

超声萃取 - 气相色谱法测定扇贝中 30 种脂肪酸

彭全材, 宋金明*, 李 军, 于 颖
(中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘 要: 研究扇贝中脂肪酸测定的前处理技术, 建立扇贝中 30 种脂肪酸(包括饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸)的同时测定分析方法。样品经冷冻干燥、超声提取、硫酸 - 甲醇法甲酯化后, 采用气相色谱分析, 内标法定量测定扇贝中脂肪酸的含量。正交试验显示, 脂肪酸的最佳提取工艺为: 溶剂比例为甲醇 - 二氯甲烷溶液(1:3, V/V)、料液比 1:140(mg/mL)、提取 3 次、每次 15min, 其中提取次数与溶剂比例对结果影响显著($P < 0.05$)。30 种不同的脂肪酸在 5.0~80.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 线性良好, 相关系数均大于 0.999; 不同水平下的加标回收率分别为 84%~91%、86%~99%; 相对标准偏差($n = 5$)分别为 1.3%~3.5%、0.9%~3.1%; 方法的检出限($R_{\text{SN}} = 3$)为 1.94~2.57mg/kg。该方法操作简便、迅速、灵敏、准确度高, 可满足扇贝以及类似性质的生物体脂肪酸的检测需要。

关键词: 扇贝; 脂肪酸; 超声萃取; 气相色谱

Determination of 30 Fatty Acids in Scallop by Ultrasonic Extraction Gas Chromatography

PENG Quan-cai, SONG Jin-ming*, LI Jun, YU Ying
(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: An analytical method for the simultaneous determination of 30 fatty acids (including saturated and unsaturated fatty acids) in scallop was developed. Samples were lyophilized, extracted under ultrasonic assistance, and methyl esterified with sulfuric acid and methanol before GC analysis. The fatty acids in scallop were quantified by internal standard method. The optimal conditions for fatty acid extraction from scallop samples, as determined using orthogonal array design, were a mixture of methanol and dichloromethane (1:3, V/V) as the extraction solvent at a material-to-liquid ratio of 1:140 (mg/mL) and three replicate extractions for 15 min each time. Both extraction number and material-to-liquid ratio had a significant effect on fatty acid extraction ($P < 0.05$). A good linear relationship was found for all 30 fatty acids in the concentration range of 5.0—80.0 $\mu\text{g/mL}$ with a correlation coefficient exceeding 0.999. The average recovery rates of 30 fatty acids at low and high spike levels were 1.3%—3.5% and 0.9%—3.1%, respectively ($n = 5$). The detection limits of the method varied in the range of 1.94—2.57 mg/kg ($R_{\text{SN}} = 3$). This method was simple, rapid, sensitive and accurate and could meet the requirements for the determination of fatty acids in scallop and similar organisms.

Key words: scallop; fatty acids; ultrasonic extraction; gas chromatography

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)12-0163-06

扇贝是我国浅海养殖的重要对象之一, 产量仅次于牡蛎和蛤类。扇贝的肉质细嫩, 味道鲜美, 营养丰富, 是深受人们喜爱的一种海产品^[1-2]。随着生活水平的提高, 人们对食品的要求不再仅仅满足于温饱, 而且对食品的营养和品质有越来越高的要求。

脂肪酸是指一端含有一个羧基的脂肪族碳氢链的有机物, 在有充足氧供给的情况下, 可氧化分解释放大量能量, 因此脂肪酸是机体主要能量来源之一。现代

医药学研究表明脂肪酸有降血脂、降血压、抗血栓、影响脑神经、视神经功能、还具有抗癌、免疫调节作用, 对过敏反应和炎症有抑制效果^[3-6], 特别是某些多不饱和脂肪酸, 对人体具有多种重要的生理功能, 必须由食物摄入^[7-9]。

扇贝含有丰富的脂肪酸, 包括多种必需脂肪酸和非必需脂肪酸, 还含有大量人体所需的二十碳五烯酸(eicosapentemacnioc acid, EPA)和二十二碳六烯酸

收稿日期: 2011-05-27

基金项目: 中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目(yg2010020)

作者简介: 彭全材(1983—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为色谱分析。E-mail: quancaipeng@163.com.

* 通信作者: 宋金明(1964—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为海洋化学。E-mail: jmsong@qdio.ac.cn

(docosahexaenoic acid, DHA), 因此扇贝的脂肪酸含量和组成是评价其营养价值的重要指标之一。随着扇贝养殖业的持续发展, 陆源污染和养殖自身污染日益严重, 育苗群体小, 自繁自育, 近交机会增加等原因造成苗种质量退化^[10-13], 对扇贝中脂肪酸的测定方法进行研究显得非常迫切而实际, 是扇贝品质甄别的最直接方法, 同时也为良种的选育提供科学的评价标准。本实验运用冷冻干燥技术、超声波协助萃取技术(ultrasonic assisted extraction, UAE)以及色谱分离技术对扇贝中的脂肪酸测定方法进行系统的研究, 建立扇贝中 30 种脂肪酸的同时检测方法, 该方法灵敏度和准确度较高, 满足检测要求。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验所有扇贝样品均来自青岛近海。取回实验室静养数小时后, 开壳取下扇贝柱, 匀浆, 为供试样品, 将其置于灼烧过的玻璃培养皿中并均匀平铺(厚度不超过 2cm), 将培养皿放入 -20℃ 预冻 10h, 取出样品用冷冻干燥机干燥 20h。将干燥好的扇贝样品进行研磨, 过 40 目筛, 贮藏于干燥器中备用。

30 种脂肪酸混合标准品(10mg/mL)、C_{19:0} 脂肪酸内标 美国 Supelco 公司; 二氯甲烷、正己烷(均为色谱纯) 美国 Burdick & Jackson 公司; 甲醇(色谱纯) 德国 Merck 公司; 氢氧化钾(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 硫酸(优级纯) 上海振兴化工二厂有限公司; 超纯水(18.25MΩ·cm)。

1.2 仪器与设备

7890 气相色谱仪(FID 检测器(带 EPC)、7683B 自动液体进样器、色谱工作站) 美国 Agilent 公司; DB-FFAP (122-3232)弹性石英毛细管柱(30m × 0.25mm, 0.25 μm); FW80 型药材粉碎机 天津斯特仪器公司; R-3 型旋转蒸发仪 瑞士 Büchi 公司; Aquapro AML-0502-U 超纯水系统; KQ-400KDE 型高功率数控超声波仪 昆山市超声仪器公司; JY92-II 型超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技公司; FD-1A-50 冷冻干燥机; HSC-12B 氮吹仪; 移液枪(100~1000 μL、20~2000 μL) 德国 Eppendorf 公司; 电子天平(读数精度 0.1mg) 瑞士 Mettler Toledo 公司; DHG-9053A 型热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液配制

精密称取 C_{19:0} 脂肪酸内标对照品 10.0mg 置于 100mL 容量瓶中, 加正己烷定容至刻度, 摇匀即得 0.10mg/mL 的内标储备液。

精密取 10.0mg/mL 的 30 种脂肪酸混合标准品 1mL, 置于 5mL 容量瓶中, 用正己烷定容到刻度, 即得 2.0mg/mL 的标准溶液, 用移液枪取 1.0、0.5、0.25、0.125mL, 分别置于 2mL 容量瓶中, 加入 1.0mL 内标储备溶液, 用正己烷定容到刻度, 即得 1.0、0.5、0.25、0.125mg/mL 混合标准工作溶液。另取 10.0mg/mL 30 种脂肪酸混合标准品 1mL, 置于 5mL 容量瓶中, 加入 2.5mL 的内标储备溶液, 用正己烷定容到刻度, 即得 2.0mg/mL 的标准工作液。

1.3.2 样品制备

准确称取粉碎过筛后的样品 40mg, 置于 450℃ 灼烧 4h 的具塞尖底玻璃管中, 加 C_{19:0} 内标储备液 0.5mL, 加入 5.6mL 甲醇-二氯甲烷溶液(1:3, V/V), 冰水浴超声破碎提取 15min, 收集有机溶液, 残渣再用 5.6mL 甲醇-二氯甲烷溶液(1:3, V/V)冰浴超声提取 3 次, 合并有机溶液, 用无水硫酸钠除水, 氮气吹扫至干, 加入 0.5mL 正己烷后, 再加入 5mL 2mol/L 硫酸甲醇溶液, 于 80℃ 水浴中甲酯化 4h, 冷却后, 分 2 次加入 5mL 正己烷进行萃取, 将萃取后的正己烷溶液氮气吹扫至干, 加正己烷定容至 1mL, 摇匀, 0.20 μm 滤膜过滤, 待测。

1.3.3 提取工艺优化

选择对超声提取影响较大的溶剂体积比例、料液比、提取时间和提取次数 4 个因素做正交试验。以总脂肪得率为评价指标, 通过正交试验优选扇贝总脂肪的最佳提取条件。选取溶剂比例、料液比、提取时间和提取次数作为考察因素, 进行 L₉(3⁴) 正交试验。

1.3.4 色谱条件

DB-FFAP 弹性石英毛细管柱(30m × 0.25mm, 0.25 μm), 以键合改性聚乙二醇为固定相, 涂布膜厚为 0.25 μm; 载气流速 1.0mL/min; 程序升温: 50℃ 保持 3min, 再以 10℃/min 升至 230℃, 保持 15min; 载气: 氮气; 柱头压: 35.5kPa; 分流进样, 分流比 10:1; 进样口温度: 220℃; 火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)温度: 280℃; 进样体积: 1.0 μL。

1.3.5 定性与定量

总脂肪得率计算方法依照国标[14]方法进行; 脂肪酸含量计算方法根据保留时间定性, 以峰面积内标法进行定量, 脂肪酸含量计算参照陈芳等^[15]内标计算方法, 见式(1)。

$$X_i = \frac{R_s}{R_i} \times C_i \times V_s \times \frac{100}{m} \quad (1)$$

式(1)中: X_i 为样品中脂肪酸的含量 %; R_s 为样品溶液中脂肪酸与内标物的响应值之比; R_i 为标准溶液中脂肪酸与内标物的响应值之比; C_i 为脂肪酸标准溶液

的质量浓度/(mg/mL); V_s 为样品溶液最后定容体积/mL; m 为样品的质量/mg。

1.3.6 样品测定

按 1.3.2 节样品处理方法对 3 组不同扇贝(样品 1、2、3)进行处理, 每组做 3 次平行, 进行色谱分析, 进样量 1.0 μ L, 采用内标法定量, 测定不同扇贝中脂肪酸的含量。

2 结果与分析

2.1 样品前处理的优化

2.1.1 样品干燥方法选择

真空冷冻干燥能最大程度地保持物料的颜色、形状和组织成分, 获得高品质的干制品, 较适合于干燥热敏性物料; 真空冷冻干燥与热干燥相比, 所要求的样品用量小, 特别适合于少量样品的干燥分析。对于脂肪酸的检测来说, 特别是针对低碳脂肪酸, 真空冷冻干燥可以获得更高的回收率, 因此在脂肪酸样品分析时, 真空冷冻干燥是较好的选择。

2.1.2 正交试验优化超声提取条件

以影响超声萃取效果的有溶剂比例、料液比、提取时间和提取次数为考察因素, 并结合预试验情况, 每因素选取 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 因素水平见表 1。以

表 1 超声提取条件正交试验因素水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal array design

水平	因素			
	A 溶剂体积比例 (甲醇:二氯甲烷)	B 料液比 (mg/mL)	C 提取时 间/min	D 提取 次数
1	1:1	1:80	10	1
2	1:2	1:140	15	2
3	1:3	1:200	20	3

表 2 正交试验结果及其极差分析
Table 2 Orthogonal array design arrangement and results

试验号	因素				总脂肪得率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	3.71
2	1	2	2	2	4.11
3	1	3	3	3	4.32
4	2	1	2	3	4.64
5	2	2	3	1	4.02
6	2	3	1	2	4.32
7	3	1	3	2	4.37
8	3	2	1	3	4.80
9	3	3	2	1	4.12
K_1	12.14	12.72	12.83	11.85	
K_2	12.98	12.93	12.87	12.80	
K_3	13.29	12.76	12.71	13.76	
k_1	4.05	4.24	4.28	3.95	
k_2	4.33	4.31	4.29	4.27	
k_3	4.43	4.25	4.24	4.59	
R	0.38	0.07	0.05	0.64	

总脂肪含量作为衡量提取效率的客观指标, 优选最佳工艺, 脂肪酸甲酯化方法依照国标^[14]方法进行。每一条件下均作 3 次重复计算平均值。正交试验结果见表 2。

依据胡志杰^[16]报道的分析方法, 通过 SPSS 软件分析所得的单因素统计分析结果见表 2, 经统计分析可得提取时间(C)离均差平方和最小(0.005), 对整个试验结果影响最小, 因而把它作为误差估计, 用以检验其他因素作用的显著性, 得方差分析结果见表 3。

表 3 正交试验结果方差分析表
Table 3 Results of variance analysis for the experimental results of orthogonal array design

因素	离均差平方和	自由度	平均偏差	F 值	P 值
纠偏模型	0.852	6	0.142	61.466	0.016*
截距	163.925	1	163.925	70929.236	0.000**
A	0.236	2	0.118	51.063	0.019*
B	0.008	2	0.004	1.793	0.358
D	0.608	2	0.304	131.543	0.008**
C(误差)	0.005	2	0.002		
总误差	164.782	9			
纠偏总值	0.857	8			

注: $R^2 = 0.995$ (调整后的 $R^2_{Adj} = 0.978$); *. $P < 0.05$, 差异显著; **. $P < 0.01$, 差异极显著。

从表 2 极差分析可知, 超声提取扇贝脂肪的最佳工艺为 $A_3B_2C_2D_3$, 即溶剂比例为甲醇-二氯甲烷溶液(1:3, V/V)、料液比 1:140、提取时间 15min、提取次数 3 次。由 R 值可以看出, 4 个因素对试验指标的影响依次为提取次数>溶剂比例>料液比>提取时间。由表 3 可知, 4 个因素对提取的影响程度依次为 $D > A > B > C$ 。

结合表 2、3 可以看出: D(提取次数)对试验结果影响极显著($P < 0.01$), A(溶剂比例)对结果影响显著($P < 0.05$), 而 B(料液比)和 C(提取时间)对结果影响不大, 各因素的主次顺序为 $D > A > B > C$, 即提取次数、溶剂比例、料液比、提取时间。

按照最佳提取工艺 3 组平行实验, 通过计算得到总脂肪的提取率分别为 4.92%、4.89% 和 4.91%。

2.1.3 甲酯化条件的选择

在多数的生物样品中, 脂肪酸的沸点较高, 进行色谱分析时, 要将脂肪酸转化成沸点较低的脂肪酸甲酯(fatty acid methyl esters, FAMES)才较容易气化, 所以在分析生物体组织或食品中的脂肪含量和脂肪酸组成时经常进行的是脂肪酸的甲酯化。

根据已有文献和现行标准综合来看^[17-18], 脂肪酸甲酯化方法共有 3 种: 三氯化硼-甲醇甲酯化法(M1), 氢氧化钾-甲醇直接酯化法(M2), 硫酸-甲醇脂肪酸甲酯化法(M3)。分别按照上述 3 种方法的文献或标准对扇贝脂肪进行甲酯化, 取质量相同的同一批扇贝所提取的

脂肪酸进行甲酯化,以所得总脂肪多少为目标衡量甲酯化效率高,所得结果见图1,表明对于扇贝脂肪酸甲酯化效率最高的是硫酸-甲醇法,其次是三氟化硼-甲醇甲酯化法,最低的是氢氧化钾-甲醇法,表明酸催化酯化具有普遍的适用性,且催化效果较好,结果与石艳宾等^[18]研究结果一致。酸催化直接酯交换反应速度大于碱皂化反应,水解和酯化一步进行,只需要一种试剂,反应速度不仅快而且操作也简单,所以本实验中扇贝脂肪酸甲酯化采用酸催化酯化法。

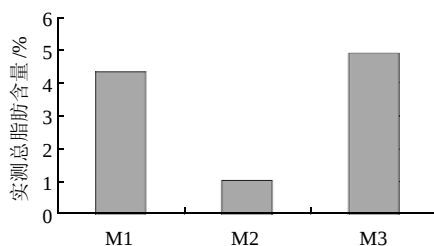


图1 不同方法脂肪酸实测含量比较图

Fig.1 Comparison of fatty acid contents of scallop determined by GC based on different methyl esterification treatments

2.2 色谱条件的选择及内标物选择

采用相同的程序升温,对比DB-5、DB-17及DB-FFAP毛细管柱的分离效果,结果显示,DB-FFAP毛细管柱可以使30种脂肪酸及内标物完全分离,且峰形对称(图2),在样品分离中也取到了比较好的效果(图3)。因此本实验选择DB-FFAP毛细管柱为分析柱。

色谱内标物应与被测组分的相对分子质量和沸点相近、结构相似,且保留时间相近,但又能分开。本试验选择十九烷酸甲酯为内标物,按照所选的色谱条件可以完全满足实验要求,结果见图2、3。

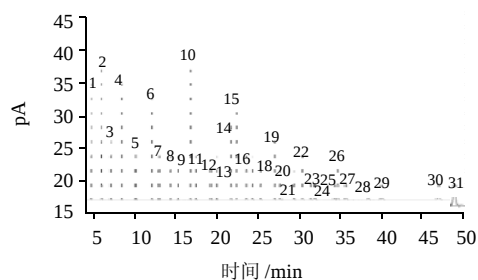


图2 30种脂肪酸标准溶液的气相色谱图
1.C_{8:0}; 2.C_{10:0}; 3.C_{11:0}; 4.C_{12:0}; 5.C_{13:0}; 6.C_{14:0}; 7.C_{14:1}; 8.C_{15:0}; 9.C_{15:1}; 10.C_{16:0}; 11.C_{16:1 ω7}; 12.C_{17:0}; 13.C_{17:1}; 14.C_{18:0}; 15.C_{18:1 ω9}; 16.C_{18:2 ω6}; 17.内标C_{19:0}; 18.C_{18:3 ω3}; 19.C_{20:0}; 20.C_{20:1 ω9}; 21.C_{20:2 ω6}; 22.C_{20:3 ω6}; 23.C_{20:4 ω6}; 24.C_{23:0}; 25.C_{20:5 ω3}; 26.C_{22:0}; 27.C_{22:1 ω9}; 28.C_{22:2}; 29.C_{24:0}; 30.C_{24:1}; 31.C_{22:6 ω3}。

图2 30种脂肪酸标准溶液的气相色谱图

Fig.2 GC profile of a standard mixture solution of 30 fatty acid

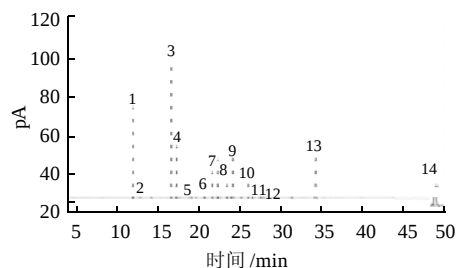


图3 扇贝样品的气相色谱图

Fig.3 GC profile of scallop sample

2.3 线性关系、检出限、回收率和精密度

在优化后的色谱条件下,对质量浓度分别为0.125、0.25、0.5、1.0、2.0mg/mL的系列混合标准溶液进行测定,以各标准品与内标物峰面积的比值(x)对标准品与内标物的质量浓度比(y)绘制标准曲线,并分别计算检出限($R_{SN}=3$)。结果见表4,标准曲线相关系数均大于0.9990,方法线性关系良好,方法的检出限($R_{SN}=3$)为1.94~2.57mg/kg,满足实验要求。

表4 30种脂肪酸的线性方程、相关系数、检出限、回收率及相对标准偏差
Table 4 Linear equations, correlation coefficients, limits of detection, recoveries and RSD

序号	脂肪酸	线性范围/(mg/L)	线性回归方程	相关系数	检出限/(mg/kg)	添加量/(mg/g)	平均回收率/(n=5)		RSD/(n=5)		
1	C _{8:0}	5.0~80.0	y = 73.511x - 14.599	0.9998	2.57	0.2	2.0	89	90	2.1	1.7
2	C _{10:0}	5.0~80.0	y = 64.904x - 9.9465	0.9997	2.35	0.2	2.0	88	92	2.2	1.6
3	C _{11:0}	2.5~40.0	y = 62.786x - 3.807	0.9996	2.32	0.1	1.0	86	89	1.8	1.1
4	C _{12:0}	5.0~80.0	y = 60.161x - 6.364	0.9996	2.24	0.2	2.0	89	91	2.5	1.7
5	C _{13:0}	2.5~40.0	y = 59.078x - 2.1561	0.9994	2.24	0.1	1.0	87	95	2.1	1.8
6	C _{14:0}	5.0~80.0	y = 57.305x - 3.7944	0.9993	2.19	0.2	2.0	85	88	2.4	1.7
7	C _{14:1}	2.5~40.0	y = 57.603x - 1.5514	0.9993	2.21	0.1	1.0	84	88	1.3	0.9
8	C _{15:0}	2.5~40.0	y = 56.453x - 1.3181	0.9992	2.18	0.1	1.0	89	92	1.5	1.4
9	C _{15:1}	2.5~40.0	y = 57.357x - 0.6997	0.9991	2.22	0.1	1.0	91	96	1.2	0.9
10	C _{16:0}	7.5~120.0	y = 54.584x - 5.3085	0.9993	2.09	0.3	3.0	85	86	3.4	2.6
11	C _{16:1 ω7}	2.5~40.0	y = 56.505x - 1.4373	0.9993	2.18	0.1	1.0	88	98	2.7	2.1
12	C _{17:0}	2.5~40.0	y = 59.518x - 1.2878	0.9992	2.31	0.1	1.0	86	91	2.9	2.4
13	C _{17:1}	2.5~40.0	y = 53.411x - 1.3153	0.9992	2.07	0.1	1.0	83	89	2.4	2.1
14	C _{18:0}	5.0~80.0	y = 54.455x - 3.5299	0.9993	2.10	0.2	2.0	85	92	1.9	1.7
15	C _{18:1 ω9}	7.5~120.0	y = 52.862x - 6.0512	0.9993	2.03	0.3	3.0	86	91	2.6	2.2

续表 4

序号	脂肪酸	线性范围/(mg/L)	线性回归方程	相关系数	检出限/(mg/kg)	添加量/(mg/g)	平均回收率/(n=5)		RSD/(n=5)		
16	C _{18:2 ω6}	5.0~80.0	y = 54.492x - 3.6406	0.9984	2.16	0.2	2.0	89	95	2.5	2.1
17	C _{18:3 ω3}	2.5~40.0	y = 55.471x - 1.7753	0.9992	2.15	0.1	1.0	87	94	2.4	1.6
18	C _{20:0}	5.0~80.0	y = 52.787x - 4.2449	0.9993	2.03	0.2	2.0	84	92	2.3	1.9
19	C _{20:1 ω9}	2.5~40.0	y = 53.227x - 1.9083	0.9992	2.06	0.1	1.0	86	90	2.5	2.1
20	C _{20:2 ω6}	2.5~40.0	y = 54.345x - 1.8574	0.9991	2.10	0.1	1.0	89	94	2.7	2.6
21	C _{20:3 ω6}	2.5~40.0	y = 53.541x + 1.0608	0.9993	2.17	0.1	1.0	85	96	2.8	1.7
22	C _{20:4 ω6}	2.5~40.0	y = 56.473x - 1.6763	0.9991	2.19	0.1	1.0	87	92	2.6	1.8
23	C _{23:0}	2.5~40.0	y = 58.273x - 1.1173	0.9990	2.26	0.1	1.0	86	93	2.8	2.7
24	C _{20:5 ω3}	2.5~40.0	y = 58.227x - 2.0252	0.9993	2.24	0.1	1.0	85	91	2.5	2.2
25	C _{22:0}	5.0~80.0	y = 52.458x - 4.3498	0.9994	2.01	0.2	2.0	89	96	2.1	1.8
26	C _{22:1 ω9}	2.5~40.0	y = 52.151x - 1.6617	0.9992	2.01	0.1	1.0	85	99	1.8	1.6
27	C _{22:2}	2.5~40.0	y = 54.857x - 1.8418	0.9991	2.13	0.1	1.0	84	91	1.9	1.5
28	C _{24:0}	2.5~40.0	y = 53.322x - 1.8814	0.9992	2.05	0.1	1.0	89	97	2.9	2.6
29	C _{24:1}	5.0~80.0	y = 53.001x - 5.2988	0.9990	1.94	0.2	2.0	89	99	3.2	2.8
30	C _{22:6 ω3}	5.0~80.0	y = 55.842x - 3.3119	0.9991	2.18	0.2	2.0	85	94	3.5	3.1

在同一扇贝样品不同组别中分别添加 C_{19:0} 内标储备液 0.5mL 和不同质量浓度的脂肪酸(表 4), 做不同水平回收率实验, 每个添加水平重复测定 5 次, 按 1.3.2 节方法进行前处理和 1.3.4 节色谱条件下测定, 计算回收率和相对标准偏差(RSD), 结果见表 4, 结果表明 2 个水平添加回收率分别为 84%~91% 和 86%~99%, 相对标准偏差($n = 3$)分别为 1.3%~3.5% 和 0.9%~3.1%, 方法回收率和精密度均良好。

2.4 实际样品测定

表 5 扇贝实际样品定量测定结果($n=3$)
Table 5 Determination results for real scallop samples ($n = 3$)

峰号	脂肪酸	含量/(mg/kg)		
		样品 1	样品 2	样品 3
1	C _{14:0}	208.03 ± 0.11	208.74 ± 0.10	198.86 ± 0.10
2	C _{15:0}	141.81 ± 0.07	142.04 ± 0.08	140.33 ± 0.07
3	C _{16:0}	9848.71 ± 3.27	10434.93 ± 4.23	9537.01 ± 4.93
4	C _{16:1 ω7}	694.79 ± 0.35	961.78 ± 0.48	750.078 ± 0.41
5	C _{17:0}	450.29 ± 0.22	552.87 ± 0.25	489.97 ± 0.25
6	C _{18:0}	4283.79 ± 2.15	3700.72 ± 1.79	3945.84 ± 2.11
7	C _{18:1 ω9}	829.03 ± 0.41	324.38 ± 0.16	704.90 ± 0.35
8	C _{18:2 ω6}	1148.81 ± 0.57	1030.51 ± 0.50	1190.25 ± 0.61
9	C _{18:3 ω3}	166.95 ± 0.08	185.48 ± 0.09	123.17 ± 0.06
10	C _{20:1 ω9}	720.31 ± 0.36	452.80 ± 0.22	610.97 ± 0.31
11	C _{20:2 ω6}	448.41 ± 0.22	671.62 ± 0.41	538.37 ± 0.27
12	C _{20:4 ω6}	1781.78 ± 0.89	1551.93 ± 0.78	483.56 ± 0.25
13	C _{20:5 ω3}	11583.27 ± 4.83	12139.49 ± 4.05	9234.11 ± 4.73
14	C _{22:6 ω3}	3972.54 ± 1.79	4151.17 ± 1.94	3405.68 ± 1.75

注: 峰号同图 3。

按照上述方法对 3 组不同扇贝(样品 1、2、3)分别进行 3 次平行测定, 结果见表 5。3 组扇贝均检出 14 种脂肪酸, 且同一组扇贝样品间差别比较小, 而不同样品间部分脂肪酸组分含量差别较大。说明环境对扇贝生

长过程脂肪酸生物合成有较大影响, 同时也证明本方法重复性好, 可靠性强。本实验所检测扇贝样品都富含 C_{20:5 ω3}(EPA)和 C_{22:6 ω3}(DHA), EPA 和 DHA 是人体生长和发育的必需脂肪酸, 对生物神经组织的形成、眼、视网膜和脑的发育起着至关重要的作用^[19-20]。扇贝还含有动物无法合成 $n-3$ 和 $n-6$ 的多元不饱和脂肪酸, 这些脂肪酸对生殖功能起着重要作用^[21]。所以科学合理开发利用扇贝资源, 对人们日常营养搭配和人体健康有非常重要意义。

3 结 论

本实验对扇贝样品干燥、脂肪酸提取到甲脂化整个前处理过程进行了系统的研究, 探索建立了适合于扇贝中脂肪酸检测的前处理方法, 同时以气相色谱为测定手段, 建立了 30 种目标脂肪酸的同时测定方法。在优化的实验条件下, 30 种目标脂肪酸可以良好的分离, 脂肪酸甲脂的标准曲线相关系数均大于 0.9990, 方法的检出限($R_{SN}=3$)为 1.94~2.57mg/kg, 30 种脂肪酸 2 个水平回收率分别为 84%~91% 和 86%~99%, 相对标准偏差($n=3$)分别为 1.3%~3.5% 和 0.9%~3.1%, 方法回收率和精密度良好。

该方法具有操作简便、样品用量少、回收率高、精密度好和灵敏度高的特点, 为扇贝以及类似性质的生物体脂肪酸检测提供了参考方法, 尤其是该方法样品用量少, 克服了传统索氏提取法称样量大的弊端, 特别适合于取样难度大、样本个体小的珍贵样品检测。

参考文献:

- [1] 张新明, 顾成柏, 王秀敏. 扇贝营养价值研究进展[J]. 养殖与饲料, 2009(9): 58-60.
- [2] 陈超, 魏玉西, 刘慧慧, 等. 贝类加工废弃物复合海鲜调味料的制备

- 工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 433-436.
- [3] 张永刚, 印遇龙, 黄瑞林, 等. 多不饱和脂肪酸的营养作用及其基因表达调控[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 273-277.
- [4] MARTINIUK A L, LEE C M, LAWES C M, et al. Hypertension: its prevalence and population attributable fraction for mortality from cardiovascular disease in the Asia Pacific Region[J]. J Hypertens, 2007, 25(1): 73-79.
- [5] ARENDT K E, JONASDOTTIR S H, HANSEN P J, et al. Effects of dietary fatty acids on the reproductive success of the calanoid copepod *Temora longicornis*[J]. Mar Biol, 2005, 146(3): 513-530.
- [6] BECKETT N S, PETERS R, FLETCHER A E, et al. Treatment of hypertension in patients 80 years of age or older[J]. N Engl J Med, 2008, 358(18): 1887-1898.
- [7] PASSI S, CATAUDELLA S, MARCO P D, et al. Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different *Mediterranean marine* species of fish and shellfish[J]. J Agri Food Chem, 2002, 50(25): 7314-7322.
- [8] ORBAN E, LENA G D, NEVIGATO T, et al. Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea[J]. Food Chem, 2006, 101(3): 1063-1070.
- [9] BRIDGES K M, GIGLIOTTI J C, ALTMAN S, et al. Determination of digestibility, tissue deposition, and metabolism of the *omega*-3 fatty acid content of krill protein concentrate in growing rats[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(3): 2830-2837.
- [10] 江天久, 陈菊芳, 邹迎麟, 等. 中国东海和南海有害赤潮高发区麻痹性贝毒素研究[J]. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1156-1160.
- [11] MURPHY K J, MOONEY B D, MANN N J, et al. Lipid, FA and sterol composition of New Zealand green lipid mussel (*Perna canaliculus*) and tasmanian blue mussel (*Mytilus edulis*)[J]. Lipids, 2002, 37(6): 587-595.
- [12] ISLAM M D, TANAKA M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystem Including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis[J]. Mar Pollut Bull, 2004, 48(7/8): 624-649.
- [13] GARTHWAITE L. Keeping shellfish safe to eat: a brief review of shellfish toxins and methods for their detection[J]. Trends in food science&technology, 2000, 11(7): 235-244.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 22223 — 2008 食品中总脂肪、饱和脂肪(酸)、不饱和脂肪(酸)的测定: 水解提取 - 气相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-13.
- [15] 陈芳, 闫红, 蔡同一. 气相色谱法测定糠蜡提取物中的二十八烷醇和三十烷醇[J]. 食品科学, 2003, 24(4): 119-121.
- [16] 胡志洁. SPSS 11.5 软件在正交试验设计中的应用[J]. 医学信息, 2007, 20(5): 737-740.
- [17] 李海静, 吴胜明, 方均建, 等. 气质联用法测定人血清游离脂肪酸[J]. 质谱学报, 2009, 30(2): 83-87.
- [18] 石艳宾, 阮美娟. 柞蚕(幼虫)中脂肪酸的初步分析[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(5): 9-10.
- [19] ARENDT K E, JONASDOTTIR S H, HANSEN P J. Effects of dietary fatty acids on the reproductive success of the calanoid copepod *temora longicornis*[J]. Mar Biol, 2005, 146(3): 513-530.
- [20] ISHIZAKI Y, MASUDA R, UEMATSU K. The effect of dietary docosahexaenoic acid on schooling behaviour and brain development in larval yellowtail[J]. J Fish Biol, 2001, 58(6): 1691-1703.
- [21] SHIN K, JIANG M C, JIANG P K. Influence of food quality on egg production and viability of marine planktonic copepod *Acartia orno*[J]. Progress in Oceanography, 2003, 57(3/4): 265-277.