

气相色谱法测定水产品中蜡酯

郭嘉, 曹立民, 韩香凝, 刘畅, 林洪*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

摘要: 目的 建立一种气相色谱法检测水产品中蜡酯组成和含量的分析方法。**方法** 采用氯仿-甲醇提取, 硅胶固相萃取柱净化, 正己烷-乙醚洗脱, 得到待测样本。采用气相色谱和气相色谱-质谱法分析几种含有蜡酯的典型水产品中蜡酯的具体组成, 选取了 C₃₀、C₃₂、C₃₄、C₃₆、C₃₈ 蜡酯作为检测目标物, 使用气相色谱进行检测, 内标法定量。**结果** 对于含有蜡酯的典型水产品, 以肉豆蔻酸月桂醇酯(C₂₆ 酯)为内标物进行定量。该方法的峰形良好, 检出限为 0.6 µg/mL, 定量限为 2.0 µg/mL, 线性方程 r^2 为 0.9995~0.9999, 精密度的实验得到的相对标准偏差均小于 5%, 阳性样本中加标回收率为 95.29%~103.91%, 阴性样本中加标回收率为 86.52%~105.98%。**结论** 本方法可以实现水产品蜡酯成分的有效检测, 为市场监管、风险评估等工作提供技术支持。

关键词: 水产品; 蜡酯; 气相色谱法; 固相萃取

Determination of wax esters in seafoods by gas chromatography

GUO Jia, CAO Li-Min, HAN Xiang-Ning, LIU Chang, LIN Hong*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for detecting the composition and content of wax esters in seafoods by gas chromatography. **Methods** The samples were extracted with chloroform-methanol, purified by silica gel solid-phase extraction column, and eluted with *n*-hexane-ether to obtain the samples to be tested. The specific compositions of wax esters in several typical seafoods containing wax esters were analyzed by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. C₃₀, C₃₂, C₃₄, C₃₆ and C₃₈ wax esters were selected as the detection targets, which were detected by gas chromatography with internal standard method for quantification. **Results** For typical seafoods containing wax esters, lauryl myristate (C₂₆ ester) was used as the internal standard for quantification. The peak shapes of this method were good, the limits of detection were 0.6 µg/mL, the limits of quantification were 2.0 µg/mL, and the r^2 of linear equation were between 0.9995–0.9999. The relative standard deviations of precision experiments were all less than 5%, the recoveries of spiked samples in positive samples were 95.29%–103.91% and those in negative samples were 86.52%–105.98%. **Conclusion** This method can realize the effective detection of wax esters in seafoods, and provide technical support for market supervision and risk assessment.

KEY WORDS: seafood; wax ester; gas chromatography; solid-phase extraction

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0901704)、国家海水鱼产业技术体系项目(CARS-47)

Fund: Supported by the National Research and Development Program of China (2019YFD0901704), and the Modern Agricultural Industry Technology System of China (CARS-47)

*通信作者: 林洪, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: lnhong@ouc.edu.cn

*Corresponding author: LIN Hong, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, No.5, Yushan Road, Shinan District, Qingdao 266003, China. E-mail: lnhong@ouc.edu.cn

0 引 言

蜡酯是长链脂肪酸和长链脂肪醇组成的酯^[1](图 1), 属中性脂, 具有低极性和高疏水性^[2]的特点。某些海洋生物, 特别是深海生物含有这些特殊脂质^[3]。蜡酯除了在肌肉和内脏器官中作为储存能量功能外, 还可以提供浮力, 使鱼在深水中保持垂直静止而不消耗多余的能量^[4]。然而, 人类和大多数哺乳动物对于蜡酯消化能力有限, 尽管有报道证明食用少量蜡酯具有一定的抗炎、抗肥胖的功效^[5-7], 但若一次性摄入过多蜡酯, 不但不会得到有效的能量和营养补充, 反而还会引起胃痉挛、油性腹泻等不适状况^[8], 甚至可能引发脂溢性脱发和皮肤损伤等症状。富含蜡酯的海洋鱼类以异鳞蛇鲭^[9]、棘鳞蛇鲭^[3]两种俗称“油鱼”最为常见, 胸棘鲷^[10]等也有报道。在美国食品药品监督管理局出台的《鱼类和水产品危害控制指南》^[11]中, 将鱼体内的蜡酯称为“蛇鲭毒素”。“油鱼”鱼块与鳕科鱼类的鱼块在外观与颜色上相似, 消费者难以区分, 因此存在有用低价值“油鱼”冒充高价值鳕鱼的情况^[12], 这不仅使消费者权益受损, 而且还具有食品安全风险, 在国内外发生过多起消费者误食后发生腹泻的事件^[13-15], 造成了社会层面的恐慌。针对这些冒充的水产品, 我国现阶段的检测判定方法是通过检测 DNA 来实现物种鉴别, 并在此基础上建立了多种检测方法^[12,16-20], 至今并未对引发这一食品安全事件的危害物——蜡酯进行深入研究。对于蜡酯的食品毒理学性质, 目前研究不多, 只是以“油鱼”鱼肉为原料, 在大鼠、猫等动物身上进行了实验^[21], 观察到实验动物食用后出现腹泻状况, 甚至出现了大鼠过量食用后腹泻致死的案例。而对于人体来说, 根据少量已有案例记载, 食用约 260 g 以上的“油鱼”肉后几乎都可导致腹泻, 食用 140~260 g 的消费者也有一部分出现了腹泻症状^[21]。但是, 目前国内外均未出台关于食物中蜡酯的安全限量指导值。

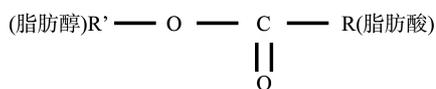


图 1 蜡酯的分子结构通式

Fig.1 General formula for the molecular structure of wax esters

目前, 和海洋蜡酯有关的研究主要集中在对于脂质组成分析方面, 包括用气相色谱法(gas chromatography, GC)、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)等技术探究鱼类的蜡酯组成^[3,9-10], 从而将含有蜡酯的鱼类从其他的鱼类中区分出来^[13]。但是, 在已有研究中, 都没有涉及到水产品中蜡酯的定量检测, 仅有薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)这种半定量的研究^[9,22], 不能满足精确定量分析的需求。目前, 国内外对于蜡酯的定量检测研究主要集中在橄榄油, 因为橄榄

油中蜡的含量是区分橄榄油等级的一个重要依据^[23-25]。因此, 国际橄榄油理事会早已制订了相关的气相色谱法国际标准, 我国也据此出台了 GB/T 22501—2008《动植物油脂橄榄油中蜡含量的测定 气相色谱法》。有一些国家和地区对已知含有大量蜡酯的鱼类产品出台了限制规定^[21,26], 但缺少检测方法。只有建立起有效的检测方法, 才能开展危害识别、暴露评估、限量标准的研究。前文提到的橄榄油 GB/T 22501—2008 主要针对的是 C₄₀~C₄₆ 的蜡酯, 不适用于水产品中 C₃₈ 以下蜡酯的测定^[11]; 且水产品样品基质复杂, 需建立专门的脂质提取、净化等方法。

针对目前水产品中蜡酯含量检测方法缺乏的问题, 本研究将在对典型水产品进行蜡酯组成分析后, 建立起一种高效、准确并易于操作的蜡酯定量测定方法, 并对其进行适用性探究, 以满足现阶段易混鱼种掺假鉴别、危害评估的需要, 提供有力的市场监管手段, 保障消费者权益, 促进水产行业健康发展。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

异鳞蛇鲭、棘鳞蛇鲭由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供; 远海梭子蟹、七星底灯鱼由中国水产科学研究院南海水产研究所提供; 太平洋真鳕由青岛龙和食品有限公司提供; 黄线狭鳕由荣成海龙王水产食品有限公司提供; 鮫鰵、胸棘鲷、裸盖鱼、牙鲆、大菱鲆、大西洋真鳕、大西洋鲑、阿根廷鱿鱼、乌鱼子(鲷鱼卵巢)、贻贝、栉孔扇贝、凡纳滨对虾均购自青岛营口路海鲜市场; -18℃冷冻存放。

氯仿、甲醇、乙醚、氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 正己烷(色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 苏丹 I (1-苯基偶氮苯-2-萘酚, 美国 Sigma 公司); 肉豆蔻酸月桂醇酯(C₂₆ 蜡酯)、C₃₀、C₃₂、C₃₄、C₃₆、C₃₈ 蜡酯标准品(纯度大于 99%, 上海甄准生物科技有限公司); Supelclean™ LC-Si 正相硅胶固相萃取小柱(1 g/6 mL, 美国 Supelco 公司)。

1.2 仪器与设备

Agilent 6890 气相色谱仪(配有火焰离子化检测器)、Agilent 8890-7000D 气相色谱三重四极杆质谱联用仪、HP-5 毛细管色谱柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm)(美国安捷伦公司); BSA 224S 电子天平(精度 0.001 g, 德国赛多利斯科学仪器有限公司); JJ-2B 组织捣碎机(常州方科仪器有限公司); SCIENTZ-11 无菌均质机(宁波新芝生物科技股份有限公司); N-20 氮吹仪(山东桑泽仪器仪表有限公司); Hei-VAP Advantage 旋转蒸发仪(德国海道夫公司); Mini shaker 涡旋震荡仪(广州仪科实验室技术有限公司); CF1524R 高速冷冻型微量离心机(美国赛洛捷克公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

内标物氯仿储备溶液: 准确称取内标物肉豆蔻酸月桂醇酯(C₂₆酯)100 mg, 氯仿稀释至刻度 50.0 mL, 配制成质量浓度为 2 mg/mL 内标物氯仿储备溶液。-18°C保存, 有效期 12 个月。

内标物正己烷储备溶液: 准确称取内标物肉豆蔻酸月桂醇酯(C₂₆酯)100 mg, 用正己烷稀释至刻度 50.0 mL, 配制成质量浓度为 2 mg/mL 的内标物正己烷储备溶液。-18°C保存, 有效期 12 个月。

混合标准储备溶液: 分别准确称取 C₃₀、C₃₂、C₃₄、C₃₆、C₃₈ 蜡酯标准品 20 mg, 用正己烷溶解并定容至 10.0 mL, 配制成质量浓度 2 mg/mL 的混合标准储备溶液。-18°C保存, 有效期 12 个月。

1%苏丹I染液: 准确称取苏丹I染料 100 mg, 用正己烷/乙醚混合液(99:1, V:V)定容至 10.0 mL, 配制成质量浓度为 10 mg/mL 染液。室温保存, 有效期 6 个月。

1.3.2 脂质提取

水产品原料用组织捣碎机捣碎并匀浆, 称取 0.1 g(精确至±1 mg)试样于具塞离心管中, 加入 1 mL 的 2 mg/mL 肉豆蔻酸月桂醇酯氯仿溶液、0.4 mL 氯仿和 0.7 mL 甲醇, 涡旋混匀, 超声波提取 30 min, 6000 r/min 离心 5 min。吸取上清液至另一离心管中, 下层加入 1.4 mL 氯仿和 0.7 mL 甲醇^[27]重复提取, 合并上清液, 加入 0.84 mL 饱和氯化钠溶液, 涡旋混匀, 6000 r/min 离心 5 min, 吸取下层有机相至另一离心管中, 上层水相中加入 2.8 mL 氯仿重复萃取并吸取下层有机相, 合并有机相, 氮气吹干, 得到脂质。

1.3.3 蜡酯成分净化

硅胶固相萃取柱^[28]预先用 6 mL 正己烷活化。用 2 mL 正己烷分 2 次充分溶解脂质, 转移至固相萃取柱中, 再加入 20 μL 1%的苏丹I染液。使用正己烷/乙醚混合液(99:1, V:V)淋洗, 至肉眼观察到硅胶固相萃取柱中橙红色已全部褪去时, 表明蜡酯已洗脱完全。收集全部流出液, 45°C水浴真空旋转蒸发除去溶剂。取 10 mL 正己烷溶解剩余的脂质, 供气相色谱测定。

1.4 分析条件

1.4.1 GC 条件

HP-5 毛细管色谱柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm); 程序升温: 起始柱温 80°C, 保持 2 min, 以 20°C/min 升至 260°C, 以 5°C/min 升至 320°C, 保持 10 min; 高纯氮气, 流速 1 mL/min; 进样口温度 350°C; 进样量: 1.0 μL, 不分流进样; 火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID), 温度 350°C。

1.4.2 GC-MS 条件

GC 条件: 同 1.4.1;

MS 条件: 电子轰击源(electron impact, EI), 离子源温

度 230°C, 电子能量 70 eV, 传输线温度 280°C, 分流比 10:1, 溶剂延迟 3 min, 质量范围(*m/z*): 50~1000。

1.5 蜡酯含量计算

通过积分测定相应的内标物及 C₃₀、C₃₂、C₃₄、C₃₆、C₃₈(以下简称 C₃₀~C₃₈)脂肪族蜡酯的峰面积。

按公式(1)计算试样中的蜡酯含量:

$$X = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \quad (1)$$

式(1)中: *X*——蜡酯的含量, mg/g; *A_x*——蜡酯的峰面积, mm²; *m_s*——加入的内标物的质量, mg; *A_s*——内标物的峰面积, mm²; *m*——测试样品的质量, g。结果为 C₃₀~C₃₈ 的蜡酯含量的总和, mg/g; 结果保留至小数点后两位。

1.6 数据处理

通过 GraphPad Prism 8、Microsoft Excel 2007 软件进行数据处理与绘图。

2 结果与分析

2.1 蜡酯组成分析

针对报道^[11]含有大量蜡酯的异鳞蛇鲭、棘鳞蛇鲭、胸棘鲷 3 种鱼类以及乌鱼子^[29], 按照 1.3.2 和 1.3.3 得到其含有的蜡酯组分后, 分别采用 GC、GC-MS 进行检测。

GC 检测得到的气相色谱图见图 2。采用外标定性和文献谱图对照的方法, 将气相色谱图中各个峰的保留时间与同等 GC 条件下已知的蜡酯混合标准品(图 3)的保留时间进行比较, 对 4 种水产品的的气相色谱峰进行鉴定。结果表明, 相同碳数和饱和程度的多种不同脂肪酸—脂肪醇组合而成的蜡酯都会被包含在同一个蜡酯峰内^[28], 且对于相同碳数的蜡酯而言, 不饱和度越高, 出峰时间就越早, 也与橄榄油中蜡酯的出峰规律相吻合^[30]。经过分析, 异鳞蛇鲭、棘鳞蛇鲭、胸棘鲷中主要的蜡酯特征色谱峰均为 C₃₂、C₃₄、C₃₆、C₃₈ 4 类碳数的蜡酯, 这与已有报道一致^[3,9,11]。相比较而言, 在乌鱼子中除以上 4 种碳数的蜡酯外, 还出现了 C₃₀ 蜡酯。经过 GC-MS 的进一步验证和分析, 并通过特征离子查找和 NIST 谱库检索, 对这 4 种水产品中蜡酯成分的具体组成进行了进一步研究(表 1), 也验证了 GC 分析的结论。通过峰面积归一化分析, 在气相色谱图中, 异鳞蛇鲭、棘鳞蛇鲭、胸棘鲷、乌鱼子的 C₃₀~C₃₈ 蜡酯都占有蜡酯峰的约 90%以上。通过检测 C₃₀~C₃₈ 蜡酯, 可以据此计算水产品样本中总蜡酯的含量。因此, 本方法选定 C₃₀、C₃₂、C₃₄、C₃₆、C₃₈ 5 种碳数的蜡酯作为目标物作为定量依据。值得注意的是, GC-MS 虽然证明异鳞蛇鲭、棘鳞蛇鲭中含有 C₃₀ 蜡酯, 但因其含量太低, 未能达到检出限要求, 故在定量时按 0 来计算。

表 1 4 种水产品中 C₃₀~C₃₈ 蜡酯组成成分 GC-MS 鉴定结果
Table 1 GC-MS identification of C₃₀~C₃₈ wax esters in 4 kinds of seafoods

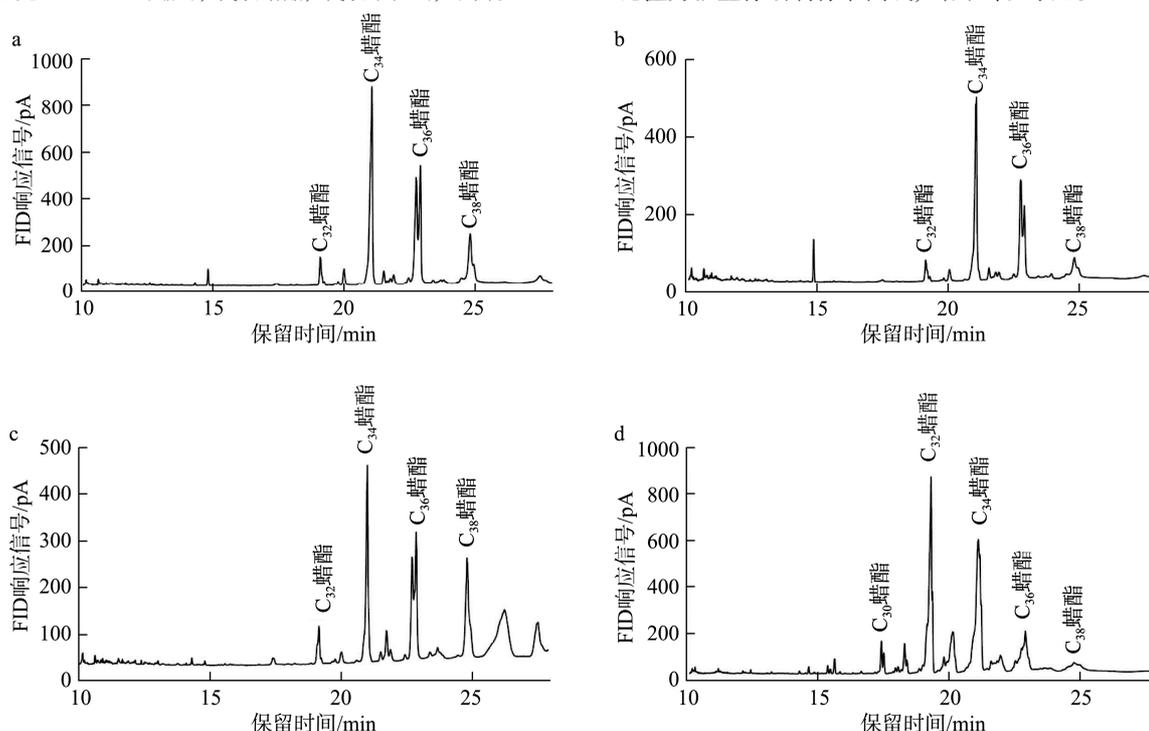
水产品	蜡酯种类(碳链长度:双键数)				
	C ₃₀	C ₃₂	C ₃₄	C ₃₆	C ₃₈
异鳞蛇鲭	WE30:0	WE32:0	WE34:1	WE36:1	WE38:1
	WE30:1	WE32:1	WE34:2	WE36:2	WE38:2
棘鳞蛇鲭	WE30:0	WE32:0	WE34:0	WE36:1	WE38:1
	WE30:1	WE32:1	WE34:1	WE36:2	WE38:2
胸棘鲷	-	WE32:0	WE34:1	WE36:1	WE38:1
	-	WE32:1	WE34:2	WE36:2	WE38:2
乌鱼子	WE30:0	WE32:0	WE34:0	WE36:1	WE38:1
	WE30:1	WE32:1	WE34:1	WE36:2	WE38:2
	-	WE32:2	WE34:2	WE36:3	-
	-	WE32:3	WE34:3	WE36:3	-

注: WE 是 wax ester 的缩写, 代表蜡酯; -代表未检出, 下同。

2.2 蜡酯含量的测定

2.2.1 方法的线性关系

1.3.1 中的 2 mg/mL C₃₀、C₃₂、C₃₄、C₃₆、C₃₈ 蜡酯混合标准储备溶液用正己烷分别稀释为 0.004、0.040、0.080、0.200、0.400、1.200 mg/mL 系列质量浓度, 并按体积比 1:1 与稀释成 0.400 mg/mL 的内标物肉豆蔻酸月桂醇酯正己烷溶液混合, 配制质量浓度分别为 0.002、0.020、0.040、0.100、0.200、0.600 mg/mL 的标准工作溶液, 加入的内标物质量浓度为 0.200 mg/mL。进样 1.0 μL, 按 1.4.1 中的 GC 条件进行分析。以 C₃₀~C₃₈ 蜡酯的峰面积与内标物峰面积的比值为横坐标, 以 C₃₀~C₃₈ 蜡酯的含量与内标物含量的比值为纵坐标绘制标准曲线, 结果详见表 2。



注: a 为异鳞蛇鲭; b 为棘鳞蛇鲭; c 为胸棘鲷; d 为乌鱼子。

图 2 4 种水产品蜡酯组分的气相色谱图

Fig.2 Gas chromatograms of wax esters of 4 kinds of seafoods

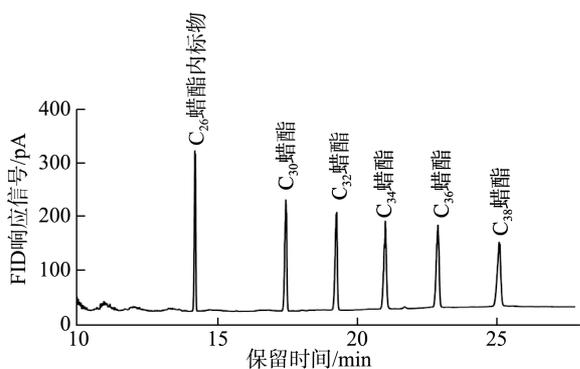


图 3 C₃₀~C₃₈ 蜡酯及肉豆蔻酸月桂醇酯标准品的气相色谱图

Fig.3 Gas chromatogram of C₃₀~C₃₈ wax esters and lauryl myristate standards

表 2 C₃₀~C₃₈ 蜡酯的线性方程、相关系数及保留时间
Table 2 Regression equations, correlation coefficients and retention times of C₃₀~C₃₈ wax esters

目标蜡酯	线性方程	相关系数	保留时间 /min
C ₃₀	$Y=0.9761X+0.0048$	0.9998	17.810
C ₃₂	$Y=1.0176X+0.0026$	0.9999	19.620
C ₃₄	$Y=0.9800X+0.0126$	0.9997	21.385
C ₃₆	$Y=0.9554X+0.0135$	0.9996	23.273
C ₃₈	$Y=0.9658X+0.0062$	0.9995	25.472

从表 2 可以看出, 5 种蜡酯标准品与内标物之间的相关系数(r^2)均大于 0.999, 表明 $C_{30}\sim C_{38}$ 蜡酯在 0.02~0.60 mg/mL 范围内线性关系良好。同时, 通过参照国际橄榄油理事会标准、GB/T 22501—2008 及张蕊等^[31]对于橄榄油中蜡酯含量的检测过程中的先例, 因其加入的花生酸十二烷醇酯内标物与目标物 C_{40} 蜡酯的响应值比近似等于 1, 故在检测时假定 $C_{40}\sim C_{46}$ 蜡酯的校准因子都为 1。在本研究中, $C_{30}\sim C_{38}$ 5 种目标蜡酯标准方程的斜率都接近于 1, 因此在后续检测中也默认校正因子为 1, 从而直接根据目标蜡酯与内标物的峰面积之比来进行定量, 这也符合 FID 对碳数较大的同一类型有机化合物进行检测的原理。

2.2.2 方法的灵敏度

方法的检出限和定量限通常是根据仪器的信噪比外推得到的。以基线噪音的 3 倍信噪比($S/N=3$)所对应的质量浓度作为方法的最低检出限, 以基线噪音的 10 倍($S/N=10$)所对应的质量浓度作为方法的定量限。根据测定结果, 当 $C_{30}\sim C_{38}$ 蜡酯质量浓度为 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 时, 5 种碳数的目标蜡酯信噪比分别为 5.1、5.8、3.8、4.3、3.8, 符合检出限的要求; 当 $C_{30}\sim C_{38}$ 蜡酯质量浓度为 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 5 种碳数的目标蜡酯信噪比分别为 19.8、18.9、13.6、16.3、11.3, 符合定量限的要求。因此, 本方法的检出限定为 0.6 $\mu\text{g/mL}$, 定量限定为 2.0 $\mu\text{g/mL}$, 能够实现对于 $C_{30}\sim C_{38}$ 蜡酯的有效检测。

2.2.3 方法的精密度

在确定的实验条件下, 对棘鳞蛇鲭鱼肉中的 $C_{32}\sim C_{38}$ 蜡酯含量进行重复性测定。取 6 份相同的棘鳞蛇鲭鱼肉样本, 经氯仿-甲醇超声提取、固相萃取净化和气相色谱分析(图 4), 最终求得 6 次结果的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs), 结果见表 3。棘鳞蛇鲭中 4 种碳数的蜡酯含量及其总含量的相对标准偏差均小于 5%, 证明方法的精密度良好, 满足定量检测的需要。

2.2.4 方法的准确性

对大西洋真鳕(阴性样本)^[22]和棘鳞蛇鲭(阳性样本)两种鱼肉中分别进行了 3 个不同添加水平的加标回收实验, 每个水平重复测定 3 次。其中, 在太平洋真鳕中, 分别加入了 0.25、0.50、0.75 mg 的 $C_{30}\sim C_{38}$ 3 个水平蜡酯混合标

准品, 以测得空白样品中 5 种碳数的蜡酯在 3 个添加水平上的加标回收情况; 而在棘鳞蛇鲭中, 由于不同碳数的蜡酯含量差距较大, 不便全部加标, 因此选择了含量较低的 C_{32} 蜡酯作为加标回收的对象, 加入了 0.25、0.50、0.75 mg 3 个水平 C_{32} 蜡酯标准品来进行加标回收, 以 2.2.3 中测得的 C_{32} 蜡酯含量作为本底值进行了扣除后, 再计算加标回收率。最终, 二者的加标回收率和 RSDs 范围如表 4 和表 5 所示。

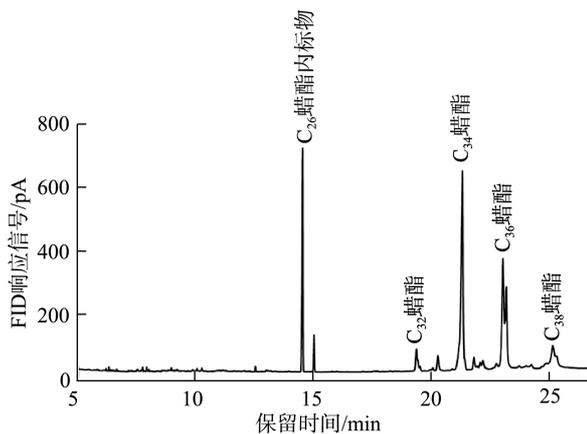


图 4 棘鳞蛇鲭蜡酯气相色谱图

Fig.4 Gas chromatogram of wax esters in *Ruvettus pretiosus*

表 3 棘鳞蛇鲭中蜡酯含量的精密度测定结果($n=6$)

Table 3 Precision determination of wax esters in *Ruvettus pretiosus* ($n=6$)

蜡酯种类	C_{32}	C_{34}	C_{36}	C_{38}	总量
含量/(mg/g)	4.19±0.16	37.32±1.32	34.61±1.24	9.91±0.38	86.03±2.96
RSDs/%	3.71	3.53	3.58	3.79	3.44

结果表明, $C_{30}\sim C_{38}$ 蜡酯在阴性样本中的加标回收率为 86.52%~105.98%, RSDs 为 0.32%~3.98%; C_{32} 蜡酯在阳性样本中的加标回收率为 95.29%~103.91%, RSDs 为 1.80%~3.20%。因 C_{32} 蜡酯的含量在棘鳞蛇鲭中相对较低, 因此当依据它本底值设置不同加标梯度的回收率都符合要求时, 说明建立的方法准确度良好, 可以满足对水产品中 $C_{30}\sim C_{38}$ 蜡酯含量检测的要求。

表 4 大西洋真鳕中 $C_{30}\sim C_{38}$ 蜡酯的回收率($n=3$)

Table 4 Recoveries of $C_{30}\sim C_{38}$ wax esters in *Gadus morhua* ($n=3$)

加标量/mg	C_{30}		C_{32}		C_{34}		C_{36}		C_{38}	
	回收率/%	RSDs/%								
0.25	94.35	1.40	86.52	3.41	94.58	1.48	94.38	0.32	92.00	0.82
0.50	95.82	0.85	88.31	0.91	97.17	1.34	97.29	1.45	96.41	0.72
0.75	102.25	2.44	94.90	3.60	104.83	2.69	104.88	3.57	105.98	3.98

表 5 棘鳞蛇鲭中 C₃₂ 蜡酯的回收率(n=3)
Table 5 Recoveries of C₃₂ wax esters in *Ruvettus pretiosus* (n=3)

样品本底值/mg	C ₃₂ 加标量/mg	平均回收率/%	RSDs/%
	0.25	99.26	1.80
4.19	0.50	95.29	2.78
	0.75	103.91	3.20

2.3 实际样本检测

2.3.1 市售水产品检验调查

用本研究建立的方法分别对异鳞蛇鲭、胸棘鲷和乌鱼子进行定量检测, 结果见表 6, 发现均含有大量的蜡酯, 与已有报道相吻合。除此之外, 为证明方法的适用性, 对其他典型的市售鱼类、虾蟹类、贝类、软体动物类等共计 15 种水产品样本(表 7)进行了检测, 均未检出蜡酯成分。

2.3.2 掺假鱼糜的蜡酯含量检测

为避免不良商家将棘鳞蛇鲭、异鳞蛇鲭等含有大量蜡

酯的鱼肉掺入到鱼糜制品中进行销售, 本研究还探究了方法对于掺入鱼糜产品中蜡酯含量检测的适用性。因淡水鱼糜价格十分便宜, 没有掺假的必要, 故选用了目前市场上使用量最大的海水鱼糜——黄线狭鳕鱼糜作为基底, 在其中分别加入不同比例的棘鳞蛇鲭鱼肉, 组织捣碎机充分绞碎均质后, 制作成掺入比例分别为 5%、10%、20%、30%、40%、50%的掺假鱼糜模型, 按照本方法进行定量, 定量结果如表 8 所示, 不同掺入比例下各个蜡酯的 RSDs 均在 15%以内, 满足定量检测的需求。以蜡酯含量的检测值为横坐标, 以棘鳞蛇鲭掺入比例为纵坐标, 进行线性关系拟合。结果表明, 当棘鳞蛇鲭鱼肉在黄线狭鳕鱼糜中的掺入比例在 5%~50%之间时, 掺入比例与蜡酯含量的检测值呈现线性关系, r^2 为 0.9969, 证明线性关系良好。这也能够证明, 本方法不易受到鱼糜制品的基质效应影响, 可以对海水鱼糜中掺入的含有蜡酯的水产品的行为进行有效鉴别, 并对其中的蜡酯含量进行精确定量。

表 6 3 种含有蜡酯的水产品中蜡酯含量测定结果(n=3)
Table 6 Determination of wax esters in 3 kinds of seafoods containing wax esters (n=3)

水产品	蜡酯含量/(mg/g)					总量
	C ₃₀	C ₃₂	C ₃₄	C ₃₆	C ₃₈	
异鳞蛇鲭	-	4.66±0.14	39.59±1.34	41.78±1.42	16.94±0.22	102.97±3.10
胸棘鲷	-	1.92±0.10	9.47±0.38	11.75±0.51	8.24±0.45	31.37±1.42
乌鱼子	4.09±0.14	32.81±0.69	37.40±0.61	12.90±0.18	3.63±0.17	90.82±1.59

表 7 调研的市售水产品种类
Table 7 Types of seafoods investigated on the market

种类/数量	品名
鱼类/9	鮫鰵、七星底灯鱼、大西洋真鳕、太平洋真鳕、黄线狭鳕、裸盖鱼、大西洋鲑、大菱鲆、牙鲆
虾蟹类/2	凡纳滨对虾、远海梭子蟹
贝类/2	栉孔扇贝、贻贝
软体动物/1	阿根廷鱿鱼
鱼类肝脏/1	太平洋真鳕肝脏

表 8 掺假鱼糜中蜡酯含量测定结果(n=3)
Table 8 Determination of wax esters in adulterated surimi (n=3)

掺入比例/%	C ₃₂		C ₃₄		C ₃₆		C ₃₈		总量	
	含量/(mg/g)	RSDs /%	含量/(mg/g)	RSDs /%						
5	0.22±0.03	14.39	1.70±0.19	10.96	1.56±0.16	10.55	0.31±0.03	9.99	3.80±0.41	10.87
10	0.50±0.02	4.42	4.34±0.21	4.83	3.86±0.18	4.64	1.03±0.04	3.47	9.73±0.44	4.49
20	0.94±0.06	6.16	8.01±0.62	7.71	7.03±0.54	7.73	2.07±0.17	8.43	18.05±1.38	7.66
30	1.29±0.04	3.19	11.08±0.45	4.02	10.03±0.50	4.96	2.92±0.14	4.91	25.31±1.10	4.34
40	1.59±0.09	5.87	14.25±1.21	8.48	12.83±1.06	8.29	4.22±0.20	4.71	32.88±2.56	7.79
50	2.00±0.06	2.97	17.98±0.89	4.94	16.02±0.45	2.80	5.03±0.27	5.39	41.03±1.60	3.91

3 结论

本研究的讨论对象聚焦于有可能出现于市场上、存在食用风险的水产品,使用气相色谱法和气相色谱-质谱法探究了其可食部位中蜡酯的定性定量检测方法,选择了C₃₀、C₃₂、C₃₄、C₃₆、C₃₈蜡酯作为代表性检测对象。利用固相萃取结合气相色谱法,建立了对水产品中C₃₀~C₃₈蜡酯含量高效、准确检测的方法。方法的检出限能够满足分析条件,精密度好、回收率高、可操作性强,在不同水产品的阴性和阳性样本中均不存在基质干扰现象。本方法的建立解决了水产品中不同组成蜡酯精确量化的技术难题,也可以为水产品中蜡酯的食品毒理学评价提供技术支撑,还可为市场监管部门规范市场秩序提供有效手段。此外,本研究还可以对家畜、家禽等陆生动物脂质的检验研究提供借鉴。

参考文献

- [1] ATSUKO T, KYOKO I, TAKESHI Y, *et al.* Method for the determination of natural ester-type gum bases used as food additives via direct analysis of their constituent wax esters using high-temperature GC/MS [J]. *Food Sci Nutr*, 2014, 2(4): 417–425.
- [2] BOGEVIK A. Marine wax ester digestion in salmonid fish: A review [J]. *Aquacult Res*, 2011, 42(11): 1577–1593.
- [3] RUIZ-GUTIERREZ V. Lipid and fatty acid composition of muscle and internal organs from *Ruvettus pretiosus* [J]. *J Fish Biol*, 1997, 50(6): 1353–1357.
- [4] WANG Y, TAO Z, LI C, *et al.* Factors affecting lipid and fatty acid composition of *Calanus sinicus* in the Yellow Sea and the East China Sea in spring [J]. *J Oceanol Limnol*, 2022, 40(1): 173–182.
- [5] PAULINA W, JOSEFINE N, KONSTANTIN B, *et al.* 12-weeks of *Calanus finmarchicus* oil intake improves omega-3-index in healthy older subjects engaging in an exercise program [J]. *Br J Nutr*, 2020, 125(4): 1–17.
- [6] CARLIJN S, MARIE P, KARL-ERIK E, *et al.* Possible health effects of a wax ester rich marine oil [J]. *Front pharmacol*, 2020, 11: 961.
- [7] SCHOTS P, JANSEN K, MRAZEK J, *et al.* Obesity-induced alterations in the gut microbiome in female mice fed a high-fat diet are antagonized by dietary supplementation with a novel, wax ester-rich, marine oil [J]. *Nutr Res*, 2020, 83: 94–107.
- [8] GIUSTI A, CASTIGLIEGO L, RUBINO R, *et al.* A conventional multiplex PCR assay for the detection of toxic gemfish species (*Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum*): A simple method to combat health frauds [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(4): 960–968.
- [9] UKISHIMA Y, MASUI T, MATSUBARA S, *et al.* Wax components of escolar (*Lepidocybium flavobrunneum*) and its application to base of medicine and cosmetics [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1987, 107(11): 883–890.
- [10] KONING A. Phospholipids of marine origin: the orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*): Research letter [J]. *S Afr J Sci*, 2005, 101(9&10): 414–416.
- [11] The U.S. Food and Drug Administration. Fish and fishery products hazards and controls guidance. June 2022 ed [M]. Florida: Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2022.
- [12] 温智清, 阚式绒, 郑晓聪, 等. 双重实时荧光聚合酶链式反应检测棘鳞蛇鲭和异鳞蛇鲭[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(6): 540–544.
WEN ZQ, KAN SF, ZHENG XC, *et al.* Development of a duplex real-time polymerase chain reaction for *Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum* [J]. *Chin J Food Hyg*, 2019, 31(6): 540–544.
- [13] LING KH, CHEUNG CW, CHENG SW, *et al.* Rapid detection of oilfish and escolar in fish steaks: A tool to prevent keriorrhea episodes [J]. *Food Chem*, 2008, 110(2): 538–546.
- [14] HWANG CC, LIN CM, HUANG CY, *et al.* Chemical characterisation, biogenic amines contents, and identification of fish species in cod and escolar steaks, and salted escolar roe products [J]. *Food Control*, 2012, 25(1): 415–420.
- [15] JACQUET JL, PAULY D. Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood [J]. *Mar Policy*, 2008, 32(3): 309–318.
- [16] LI H, XIE RB, YU W, *et al.* Rapid identification of cod and oil fish components based on loop-mediated isothermal amplification [J]. *Aquacult*, 2021, 545: 737209.
- [17] 许随根, 李家鹏, 李金春, 等. 多重实时聚合酶链式反应熔解曲线法同步鉴别蓝鳍金枪鱼、裸盖鱼、异鳞蛇鲭[J]. *食品科学*, 2020, 41(24): 259–266.
XU SG, LI JP, LI JC, *et al.* A multiplex real-time polymerase chain reaction combined with melting curve analysis method for simultaneous identification of the meat of blue fin tuna, sablefish and oilfish [J]. *Food Sci*, 2020, 41(24): 259–266.
- [18] YAO L, XIN H, QU M, *et al.* Development of duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of oilfish and escolar derived components [J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 101(5): 1792–1799.
- [19] PARK YC, KIM MR, JUNG YH, *et al.* Development of detection method for oilfish (*Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum*) as a food materials not usable in foods [J]. *J Food Hyg Saf*, 2013, 28(1): 50–55.
- [20] DALAMA J, VIEITES J, ESPÍÑEIRA M. Detection of the causal agents of keriorrhea (*Lepidocybium flavobrunneum* and *Ruvettus pretiosus*) by means of real time PCR [J]. *Food Chem*, 2015, 174: 326–329.
- [21] LING KH, NICHOLS PD, BUT PP. Chapter 1 fish-induced keriorrhea [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2009, 57: 1–52.
- [22] FENG H, HUANG X, TAI J, *et al.* Lipids analysis and rapid identification of cod products [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2020, 122(8): 1900444.
- [23] CHEN NIT, BOUALEM, CAMINO C, *et al.* Characterization of kabylian virgin olive oils according to fatty alcohols, waxes, and fatty acid alkyl esters [J]. *J Food Meas Charact*, 2021, 15(6): 1–12.
- [24] CLARA D, AGUSTÍ R, PAZ R, *et al.* Chemical and sensory characterization of nine spanish monovarietal olive oils: An emphasis on

- wax esters [J]. *Agriculture*, 2021, 11(2): 170.
- [25] 林远辉, 高蓓, 李玉玉, 等. 橄榄油掺假鉴别技术研究进展[J]. *食品科学*, 2013, 34(5): 279–283.
- LIN YH, GAO B, LI YY, *et al.* Research progress in identification of olive oil adulteration [J]. *Food Sci*, 2013, 34(5): 279–283.
- [26] 信红梅, 姚琳, 陆键萍, 等. Real-time PCR 法检测水产品中异鳞蛇鲭、棘鳞蛇鲭源性成分[J]. *食品科学*, 2020, 41(24): 273–280.
- XIN HM, YAO L, LU JP, *et al.* Detection of *Lepidocybium flavobrunneum* and *Ruvettus pretiosus*-derived components in aquatic products by real-time PCR [J]. *Food Chem*, 2020, 41(24): 273–280.
- [27] FOLCH J, LEES M, STANLEY S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues [J]. *J Biol Chem*, 1957, 226(1): 497–509.
- [28] 陆慧媛, 姜珊, 张烈, 等. 商品化正相硅胶固相萃取柱-气相色谱法检测橄榄油中的蜡含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(11): 4496–4503.
- LU HY, JIANG S, ZHANG L, *et al.* Determination of wax content in olive oils by gas chromatography using a commercial normal phase silica gel solid phase extraction column [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(11): 4496–4503.
- [29] SCANO P, ROSA A, MARINCOLA FC, *et al.* 13C NMR, GC and HPLC characterization of lipid components of the salted and dried mullet (*Mugil cephalus*) roe “bottarga” [J]. *Chem Phys Lipids*, 2008, 151(2): 69–76.
- [30] 柴杰, 薛雅琳, 金青哲, 等. 橄榄油中蜡含量测定方法的改进及气质联用分析[J]. *中国粮油学报*, 2017, 32(2): 135–139.
- CHAI J, XUE YL, JIN QZ, *et al.* Improvement of the determination method of wax content in olive oils and analysis by GC-MS [J]. *J Chin Cereals Oils Ass*, 2017, 32(2): 135–139.
- [31] 张蕊, 薛雅琳, 赵会义. 蜡含量法鉴别初榨橄榄油的方法研究[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(8): 119–122.
- ZHANG R, XUE YL, ZHAO HY. A study on distinguishing method of virgin olive oil by determining wax content [J]. *J Chin Cereals Oils Ass*, 2011, 26(8): 119–122.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



郭 嘉, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全与质量控制。

E-mail: guojia971223@qq.com



林 洪, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与质量控制。

E-mail: linhong@ouc.edu.cn