid chromatography (SFC); Evaporative light scattering detection (ELSD); Functional lipid compounds; Foods; Microalgae

微藻因生长速度快、油脂含量高、不占用农业耕地等特点，被认为是极具开发潜力的生物资源[1]。部分微藻，如拟微球藻，脂质含量可高达 30%~50%[2]，脂肪酸类型以 ω-3 形式的多不饱和脂肪酸（PUFAs）为主，是重要的功能脂质资源[3]。值得注意的是，基于丰富的脂质含量，其抗炎、抗癌及神经保护等活性[4,5]，使得微藻功能脂质不仅作为生物柴油原料备受关注[6]，在婴幼儿配方食品[7]、心血管疾病预防[8]、自身免疫疾病[9]及神经保护相关功能食品开发[10]中具有独特优势。同时，随着微藻粉及微藻油陆续被纳入新食品原料目录，针对微藻原料或产品建立精准的脂质分析技术，已成为保障产品质量、规范市场应用及挖掘高附加值产物的技术基础。然而，此前对于藻粉脂质的分析主要在脂肪酸组成上，关于功能脂质的含量分析研究很少，同时微藻脂质组成体系复杂，与传统动物等脂质组成差异大，涵盖非极性甘油酯及甘油糖脂、磷脂等极性脂质，对其功能脂质的同步检测提出了严峻挑战。

目前主流的脂质分析方法有比色法、高效液相色谱（HPLC）法及色谱质谱联用法。比色法操作简单，但不同微藻颜色差异易导致结果误差大[3]。HPLC 法可以实现多类别分离，但有机溶剂消耗量大、分析通量低，很难同时分析多种功能脂质含量[11,12]。色谱质谱联用法灵敏度及准确度较高[13]，但仪器购置和维护成本昂贵，实验数据量大导致定性定量等数据分析复杂费时，难以满足高通量及快速批量检测需求[14]。

相比之下，超临界流体色谱（SFC）以超临界流体（主要为超临界二氧化碳（sCO_2））作为流动相，兼具绿色化学特性、高分离效率、低溶剂消耗及数据处理相对简单等优势，能够实现宽极性范围化合物的分离，已成为脂质分析领域的新兴技术平台[15,16]。同时蒸发光散射检测器（ELSD）因其广谱响应特性，可高效检测无紫外吸收化合物[17]（如甘油糖脂、磷脂等），是脂质分析的理想检测方案。近年来，Eric 等[18]使用 SFC-ELSD 开发了针对甘油三酯的定量检测方法，但串联了五根色谱柱，操作繁琐；Michel 等[19]采用 SFC-ELSD 成功分析了高纯度磷脂样本中的磷脂含量，但方法仅限于单一磷脂类别。上述研究结果表明 SFC-ELSD 联用技术在脂质定量分析方面具有巨大潜力以及可行性，但尚未开发针对复杂脂质场景的脂质含量检测方法。

基于此，该研究针对微藻脂质的多样性特征，系统优化 SFC-ELSD 联用技术的分离与检测条件，旨在基于 SFC-ELSD 联用构建一种可同时覆盖甘油酯、甘油糖脂、磷脂三类功能脂质的定量平台，该方法的建立可为微藻脂质资源的高值化利用提供方法学支撑，满足未来对微藻样本的快速精准脂质分析需求。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

拟微球藻粉、小球藻粉、盐藻粉，购自无棣绿奇生物工程有限公司；裸藻粉，购自汉中汉溯源生物科技有限公司；螺旋藻粉，购自西安圣青生物科技有限公司；莱茵衣藻粉，购自维珍汉溯源（西安）生物技术有限公司。INERTSIL DIOL 色谱柱（4.6 mm×250 mm，3 μm），购自技尔商贸有限公司；甲醇与二氯甲烷，色谱纯，购自德国 Merck 公司；其余有机试剂均为国产分析纯。

脂质标准品：TG（≥99%）、DG（≥98%）、MG（≥99%）、PC（≥99%）、PE（≥99%）和 PI（≥99%），美国 Avanti Polar Lipids 公司；MGDG（≥95%）和 DGDG（≥98%），美国 Cayman 公司。

1260 Infinity II 液相色谱仪（UHPLC/SFC 混合系统，配有蒸发光散射检测器），美国 Agilent 公司；FZ102 粉碎机，天津泰斯特仪器有限公司；AL204 电子天平，瑞士梅特勒-托利多公司；KQ-250DE 超声清洗机，青岛创合盛科教仪器设备有限公司；TGL-16G 台式冷冻离心机，上海安亭科学仪器厂；N-20 氮吹仪，山东桑泽仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配制

将 TG、DG、MG、PC、PE、PI、MGDG、DGDG 分别溶解为质量浓度 10 mg mL^{-1} 的标准储备溶液。为检测

标准品的线性范围，梯度配制标准工作溶液时，需配制较宽的浓度范围，即用二氯/甲醇（2:1，*V/V*）梯度稀释各储备溶液获得质量浓度为 0.005~5 mg mL^{-1}（0.005、0.01、0.025、0.05、0.125、0.25、0.5、1、2.5、5 mg mL^{-1}）的标准工作溶液。此外，将各标准储备液配制成混合标准品溶液，所有标准溶液于-20 ℃保存。

1.2.2 色谱条件

参考 Kozlov 等[20]的报道，选用 Diol（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱进行方法开发。洗脱过程采用梯度洗脱，流动相 A：sCO_2，流动相 B：甲醇+浓度 10.0 mmol L^{-1} 异丙胺，流量 0.5 mL min^{-1}。柱温 35 ℃，进样量 5 μL，补充液为流动相 B，流量为 0.25 mL min^{-1}。梯度洗脱程序（*V/V*）：0 min 为 0% B，3 min 梯度升高至 12% B，接着按 3% B/3 min 的梯度升至 39% B，并于 30 min 时梯度降至 0% B 并保持 5 min。ELSD 检测器条件为：雾化器温度 45 ℃和蒸发器温度 80 ℃，氮气流量 1.6 L min^{-1}。上述条件下，依次优化异丙胺添加量、流动相流量与柱温。

1.2.3 微藻脂质的萃取

微藻脂质萃取采用了本实验室开发的方法[1,21]。简要来说，每种微藻样品做 3 个平行，各取 50 mg 藻粉，用 3 mL 三氯甲烷/甲醇/水（2:1:1，*V/V/V*）萃取三次，并将提取得到的脂质合并后在氮气流下干燥，复溶在 1 mL 二氯甲烷/甲醇（1:1，*V/V*）中，随后，使用 0.22 μm 超滤膜过滤溶液，存储在-20 ℃，以备后续使用 SFC-ELSD 进行检测分析。后续根据样品谱图对各微藻进行稀释以使其脂质含量在线性范围内。

1.2.4 方法学考察

1.2.4.1 线性范围、检出限与定量限

使用质量浓度范围为 0.005~5 mg mL^{-1} 标准工作溶液按照 1.2.2 中优化后的最佳条件进行检测。将质量浓度水平（mg mL^{-1}）与峰面积（mV min）作图以生成标准曲线，并绘制线性回归方程以及相关系数（R^2）进行计算以评估线性范围。信噪比（S/N）＝3 的进样质量浓度即检出限（LOD），S/N＝10 的进样质量浓度即定量限（LOQ）。

1.2.4.2 精密度

取标准混合液，按照 1.2.2 中的优化后的最佳条件测定，连续测定 6 次，按面积计算相对标准偏差（RSD）值。

1.2.4.3 加标回收率

精确称取 18 份已测定出 8 种脂质含量的拟微球藻粉各 50 mg（精确度至 1×10^{-5} g），分三组，每组 6 份。分别加入不同体积的混合标准品溶液，制备成含低、中、高三个水平质量浓度的混合标准品溶液的加标样品溶液后，对各加标样品溶液进行检测分析，计算各加标溶液中 8 种功能脂质的加标回收率及 RSD 值。

1.2.5 微藻样品中功能脂质含量的测定

将 1.2.3 预处理后的微藻脂质按照 1.2.2 中的优化后的最佳条件进行检测，分析样品中 8 种功能脂质的含量。

1.3 数据处理

所有实验重复 3 次，数据处理采用 Microsoft Excel 2022，计算平均值及 RSD 值。色谱图绘制采用 Origin 2024。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 异丙胺添加量优化

添加剂的引入通常能够改变流动相的 pH 值，从而改变化合物在色谱柱上的保留行为，改善目标化合物的色谱响应及峰形特征。该研究在进行大量实验，实现了 8 种脂质基本分离的基础上，首先对异丙胺改性剂的添加量进行了优化。如图 1 所示，当异丙胺浓度为 7.5 mmol L^{-1} 时，各脂质的响应强度处于较低水平。将浓度提高至 12.5 mmol L^{-1} 后，脂质的响应强度及分离效果均得到显著改善。进一步增加浓度至 15.0 mmol L^{-1} 时，虽然 PC 的响应值增强，但其余组分的响应信号、峰形与 12.5 mmol L^{-1} 未呈现明显差异，且 12.5 mmol L^{-1} 条件下脂质的分离度较其他添加量条件下好（表 1）。鉴于高浓度改性剂可能加速色谱柱性能衰退并增加系统堵塞风险，该研究最终选择 12.5 mmol L^{-1} 作为最优异丙胺添加量。该条件在保证良好峰形和分离度的同时，实现了检测灵敏度的有效提升，为后续分析提供了可靠保障。

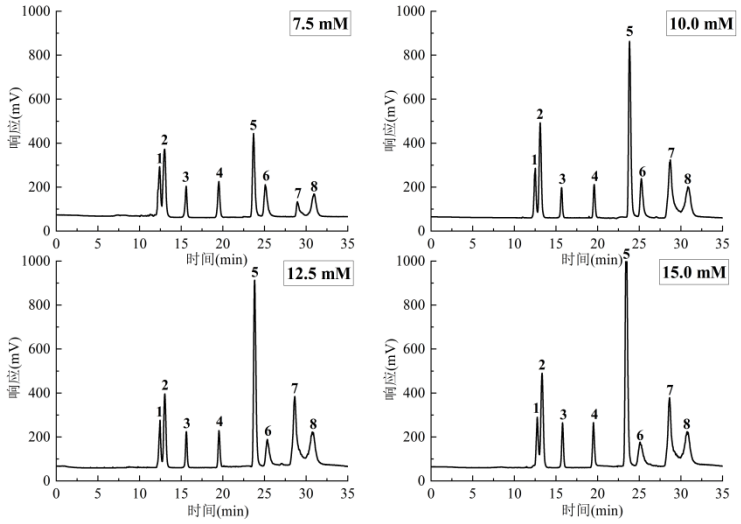

图 1 不同异丙胺添加量条件下标准混合液的 SFC-ELSD 色谱图

Fig.1 SFC-ELSD chromatograms of a standard mixture at different levels of isopropylamine addition

注：1-8 数字代表：1：TG.甘油三酯，2：DG.甘油二酯，3：MG.甘油一酯，4：MGDG.单半乳糖酰甘油二酯，5：PC.磷脂酰胆碱，6：PE.磷脂酰乙醇胺，7：DGDG.双半乳糖甘油二酯，8：PI.磷脂酰肌醇。

表 1 不同异丙胺添加量条件下 8 种脂质的分离度

Table 1 Separation efficiency of 8 lipids under different levels of isopropylamine addition

异丙胺添加量/mmol/L	TG	DG	MG	MGDG	PC	PE	DGDG	PI
7.5	/	0.91	3.32	5.29	4.90	1.51	2.96	1.42
10.0	/	0.81	3.77	6.59	5.47	1.51	2.54	1.42
12.5	/	0.79	4.19	6.80	5.52	1.64	2.62	1.56
15.0	/	0.79	3.77	5.49	4.40	1.63	2.81	1.52

注：TG：甘油三酯，DG：甘油二酯，MG：甘油一酯，MGDG：单半乳糖酰甘油二酯，PC：磷脂酰胆碱，PE：磷脂酰乙醇胺，DGDG：双半乳糖甘油二酯，PI：磷脂酰肌醇。

2.1.2 流量优化

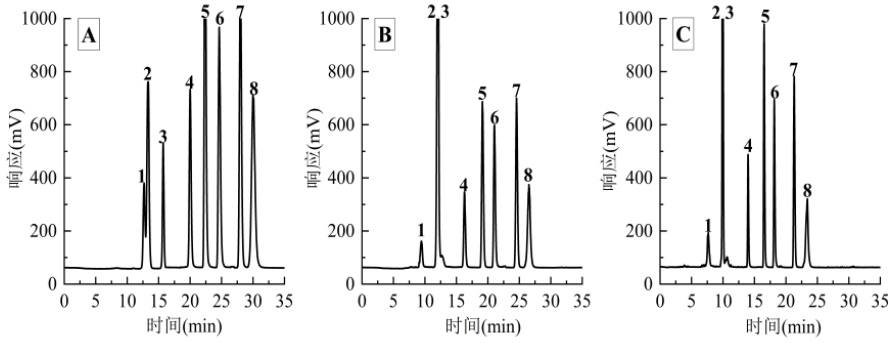

图 2 流动相不同流量条件下标准混合液的 SFC-ELSD 色谱图

Fig.2 SFC-ELSD chromatograms of a standard mixture at different mobile phase flow rates

注：A.0.5 mL min；B.0.75 mL min；C.1.0 mL min。1-8 数字代表：1：TG.甘油三酯，2：DG.甘油二酯，3：MG.甘油一酯，4：MGDG.单半乳糖酰甘油二酯，5：PC.磷脂酰胆碱，6：PE.磷脂酰乙醇胺，7：DGDG.双半乳糖甘油二酯，8：PI.磷脂酰肌醇。

流量是影响 SFC 分析时长、峰形及分离效果的关键参数。为优化分析效率，该研究考察了不同流量条件下的色谱行为。受柱压限制，实验设定的最大流量为 1.0 mL min^{-1}。如图 2 所示，随着流量提高，各脂质组分的色谱峰变窄，分析时间明显缩短（由约 31.72 min 缩短至 27.59、24.25 min）。然而，甘油酯极性较低且结构相似，保

留时间较短，分离度随流量增加而下降，甚至部分甘油酯无法有效分离（表 2）。与 Harald 等[22]的研究结果类似，中性脂质的保留率较低，甚至随着流量的增加进一步降低。此外，所有脂质组分的响应强度亦随流量升高而降低。综合考虑所有脂质的分离度、峰形及响应强度，最终选择 0.5 mL min^{-1} 作为最佳流量，以确保脂质组分的高效分离和准确检测。

表 2 不同流动相流量条件下 8 种脂质的分离度

Table 2 Separation efficiency of eight lipids under different mobile phase flow rates

流/(mL min^{-1})	TG	DG	MG	MGDG	PC	PE	DGDG	PI
0.5	/	0.74	2.73	4.50	2.12	1.67	2.79	1.52
0.75	/	1.89	/	3.18	3.13	2.00	3.67	1.63
1.0	/	2.08	/	3.84	4.10	2.34	4.33	2.08

注：TG：甘油三酯，DG：甘油二酯，MG：甘油一酯，MGDG：单半乳糖酰甘油二酯，PC：磷脂酰胆碱，PE：磷脂酰乙醇胺，DGDG：双半乳糖甘油二酯，PI：磷脂酰肌醇。

2.1.3 柱温优化

表 3 不同柱温条件下 8 种脂质的分离度

Table 3 Separation efficiency of eight lipids under different column temperature conditions

柱温/℃	TG	DG	MG	MGDG	PC	PE	DGDG	PI
25	/	/	1.64	3.82	3.40	1.03	2.03	1.31
30	/	0.64	2.47	3.98	3.76	1.30	2.37	1.38
35	/	0.76	2.87	4.27	4.28	1.49	2.49	1.52
40	/	0.73	2.97	5.37	5.35	1.67	2.51	1.59

注：TG：甘油三酯，DG：甘油二酯，MG：甘油一酯，MGDG：单半乳糖酰甘油二酯，PC：磷脂酰胆碱，PE：磷脂酰乙醇胺，DGDG：双半乳糖甘油二酯，PI：磷脂酰肌醇。

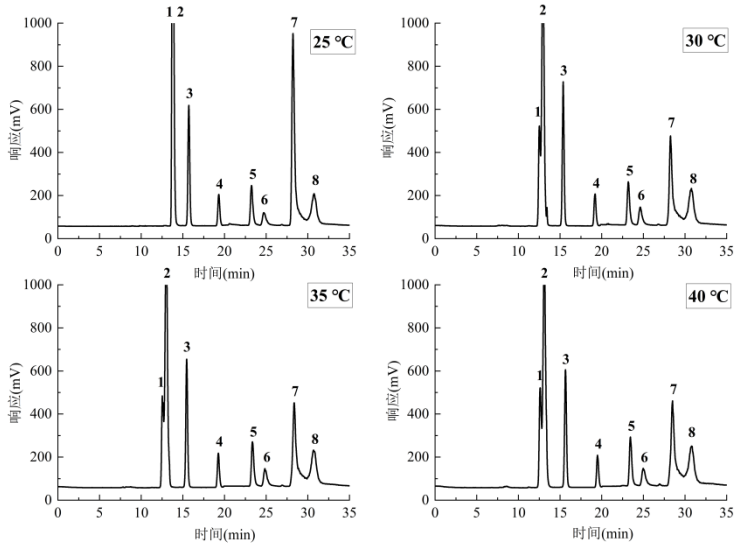

图 3 不同柱温条件下标准混合液的 SFC-ELSD 色谱图

Fig.3 SFC-ELSD chromatograms of a standard mixture at different column temperature conditions

注：1-8 数字代表：1：TG.甘油三酯，2：DG.甘油二酯，3：MG.甘油一酯，4：MGDG.单半乳糖酰甘油二酯，5：PC.磷脂酰胆碱，6：PE.磷脂酰乙醇胺，7：DGDG.双半乳糖甘油二酯，8：PI.磷脂酰肌醇。

不同柱温会影响化合物在色谱柱上保留的强弱，从而影响化合物的分离效果[23]。根据表 3 所示，随着柱温的升高，8 种功能脂质组分的分离度呈现提高的趋势，有利于不同脂质组分的分离鉴定，这一现象可能是由于温度升高导致 sCO_2 及流动相黏度降低，改变了流动相对不同脂质组分的选择性，从而影响脂质的分离效果。此外，图 3 显示，柱温升高会导致脂质响应值呈现轻微下降趋势。相比较响应值略下降的影响，分离度对这 8 种功能脂

质分离测定的影响程度更明显。因此基于对分离度、峰形特征及检测灵敏度的综合评估，该研究最终确定 40 ℃为最优柱温条件。此时，在保证良好分离效果的同时，兼顾了检测灵敏度要求。

2.2 方法学验证

2.2.1 标准曲线及精密度

按照确定的最佳色谱条件，将配制好的标准溶液进行检测。微藻不同功能脂质含量差别大，在一次进样检测中为使更多功能脂质均落在线性范围内，用二次函数拟合标准曲线。即以峰面积（Y）及样品质量浓度（X）作标准曲线，线性关系及检出限结果见表 4。在标准工作溶液浓度为 0.005 mg mL^{-1} 时，S/N＜10，不满足 LOQ 的要求，当标准工作溶液浓度较高时，例如 5 mg mL^{-1}，拟合曲线的 R^2＜0.99，拟合效果不佳。经标准曲线拟合，8 种脂质化合物在 0.01~1.0 mg mL^{-1} 质量浓度范围拟合效果良好，相关系数（R^2）均在 0.990 2 以上，LOD≤0.74 μg mL^{-1}，LOQ≤2.26 μg mL^{-1}，即该方法具有较低的检出限。精密度在 0.58%~1.19%之间，方法的稳定性可以满足试验的要求。

表 4 各脂质标准品的回归方程、检出限、定量限及精密度结果

Table 4 Regressing equation, detection limit, quantification limit and precision of lipid standards

脂质	线性范围/(mg mL^{-1})	回归方程	相关系数(R^2)	LOD/(μg mL^{-1})	LOQ/(μg mL^{-1})	RSD/%
TG	0.01~2.5	y=-5 558.7x^2+30 828x-658.25	0.995 8	0.15	0.47	0.98
DG	0.01~2.5	y=-5 344.08x^2+29 689x-536.4	0.990 2	0.16	0.49	0.68
MG	0.01~2.5	y=-9 994.9x^2+42 449x-519.69	0.998 2	0.11	0.34	1.13
MGDG	0.01~1.0	y=7 369.8x^2+26 326x-872.41	0.997 1	0.18	0.55	0.58
PC	0.01~2.5	y=2 336.4x^2+8 947.4x-569.1	0.997 4	0.53	1.62	0.63
PE	0.01~5.0	y=856.83x^2+6 853.7x-612.57	0.998 2	0.70	2.11	1.16
DGDG	0.01~5.0	y=-1 684.5x^2+18 432x-1 313.5	0.995 7	0.26	0.78	0.91
PI	0.01~2.5	y=7 884.5x^2+6 402.8x-151.1	0.999 5	0.74	2.26	1.19

注：TG：甘油三酯，DG：甘油二酯，MG：甘油一酯，MGDG：单半乳糖酰甘油二酯，PC：磷脂酰胆碱，PE：磷脂酰乙醇胺，DGDG：双半乳糖甘油二酯，PI：磷脂酰肌醇。

2.2.2 加标回收率

按照 1.2.2 优化后最佳的色谱条件，计算得加标平均回收率在 92.12%~105.78%之间，RSD 值＜1.92%，有较好的准确度。

2.3 样品检测

按照最佳色谱条件，对常见 6 种微藻的功能脂质成功进行测定。由图 4 可知，通过 SFC-ELSD 在 35 min 内成功有效分离检测了 6 种微藻的 8 种功能脂质，且功能脂质含量存在较为明显的差异。如表 5 所示，不同微藻样品中，小球藻的甘油糖脂含量（约 39.90 mg g^{-1}）最高，且 MGDG 和 DGDG 含量相近。Cao 等[21]基于气相色谱测定的小球藻脂肪酸组成数据显示，小球藻的 ω-3 型 PUFAs 占总脂肪酸组成的 20.12%，可以作为 ω-3 型 PUFAs 的有效膳食补充来源。而拟微球藻含有最高含量的甘油酯（约 57.91 mg g^{-1}）及极性脂质（约 62.30 mg g^{-1}），其中甘油糖脂约 32.76 mg g^{-1}，以 MGDG（约 29.83 mg g^{-1}）为主、磷脂约 29.54 mg g^{-1}，并以 PC（11.30 mg g^{-1}）与 PI（11.12 mg g^{-1}）为主。Daniela 等[3]通过比色法测得拟微球藻的极性脂含量约为藻粉的 8.8%，其中甘油糖脂（占藻粉 6.1%），磷脂（占藻粉 2.7%），但其方法用微藻等本身具有颜色的样本中误差很大，接着用气相色谱质谱联用技术测定的拟微球藻脂肪酸组成结果显示，ω-3 型 PUFAs 占总脂肪酸组成的 28.9%，是 ω-3 型 PUFAs 的有效膳食补充来源。Meng 等[24]基于超高效液相色谱与三重四极杆串联离子阱质谱联用技术进行了拟微球藻氮胁迫条件下甘油酯、甘油糖脂、磷脂的含量变化分析，发现正常培养时 MGDG 和 PC 含量分别约 27.55、9.48 mg g^{-1}，脂质含量可能由微藻培养条件、藻种、季节及提脂方式的不同产生波动，这也凸显了对每批次样本的快速脂质检测的重要性，相较本研究建立的方法，其检测成本高，正负离子模式检测耗时长，数据分析困难且繁琐。此外，盐藻主要以甘油酯（约 27.62 mg g^{-1}）为主，几乎不含甘油糖脂（约 4.97 mg g^{-1}）与磷脂（约 6.14 mg g^{-1}），这与 Rita 等[25]的研究结果相近。螺旋藻和莱茵衣藻的极性脂质主要以 MGDG 为主（分别约 18.52、15.25 mg g^{-1}），而 Cao

等[21]基于反相液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱的结果显示螺旋藻的极性脂质也以 MGDG（36.76 mg g^{-1}）为主，含量差异可能受购买季节及培养方式等的影响。裸藻的脂质含量很低，主要以甘油酯（10.55 mg g^{-1}）为主。综上所述，小球藻和拟微球藻可作为 ω-3 型 PUFAs 的甘油糖脂及磷脂的微藻原料，盐藻、裸藻、螺旋藻和莱茵衣藻作为非产油微藻，脂质含量较低，并不适合作为微藻功能脂质相关原料。

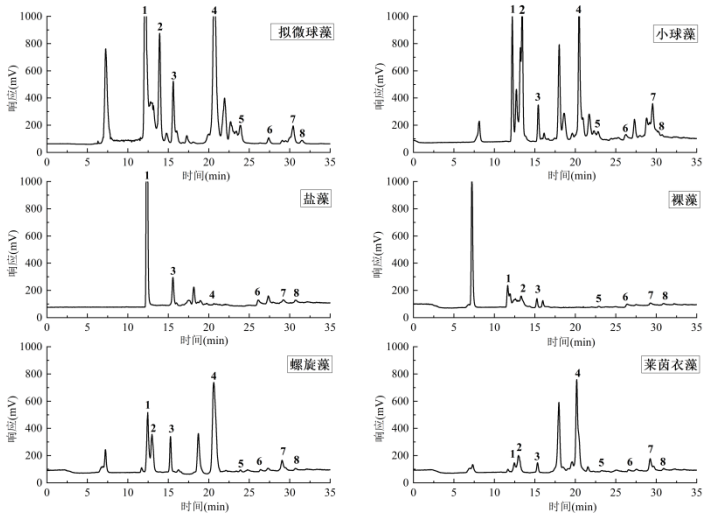

图 4 不同微藻样品的 SFC-ELSD 色谱图

Fig.4 SFC-ELSD chromatograms of different microalgae samples

注：1-8 数字代表：1：TG 甘油三酯，2：DG.甘油二酯，3：MG.甘油一酯，4：MGDG.单半乳糖酰甘油二酯，5：PC.磷脂酰胆碱，6：PE.磷脂酰乙醇胺，7：DGDG.双半乳糖甘油二酯，8：PI.磷脂酰肌醇。

表 5 不同微藻的功能脂质组成及含量（mg·g^{-1}微藻粉）

Table 5 Lipid composition and content in diverse microalgal species (mg g^{-1} microalgae powder)

脂质	拟微球藻	小球藻	盐藻	裸藻	螺旋藻	莱茵衣藻
TG	40.22±0.29	37.79±0.36	24.79±0.21	6.19±0.34	9.04±0.13	3.27±0.07
DG	11.89±0.56	12.37±0.47	/	3.31±0.24	6.53±0.15	1.87±0.19
MG	5.80±0.15	2.92±0.11	2.83±0.16	1.05±0.15	2.91±0.13	1.18±0.14
PC	11.30±0.17	8.85±0.17	/	2.33±0.14	2.66±0.10	3.15±0.11
PE	7.12±0.09	6.81±0.17	3.12±0.18	2.99±0.27	4.26±0.07	5.07±0.17
PI	11.12±0.22	3.74±0.35	3.02±0.09	2.78±0.10	1.90±0.12	1.83±0.06
MGDG	29.83±0.28	20.22±0.27	1.44±0.12	/	18.52±0.09	15.25±0.18
DGDG	2.92±0.11	19.67±0.36	3.53±0.18	2.76±0.13	5.67±0.12	6.02±0.15

注：TG：甘油三酯，DG：甘油二酯，MG：甘油一酯，PC：磷脂酰胆碱，PE：磷脂酰乙醇胺，PI：磷脂酰肌醇，MGDG：单半乳糖酰甘油二酯，DGDG：双半乳糖甘油二酯，/：未检测到。

目前 SFC-ELSD 主要应用于基础研究及手性分析领域，例如：低聚物分子量分布表征[26]、药物成分分析[27]、脂肪酸定量测定[28]、氨基酸对映异构体分离[29]以及增塑剂检测[30]等，然而，在脂质分析方面，现有方法开发相对有限，尚未建立成熟适用的检测方案，而该研究建立的 SFC-ELSD 方法经过方法学验证及样品检测分析后，被认为能够满足微藻中主要功能脂质的组分分析及含量预测的要求，具有可靠性，且数据分析相较常用的液相色谱-质谱联用技术简单省时，有效填补了该技术在该领域的应用空白，为脂质的高灵敏度检测提供了可靠解决方案。

3 结论

该研究建立了一种基于超临界流体色谱-蒸发光散射检测的绿色高效分析方法，用于同时定量检测微藻中的 8 种功能脂质（TG、DG、MG、PC、PE、PI、MGDG、DGDG）。该方法有机溶剂消耗量极低（仅 12.28 mL 甲醇/样品），在 0.01~1.0 mg mL^{-1} 范围内线性关系良好（R^2≥0.990 2），检出限≤0.74 μg·mL^{-1}，定量限≤1.19 μg mL^{-1}，

精密度 RSD≤1.19%，加标回收率在 92.12%~105.78%之间，具有灵敏度高、经济成本低、稳定性良好、绿色环保、数据处理简单等优点，能够满足定量分析的要求。该方法可为微藻功能脂质的营养价值研究、产品开发及副产物综合利用提供可靠的分析工具，此外，也可拓展应用于其他食品脂质的定量检测。但未来需结合标准品进一步鉴定微藻样品中的未知色谱峰，以完善脂质组成分析。

参考文献

[1] WANG H T, YANG L, WANG X, et al. Comprehensive lipidomic analysis of three edible brown seaweeds based on reversed-phase liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(13): 4138-4151.

[2] 刘耘珲,周真真,陈林,等.高效液相色谱法检测微拟球藻中磷脂类化合物含量[J].科技创新与应用,2023,13(26):31-34.

[3] DANIELA C, TIAGO A. C, TÂNIA M, et al. Effects of outdoor and indoor cultivation on the polar lipid composition and antioxidant activity of *Nannochloropsis oceanica* and *Nannochloropsis limnetica:* A lipidomics perspective [J]. Algal Research, 2022, 64: 102718.

[4] MUHAMMAD R A, SUTAPA B. Isolation and purification of glycoglycerolipids to induce apoptosis in breast cancer cells [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 1298.

[5] KATIE S, ALEXANDROS T, RONAN L, et al. Bioactive lipids of marine microalga chlorococcum sp. Sabc 012504 with anti-inflammatory and anti-thrombotic activities [J]. Marine Drugs. 2021, 19(1): 28.

[6] SUPANSA P, PAKAMAS C, SININART C. Assessment of water degumming and acid degumming of mixed algal oil [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2017, 5(5): 5115-5123.

[7] 房爱萍,陈偲,韩军花,等.婴幼儿配方食品中添加长链多不饱和脂肪酸的健康效益:系统综述[J].营养学报,2018,40(6):531-543.

[8] SIDDHANT D, CHIU-WEN C, ANIL K P, et al. Development in health-promoting essential polyunsaturated fatty acids production by microalgae: a review [J]. Journal of Food Science and Technology, 2024, 61(5): 847-860.

[9] LI X X, BI X Y, WANG S, et al. Therapeutic potential of *ω*-3 polyunsaturated fatty acids in human autoimmune diseases [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 2241.

[10] SANTIAGO B, MARÍA E S, MARÍA R S, et al. Effects of dietary omega-3 PUFAs on growth and development: Somatic, neurobiological and reproductive functions in a murine model [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2018, 61: 82-90.

[11] HARI K K, PHILIP D B. Normal phase Hplc method for combined separation of both polar and neutral lipid classes with application to lipid metabolic flux [J]. Journal of Chromatography B, 2020, 1145: 122099.

[12] SARA M, IMOGEN F, JAN A D. Normal-phase HPLC-ELSD to compare lipid profiles of different wheat flours [J]. Foods, 2021, 10(2): 428.

[13] SONG Y, WANG H T, WANG X C, et al. Comparative lipidomics study of four edible red seaweeds based on RPLC-Q-TOF [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(4): 2183-2196.

[14] YANG Y X, BIAN M M, LIU Y Q, et al. Lipidomics analysis of the lipid composition of three tissues of *Cyperus esculentus* L. during three growth stages based on ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food Science, 2025, 46(3): 146-161.

[15] KATEŘINA P, VERONIKA P, ŠTEFAN K, et al. Ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography-multimodal ionization-tandem mass spectrometry as a universal tool for the analysis of small molecules in complex plant extracts [J]. Analytical Chemistry, 2024, 96(7): 2840-2848.

[16] A C, T H, E E, et al. Expanding the chemical coverage of polar compounds in water analysis by coupling supercritical fluid with hydrophilic interaction chromatography high-resolution mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2025, 1341: 343672.

[17] MATHIEU V, MATHIEU C, ANNE-C C. Development and validation of a novel UPLC-ELSD method for the assessment of lipid composition of nanomedicine formulation [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2019, 566: 11-23.

[18] ERIC L, ANNA L, CAROLINE W. Ultra high efficiency/low pressure supercritical fluid chromatography (UHE/LP-SFC) for triglyceride analysis: Identification, quantification, and classification of vegetable oils [J]. Analytical Science Advances, 2021, 2(1-2): 33-42.

[19] MICHEL L, CLAIRE E, LUC M-A, et al. The advantages of evaporative light scattering detection in pharmaceutical analysis by high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography [J]. Journal of High Resolution Chromatography, 1992, 15(5): 312-318.

[20] OLEKSANDR K, ELIŠKA H, EVA C, et al. Comprehensive single-platform lipidomic/metabolomic analysis using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2024, 96(3): 1320-1327.

[21] CAO X Y, CONG P X, SONG Y, et al. Comprehensive lipidomic analysis of three edible microalgae species based on RPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(30): 17072-1708.

[22] HARALD S, EVELYN R, GERRIT H, et al. Preparative supercritical fluid chromatography for lipid class fractionation—a novel strategy in high-resolution mass spectrometry based lipidomics [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412: 2365-2374.

[23] 李榕,朱斌,耿昭,等.高效液相色谱同时检测补肾壮阳类保健品及中成药中非法添加的 14 种化学药物[J].现代食品科技,2025,41(1):320-330.

[24] MENG Y Y, CAO X P, YAO C H. Identification of the role of polar glycerolipids in lipid metabolism and their acyl attribution for tag accumulation in *Nannochloropsis oceanica* [J]. Algal Research, 2017, 24: 122-129.

[25] RITA P, TIAGO C, BRUNA B N, et al. Bioactive lipids in *Dunaliella salina*: implications for functional foods and health [J]. Foods, 2024, 13(20): 3321.

[26] JUSTIN M S, MEHDI A-K, NICHOLAS G M, et al. Supercritical fluid chromatography with evaporative light scattering detection (SFC-ELSD) for determination of oligomer molecular weight distributions [J]. Chromatographia, 2016, 79(15-16): 977-984.

[27] PAULINE B, CATHERINE F, MARIE L. Determination of the stoichiometry between a drug and its counter-ion by supercritical fluid chromatography using ultra-violet and evaporative light scattering detections: Application to ondansetron hydrochloride [J]. Talanta, 2020, 218: 121166.

[28] WANG Z Y, SHI H W, MA C Y, et al. Determination of fatty acid composition after saponification of common oil pharmaceutical excipients by supercritical fluid-evaporative light scattering method and its application in oil identification [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(6): 581-589.

[29] EMMANUELLE L, ANCA-E D, YASMINE M, et al. Separation of enantiomers of native amino acids with polysaccharide-based chiral columns in supercritical fluid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2019, 1585: 207-212.

[30] MARIE L, BERTRAND D, YOANN G, et al. Comparison of high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography using evaporative light scattering detection for the determination of plasticizers in medical devices [J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1417: 104-115.