

实验技术与方法

基于靶向代谢组学法鉴别真伪海鸭蛋

张琪^{1,2},董旭阳^{1,3},许秀丽¹,杨旭升^{1,4},贾玮³,张峰¹(1. 中国检验检疫科学研究院食品安全研究所,北京 100176; 2. 北京林业大学,北京 100083;
3. 陕西科技大学食品与生物工程学院,陕西 西安 710021; 4. 东北农业大学,黑龙江 哈尔滨 150038)

摘要:目的 建立基于气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)的靶向代谢组学方法进行海鸭蛋真伪鉴别。方法 采用气相色谱-质谱法,对海鸭蛋和笼养鸭蛋中的脂肪酸种类和含量进行分析检测。进一步应用化学计量学进行海鸭蛋与笼养鸭蛋的差异分析,筛选出可用于海鸭蛋真伪鉴别的标志物。结果 海鸭蛋中的 ω -3脂肪酸(Ω -3)在总脂肪酸中的占比高于笼养鸭蛋,差异有统计学意义($t=23.58, P<0.05$)。进一步通过主成分分析区分了海鸭蛋和笼养鸭蛋,通过正交偏最小二乘判别分析筛选出对海鸭蛋和笼养鸭蛋分类贡献最大的二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA),EPA 仅在海鸭蛋中检出,DHA 在海鸭蛋中的含量高于笼养鸭蛋。结论 EPA 和 DHA 可以作为标志物进行海鸭蛋的真伪鉴别。

关键词:代谢组学;海鸭蛋;气相色谱-质谱;脂肪酸;真伪鉴别

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)03-0250-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.03.006

Authentication method of sea duck eggs based on targeted metabolomics

ZHANG Qi^{1,2}, DONG Xuyang^{1,3}, XU Xiuli¹, YANG Xusheng^{1,4}, JIA Wei³, ZHANG Feng¹

(1. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Shaanxi Xi'an 710021, China; 4. Northeast Agricultural University, Heilongjiang Harbin 150038, China)

Abstract: Objective A targeted metabolomics based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was established for the authentication of sea duck eggs. **Methods** In this study, gas chromatography-mass spectrometry was used to characterize the fat acid profiles of sea duck eggs and cage duck eggs. Chemometrics was used to analyze the difference between sea duck eggs and cage duck eggs to screen the markers that could be used to identify the authenticity of sea duck eggs. **Results** Omega-3 fatty acids (Ω -3) in sea duck eggs account for a higher proportion of total fatty acids than cage duck eggs, and there were significant differences ($t=23.58, P<0.05$). Sea duck eggs and cage duck eggs were distinguished by principal component analysis. Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) were screened by orthogonal partial least squares discriminant analysis that contributed the most to the difference of sea duck eggs and cage duck eggs. EPA was detected only in sea duck eggs, and the content of DHA in sea duck eggs was higher than that of cage duck eggs. **Conclusion** This study showed that EPA and DHA can be used as a reliable marker to authenticate sea duck eggs.

Key words: Metabolomics; sea duck eggs; gas chromatography-mass spectrometry; fatty acids; authentication

收稿日期:2020-04-10

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFC1601600);国家“万人计划”科技创新领军人才项目

作者简介:张琪 女 本科生 研究方向为生物科学 E-mail: 13671277366@163.com

董旭阳 女 研究生 研究方向为食品质量与安全 E-mail: 861435400@qq.com

通信作者:贾玮 男 副教授 研究方向为食品质量与安全 E-mail: foodjiawei@aliyun.com

张峰 男 研究员 研究方向为食品安全 E-mail: fengzhang@126.com

张琪和董旭阳贡献相同,为共同第一作者。

鸭蛋作为磷脂和蛋白质的广泛来源,深受东亚国家(如中国和韩国)和东南亚国家(如新加坡、泰国和马来西亚)消费者的青睐^[1]。我国作为世界第一的鸭蛋生产和消费大国,目前蛋鸭年饲养量在3亿只以上,鸭蛋年产量约为550万吨^[2]。DB45/T 1614—2017《海鸭蛋生产管理规范》^[3]中指出,海鸭蛋是放养于海边滩涂区域,以鱼、虾、蟹类、贝类及藻类为主要食物的蛋鸭所产的蛋。海鸭蛋的养殖模式以放养为主,舍养为辅。海鸭蛋的放养时间根据涨潮和退潮的时间来合理安排。在退潮期,鸭子被放养在沿海滩涂区,以散落在滩涂上的鱼、虾、蟹类、贝类和

藻类等食物为食。在涨潮期,鸭子被赶回舍棚,补充水分和饲料,从而确保其营养均衡^[4]。海鸭蛋主要分布于广西、广东、浙江、山东等沿海地区,含有丰富的营养。相关研究^[5-7]表明海鸭蛋的类胡萝卜素总量和脂肪酸总量高于普通鸭蛋,赖氨酸和蛋氨酸的含量分别比普通鸭蛋高 11.1% 和 10.0%,硒和锗等微量元素的含量也明显高于普通鸭蛋。

随着人们对禽蛋品质的重视,海鸭蛋越来越受到消费者欢迎,海鸭蛋产业迎来了快速发展时期。广西北海市作为我国海鸭蛋的主要产区,其海鸭蛋市场份额占我国的 70%,2015—2019 年产值增长了 25 倍。据北海市蛋品协会统计,2018 年北海海鸭蛋产值已达 6 亿多元,比上年增长 50%,年产量在 4 亿枚左右。2019 年上半年海鸭蛋产量已经达到 2018 年全年年产量,呈现出快速增长的态势^[8];因此,海鸭蛋产业具有广阔的市场前景,能够带来可观的利润。但我国当前并未制定海鸭蛋产品质量和生产规范的国家标准和行业标准。只有广西颁布的地方标准,且主要关注的是生产过程中技术管理规范,并不涉及检测和鉴别指标,对于海鸭蛋产品的分类和鉴别方法也并未明确规定。加上海鸭蛋高价格的特点,这使得目前市场上以笼养鸭蛋(笼养模式下经饲料喂养的蛋鸭所产)假冒海鸭蛋进行销售的情况十分普遍,海鸭蛋已经成为了食品欺诈的对象;因此,开发海鸭蛋的鉴别方法,对海鸭蛋产业的健康稳步发展具有重大意义。

目前尚未见到海鸭蛋的鉴别方法报道。本实验室前期应用了色谱-质谱联用技术,比较了海鸭蛋与笼养鸭蛋的化学成分及指纹图谱,发现很难利用该技术进行区分。最近,靶向代谢组学成为食品真实属性研究中的有力工具,该技术旨在通过研究特定化合物或某一类化合物,完成对不同样品组的区分并找到可以用于食品真伪鉴别的标志物^[9]。在靶向代谢组学中,根据待研究的特定化合物或某一类化合物的特点合理选择数据采集方法,利用 Simca 等数据处理软件对采集到的数据进行分析。通过应用靶向代谢组学方法,DIITGEN 等^[10]对巴西种植的两种植基因型黑米中酚类成分进行分析,发现香草酸和槲皮素-3-邻-葡萄糖苷是区分两种不同基因型黑米的标志物。JOHNSON 等^[11]利用靶向代谢组学揭示了笼养鸡蛋与谷仓鸡蛋间的差异,研究发现,鸡蛋蛋黄中的脂类化合物可以用来区分笼养鸡蛋与谷仓鸡蛋。同时大量研究表明,禽类饲喂或采食食物的不同,尽管不会造成禽蛋中水分、蛋白质、脂肪等总量发生明显变化,但可能引起脂肪酸组成发生一定的改变^[12-13];因此,本试验建立了基

于气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)的靶向代谢组学方法,对海鸭蛋和笼养鸭蛋中的脂肪酸种类和含量进行分析检测,并利用化学计量学对海鸭蛋和笼养鸭蛋中的脂肪酸进行差异分析,筛选出海鸭蛋中的特征脂肪酸组分,为海鸭蛋真伪鉴别提供了技术方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

GCMS-QP2010 plus 型气相色谱-质谱联用仪[日本岛津,配备 HP-88 色谱柱(100 m×0.25 mm, 0.20 μm)]、0.22 μm 滤膜、HH-4 数显恒温水浴锅、Milli-R04 纯水仪、超高速冷冻离心机。

正己烷和甲醇均为色谱纯,氢氧化钠和氯化钠均为优级纯,BF₃-MeOH(15%,德国 CNW);十一烷酸甲酯和 37 种脂肪酸甲酯混合标准储备溶液(美国 Sigma),采用正己烷将十一烷酸甲酯和 37 种脂肪酸甲酯混合标准储备溶液稀释至合适浓度备用。

1.1.2 样品采集

随机采集 18 枚海鸭蛋于广西北海市当地的海鸭蛋养殖场,18 枚笼养鸭蛋于湖北安陆市当地笼养鸭蛋养殖场。鸭蛋重量在 65~75 g,蛋鸭品种均为金定鸭(*Anas platyrhynchos*),蛋龄均在 30 周左右,样品储存在 4 °C 条件下,采样 3 d 内进行样品处理分析。海鸭蛋养殖场和笼养鸭蛋养殖场均严格遵循 ISO 22000:2005 食品安全管理体系和良好操作规范(good manufacturing practice, GMP)管理体系。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

将蛋黄与蛋白手动分离后,放在滤纸上滚动以除去粘连的蛋清,之后将蛋黄排入 5 mL 离心管中,待用。分别称取 50 mg 样品于 2 mL 离心管中,加入 1 mL 二氯甲烷-甲醇(1:1, V/V),涡旋震荡 3 min 后,10 000 r/min 离心 10 min(离心半径 9 cm),取全部上清液于 50 mL 离心管中,加入 0.1 mol/L 的 KOH-MeOH 溶液 3 mL,60 °C 恒温水浴反应 30 min。取出冷却后加入 3 mL BF₃-MeOH(15%)溶液,恒温水浴加热 30 min 后冷却。加入 4 mL 正己烷和 4 mL 饱和食盐水溶液,涡旋震荡 1 min,6 000 r/min 离心 5 min(离心半径 8 cm),取正己烷层过 0.22 μm 滤膜后稀释 10 倍进样分析。

1.2.2 仪器条件

色谱:采用配备 HP-88(100 m×0.25 mm, 0.20 μm)色谱柱的气相色谱-质谱联用仪。采用分流进样,分流比为 10:1。柱流量设定为 0.98 mL/min。

升温程序如下:100℃保持5 min,之后以4℃/min的速度升温至240℃,在240℃的温度下保持20 min。进样量为1 μL。

质谱:载气为高纯氦气。接口温度、离子源温度和四极杆温度分别设定为250、230和100℃。电子轰击离子源:70 eV,扫描范围为50~900 m/z 。

1.2.3 脂肪酸的定性定量分析

采用37种脂肪酸标准品进行本地数据库的构建。将样品中检测到脂肪酸甲酯化合物的谱峰数据与本地自建数据库中的质谱图进行对比,从而对该化合物进行定性分析。采用内标法定量,将十一烷酸甲酯内标溶液稀释至5 mg/L。

1.3 统计学分析

数据采用Excel、 t 检验和Simca进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有的试验数据均采用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 脂肪酸分析方法

2.1.1 分析方法的优化

作为影响气相色谱分离效果的主要因素之一,合适的样品量可以保证良好的色谱峰分离度以及定量分析正确性。在进样体积一定的条件下,分流比的大小决定了样品进样量。若分流比过小则样品的进样量过大,目标组分的保留时间缩短,色谱峰的分度降低;若分流比过大则样品的进样量过小,虽然改善了各组分散谱峰的分度,但微量组分的色谱峰会很小^[14];因此,合适的分流比应该在确保待测组分分离度的前提下同时兼顾微量组分的响应值。本研究比较了在分流比为5:1、10:1、30:1和50:1四种条件下,脂肪酸的分离效果。结果显示,在分流比为5:1时, α -亚麻酸和二十碳一烯酸的分离度较低($R=1.2$)。逐渐提高分流比,发现在分流比为10:1($R=1.5$)、30:1($R=1.6$)和50:1($R=1.8$)时,分离度有所改善。分离度计算公式见公式1。但在分流比为30:1和50:1时,待测组分检出限较分流比为10:1时提高了3~5倍, γ -亚麻酸、二十碳一烯酸和二十碳二烯酸的低浓度组分无法检出;因此,在本试验中,选用分流比为10:1,在实现各组分良好分离的同时又能进行低浓度物质的准确定量。

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (1)$$

式中: R 为分离度; t_{R2} 为相邻两峰中后一峰的保留时间; t_{R1} 为相邻两峰中前一峰的保留时间; W_1 为相邻两峰中前一峰的峰宽; W_2 为相邻两峰中后一

峰的峰宽。

2.1.2 脂肪酸参数

在本试验中,利用37种脂肪酸标准品建立本地数据库,通过与标准品保留时间的匹配进行样品中脂肪酸的定性分析,之后利用内标法进行定量分析。37种脂肪酸的保留时间、线性范围、检出限、线性方程和相关系数见表1。在1~90 mg/L的线性范围内,相关系数均大于0.99,线性良好。脂肪酸的检出限为0.004~0.763 mg/L。

2.2 海鸭蛋与笼养鸭蛋间脂肪酸含量比较分析

2.2.1 总脂肪酸的含量

在本试验中,采用内标法计算各脂肪酸的含量,总脂肪酸含量是各脂肪酸含量相加所得。总脂肪酸含量如图1所示,海鸭蛋蛋黄中的总脂肪酸含量[(21.85±1.64) mg/g]高于笼养鸭蛋蛋黄中的总脂肪酸含量[(20.50±1.45) mg/g]。但 t 检验的分析结果表明这两种鸭蛋蛋黄中总脂肪酸含量差异无统计学意义($t=2.01, P>0.05$)。

2.2.2 饱和脂肪酸的含量

对样品中的饱和脂肪酸进行分析,其含量如图2所示。海鸭蛋中的饱和脂肪酸含量[(29.78±2.07) g/100 g 总脂肪酸]低于笼养鸭蛋中的饱和脂肪酸含量[(31.84±1.47) g/100 g 总脂肪酸],差异无统计学意义($t=1.98, P>0.05$)。两种鸭蛋蛋黄中均未检出饱和脂肪酸C4:0~C13:0和C20:0~C24:0,检出肉豆蔻酸、十五烷酸、十六烷酸、十七烷酸、硬脂酸五种饱和脂肪酸,含量范围为0.25~23.85 g/100 g 总脂肪酸,具体见表2。

2.2.3 不饱和脂肪酸的含量

对样品中的不饱和脂肪酸进行分析,单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸、 Ω -6和 Ω -3占总脂肪酸的含量如图3所示。研究发现,海鸭蛋中的单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸、 Ω -6和 Ω -3含量分别为(51.15±2.57)、(18.21±2.69)、(13.70±2.67)、(4.51±0.49) g/100 g 总脂肪酸。笼养鸭蛋中的单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸、 Ω -6和 Ω -3含量分别为(52.68±2.16)、(15.42±2.08)、(14.02±1.98)和(1.40±0.27) g/100 g 总脂肪酸。两种鸭蛋中 Ω -3含量差异有统计学意义($t=23.58, P<0.05$)。 Ω -3脂肪酸是第一个不饱和键在第三个和第四个碳原子之间(从离羟基最远端的碳原子算起)的多不饱和脂肪酸,主要包括 α -亚麻酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸。 Ω -3脂肪酸作为人体需要的重要生物活性物质,在促进人体生长发育,防治糖尿病、心脑血管疾病,抗癌、抗炎和降血脂等方面发挥着重要的生理功能和保健作用^[15-16]。

表1 脂肪酸的保留时间、线性范围、线性方程、相关系数和检出限

Table 1 Retention time, linear equations, correlation coefficients and LOD of fatty acids

脂肪酸	结构简式	保留时间 /min	线性范围 / (mg/L)	线性方程	相关系数 r^2	检出限 / (mg/L)
丁酸	C4:0	9.27	2~60	$y = 145421.7x - 78357.20$	0.998 1	0.042
己酸	C6:0	11.57	2~60	$y = 291282.6x - 420673.8$	0.998 2	0.006
辛酸	C8:0	14.85	2~60	$y = 378427.4x - 546997.2$	0.998 0	0.006
癸酸	C10:0	19.18	2~60	$y = 398621.5x - 427089.3$	0.998 6	0.004
十一烷酸	C11:0	21.45	1~30	$y = 399199.2x - 139322.3$	0.996 0	0.014
月桂酸	C12:0	23.67	2~60	$y = 421977.3x - 492599.7$	0.998 5	0.004
十三烷酸	C13:0	25.80	1~30	$y = 411646.6x - 230628.3$	0.998 3	0.019
肉豆蔻酸	C14:0	27.83	2~60	$y = 422685.3x - 488429.0$	0.998 5	0.008
十四碳一烯酸	C14:1N5	29.27	1~30	$y = 194121.1x - 84408.00$	0.998 3	0.136
十五烷酸	C15:0	29.75	1~30	$y = 406123.1x - 235753.6$	0.998 1	0.013
十五碳一烯酸	C15:1N5	31.15	1~30	$y = 201543.8x - 90032.90$	0.999 0	0.112
十六烷酸	C16:0	31.59	3~90	$y = 401249.3x - 644632.1$	0.998 6	0.007
十六碳一烯酸	C16:1N7	32.71	1~30	$y = 151280.9x - 23547.40$	0.999 1	0.220
十七烷酸	C17:0	33.32	1~30	$y = 364031.5x - 138794.1$	0.998 7	0.024
十七碳一烯酸	C17:1N7	34.41	1~30	$y = 164567.6x - 40792.90$	0.998 6	0.131
硬脂酸	C18:0	34.98	2~60	$y = 370076.8x - 353999.4$	0.998 6	0.014
反-十八碳一烯酸	C18:1N9T	35.60	1~30	$y = 142101.3x - 53948.38$	0.999 0	0.142
油酸	C18:1N9C	35.91	2~60	$y = 149287.5x - 121027.3$	0.998 5	0.078
反-十八碳二烯酸	C18:2N6T	36.60	1~30	$y = 158948.7x - 58252.32$	0.998 6	0.089
亚油酸	C18:2N6C	37.28	1~30	$y = 162315.9x - 60220.11$	0.999 0	0.082
二十烷酸	C20:0	38.06	2~60	$y = 350473.7x - 308778.9$	0.998 6	0.022
γ -亚麻酸	C18:3N6	38.26	1~30	$y = 158478.2x - 78823.42$	0.998 4	0.108
α -亚麻酸	C18:3N3	38.84	1~30	$y = 182303.7x - 51200.89$	0.998 5	0.079
二十碳一烯酸	C20:1N9	38.94	1~30	$y = 177480.1x - 71312.69$	0.998 4	0.286
二十一烷酸	C21:0	39.49	1~30	$y = 323812.1x - 105647.5$	0.999 0	0.024
二十碳二烯酸	C20:2N6	40.25	1~30	$y = 155357.3x - 45025.76$	0.998 7	0.166
二十二烷酸	C22:0	40.91	2~60	$y = 323888.7x - 331559.8$	0.998 5	0.023
顺-8,11,14-二十碳三烯酸	C20:3N6	41.21	1~30	$y = 131348.8x - 84495.92$	0.998 7	0.763
顺-11,14,17-二十碳三烯酸	C20:3N3	41.77	1~30	$y = 169016.8x - 107862.4$	0.998 5	0.042
二十二碳一烯酸	C22:1N9	41.81	1~30	$y = 242614.1x - 95821.12$	0.998 7	0.103
花生四烯酸	C20:4N6	41.94	1~30	$y = 134160.7x - 46218.98$	0.998 2	0.121
二十三烷酸	C23:0	42.31	1~30	$y = 311041.8x - 156687.7$	0.998 7	0.059
二十二碳二烯酸	C22:2N6	43.18	1~30	$y = 147839.5x - 108679.5$	0.998 6	0.292
二十碳五烯酸	C20:5N3	43.61	1~30	$y = 146755.3x - 44793.34$	0.997 9	0.233
二十四烷酸	C24:0	43.80	2~60	$y = 296695.9x - 332366.1$	0.998 5	0.023
二十四碳一烯酸	C24:1N9	44.80	1~30	$y = 156161.9x - 54464.80$	0.997 4	0.195
二十二碳六烯酸	C22:6N3	48.02	1~30	$y = 131237.5x - 54973.64$	0.998 1	0.169

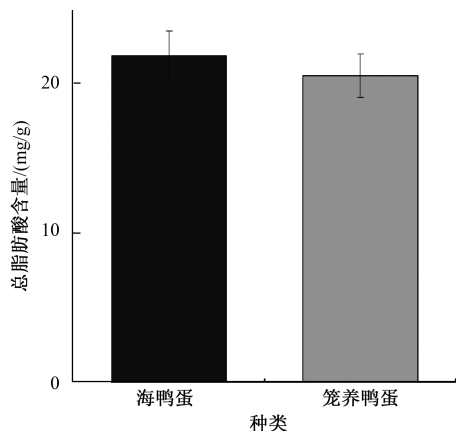


图1 海鸭蛋和笼养鸭蛋中的总脂肪酸含量

Figure 1 Total fatty acids in cage sea eggs and cage duck eggs

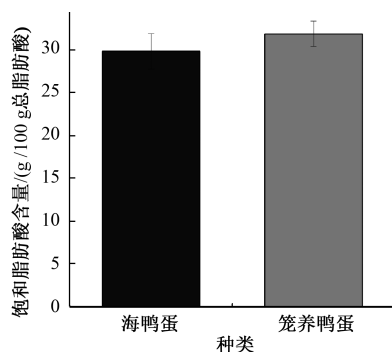


图2 海鸭蛋和笼养鸭蛋中的饱和脂肪酸含量

Figure 2 Total saturated fatty acid content in sea and cage duck eggs

表2 海鸭蛋和笼养鸭蛋蛋黄中的饱和脂肪酸含量($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Fatty acid content in sea and cage duck eggs

饱和脂肪酸	结构简式	脂肪酸含量/(g/100 g 总脂肪酸)	
		海鸭蛋	笼养鸭蛋
丁酸	C4:0	未检出	未检出
己酸	C6:0	未检出	未检出
辛酸	C8:0	未检出	未检出
癸酸	C10:0	未检出	未检出
十一烷酸	C11:0	未检出	未检出
月桂酸	C12:0	未检出	未检出
十三烷酸	C13:0	未检出	未检出
肉豆蔻酸	C14:0	0.94 ± 0.12	0.94 ± 0.07
十五烷酸	C15:0	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.03
十六烷酸	C16:0	22.96 ± 1.82	23.85 ± 1.39
十七烷酸	C17:0	0.35 ± 0.10	0.25 ± 0.04
硬脂酸	C18:0	5.13 ± 0.41	5.77 ± 0.67
二十烷酸	C20:0	未检出	未检出
二十一烷酸	C21:0	未检出	未检出
二十二烷酸	C22:0	未检出	未检出
二十三烷酸	C23:0	未检出	未检出
二十四烷酸	C24:0	未检出	未检出

如表3所示,两种鸭蛋中 γ -亚麻酸($t=6.04, P<0.05$)、二十碳五烯酸($t=6.04, P<0.05$)和二十二碳六烯酸($t=26.72, P<0.05$)的含量均差异有统计学意义。其中二十二碳六烯酸的差异最明显,二十碳五烯酸仅在海鸭蛋中检出。二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸作为最有价值的饱和脂肪酸之一,广泛存在于深海鱼油和各种藻类中,是

表3 海鸭蛋和笼养鸭蛋中的不饱和脂肪酸含量($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Unsaturated fatty acid content in sea and cage duck eggs

不饱和脂肪酸	结构简式	脂肪酸含量/(g/100 g 总脂肪酸)	
		海鸭蛋	笼养鸭蛋
十四碳一烯酸	C14:1N5	未检出	未检出
十五碳一烯酸	C15:1N5	未检出	未检出
十六碳一烯酸	C16:1N7	2.55 ± 0.31	1.98 ± 0.30
十七碳一烯酸	C17:1N7	未检出	未检出
反-十八碳一烯酸	C18:1N9T	0.31 ± 0.08	0.30 ± 0.07
油酸	C18:1N9C	47.82 ± 2.66	49.83 ± 2.18
反-十八碳二烯酸	C18:2N6T	未检出	未检出
亚油酸	C18:2N6C	8.81 ± 2.52	8.96 ± 1.49
γ -亚麻酸	C18:3N6	0.22 ± 0.04 ^a	0.40 ± 0.12 ^b
α -亚麻酸	C18:3N3	0.50 ± 0.04	0.45 ± 0.11
二十碳一烯酸	C20:1N9	0.30 ± 0.08	0.46 ± 0.08
二十碳二烯酸	C20:2N6	0.30 ± 0.02	0.37 ± 0.14
顺-8,11,14-二十碳三烯酸	C20:3N6	0.53 ± 0.04	0.63 ± 0.09
顺-11,14,17-二十碳三烯酸	C20:3N3	未检出	未检出
二十二碳一烯酸	C22:1N9	未检出	未检出
花生四烯酸	C20:4N6	未检出	未检出
二十二碳二烯酸	C22:2N6	未检出	未检出
二十碳五烯酸	C20:5N3	0.78 ± 0.14 ^a	未检出 ^b
二十四碳一烯酸	C24:1N9	未检出	未检出
二十二碳六烯酸	C22:6N3	3.99 ± 0.47 ^a	0.95 ± 0.11 ^b

注:同行字母不同表示差异有统计学意义, $P<0.05$

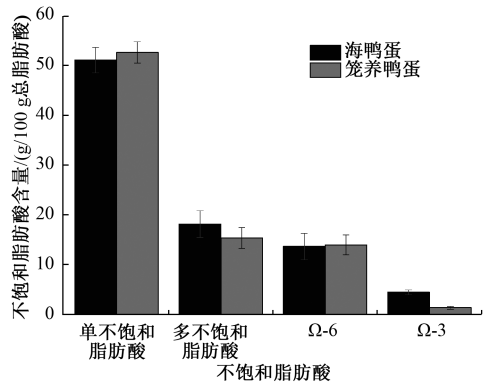


图3 海鸭蛋和笼养鸭蛋中的不饱和脂肪酸含量

Figure 3 Unsaturated fatty acid content in sea duck eggs and cage duck eggs

动物体内生物膜的重要组成部分以及一些激素的主要前体物质,是大脑发育过程中的重要物质之一^[17]。具有抗氧化、抗炎以及免疫调节等多种生理功能^[18-20]。KRALIK 等^[21]研究发现,可以通过增加蛋鸡饲料中藻类或鱼油的比例来增加 100 g 鸡蛋中所含的二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的含量,这表明藻类和鱼油对禽蛋蛋黄中二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的沉积具有重要意义;因此,推测海鸭蛋中二十二碳六烯酸含量较高的原因是生产海鸭蛋的蛋鸭其食物中含有丰富的鱼类和藻类。

2.3 海鸭蛋与笼养鸭蛋的靶向代谢组学鉴别

数据采集和数据处理是靶向代谢组学的重要

组成部分。本试验利用气相色谱-质谱采集数据,通过化学计量学收集的数据中筛选出可以用于区分海鸭蛋和笼养鸭蛋的差异标志物,帮助进行海鸭蛋认证。数据处理软件如 Simca 可以用来实现化学计量学分析,因此,利用 Simca 对采集到的脂肪酸数据进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘判别分析 (partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA), 获得海鸭蛋和笼养鸭蛋的分离情况, 找到可用于海鸭蛋真伪鉴别的标志物。

PCA 作为一种广泛应用的数据降维算法, 目的在于将多个分析指标转化为少数几个互不相关的综合指标, 这些综合指标代表存在于变量中的各类信息。通过 PCA 得分图可以获得海鸭蛋和笼养鸭蛋的分离情况。图 4 显示了海鸭蛋和笼养鸭蛋的 PCA 得分图, 从图中可以看出海鸭蛋和笼养鸭蛋的明显区分。但 PCA 作为一种无监督的统计分析模型, 虽然可以呈现出差异, 但并不能区分这些差异是来源于组内样品还是组间样品。为了更具体地了解不同鸭蛋样品组的差异来源, 又进一步进行了 PLS-DA 分析。

PLS-DA 模型能够概述提取到的代谢物 (变量) 和样品 (观察组) 之间的关系, 并揭示变量在观察组中的变化趋势和偏差行为。在建立的 PLS-DA 模型中, $R^2 X_{cum}$ (X 变量中变化的解释能力)、 $R^2 Y_{cum}$ (Y 变量中变化的解释能力) 和 Q^2_{cum} (预测能力) 分别为 0.599、0.946 和 0.933, 这表明该模型拟合数据效果良好。但作为有监督的分类模型, PLS-DA 具有较高的数据过拟合风险, 即建立的模型可以很好地区分样品, 但进行新的样本集预测时却表现很差^[22], 因此, 需要对建立的模型进行置换检验。置换检验是将样品的分组标记随机打乱, 对样品进行顺序上的置换, 从而重新进行建模和预测的过程, 一般置换检验次数设置为 200 次。作为一个可靠的有监督模型, 要求 Q^2 回归线在 y 轴上的截距

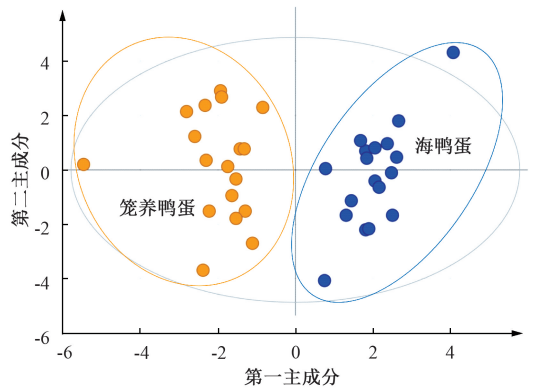


图 4 海鸭蛋和笼养鸭蛋中脂肪酸组成的 PCA 得分图
Figure 4 PCA score plot of sea duck eggs and cage duck eggs

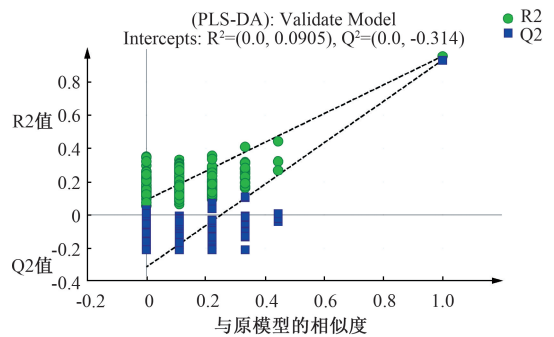


图 5 PLS-DA 模型的置换检验图
Figure 5 Permutation test plots of PLS-DA model

小于 0。在置换检验结果中 (图 5), Q^2 回归线在 y 轴上的截距为 -0.314, 明显小于 0, 这表明所建立的 PLS-DA 模型具有可靠性。

在 PLS-DA 模型产生的得分图 (图 6a) 中, 可以明显区分海鸭蛋和笼养鸭蛋, 并且样品组内的样品得到较好聚类。PLS-DA 模型产生的载荷图 (图 6b) 可用于筛选对两组样本组间分类有贡献的化合物, 离原点越远的点对分类越有贡献。在本试验中, 二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸对海鸭蛋和笼养鸭蛋的分类贡献最大。其中二十碳五烯酸仅在海鸭蛋中检出, 二十二碳六烯酸在海鸭蛋中的含量高

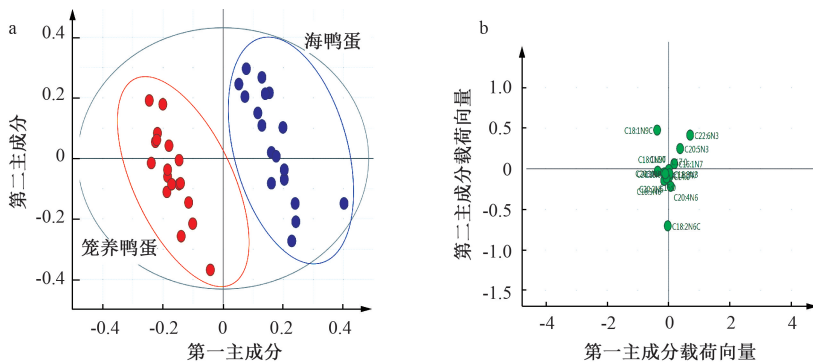


图 6 海鸭蛋和笼养鸭蛋中脂肪酸组成的 PLS-DA 得分图 (a) 与载荷图 (b)
Figure 6 PLS-DA score plot (a) and loading plot (b) of sea duck eggs and cage duck eggs

于笼养鸭蛋,这表明二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸可以作为海鸭蛋的标志物,进行海鸭蛋产品的真实性认证。

3 小结

本试验建立了靶向代谢组学方法进行海鸭蛋真伪鉴别研究。气相色谱-质谱用来检测海鸭蛋和笼养鸭蛋中的脂肪酸,试验发现,海鸭蛋中 Ω -3在总脂肪酸中的占比高于笼养鸭蛋,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中二十碳五烯酸仅在海鸭蛋中检出,二十二碳六烯酸的差异最明显。进一步利用化学计量学对海鸭蛋和笼养鸭蛋中的脂肪酸进行统计分析,发现二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸可作为海鸭蛋的标志物,进行海鸭蛋产品真实性认证。本试验为海鸭蛋真伪鉴别提供了技术方法。

参考文献

- [1] XU L L, ZHAO Y, XU M S, et al. Changes in aggregation behavior of raw and cooked salted egg yolks during pickling [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 80(1): 68-77.
- [2] 王晓峰,钱勇. 广西钦州市蛋鸭产业现状及发展[J]. *中国家禽*, 2019, 41(15): 74-76.
- [3] 广西壮族自治区质量技术监督局. 海鸭蛋生产管理规范: DB45/T 1614—2017 [S]. 广西: 广西壮族自治区质量技术监督局, 2017.
- [4] 张华智,韦子先,杨照海,等. 钦州海鸭蛋产业现状及发展对策 [J]. *广西农学报*, 2012, 27(4): 56-58.
- [5] 梁春玮. 广西北部湾海鸭蛋营养及功能性组分的研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2013.
- [6] 张华智,韦子先,郭光霞,等. 钦州海鸭蛋的形成与蛋品质分析[J]. *中国畜禽种业*, 2014, 10(6): 134-136.
- [7] 蒋天成,刘守廷,梁利诚,等. 微波消解 ICP-MS 法测定广西北部湾海鸭蛋中硒和锗的含量[J]. *化学分析计量*, 2012, 21(4): 27-30.
- [8] 罗远燕. 厉害||北海海鸭蛋日销 45 万枚! 全国 70% 的海鸭蛋都是从北海卖出去的[N]. *北海晚报*, 2018-04-26(04).
- [9] JOHNSON A E, SIDWICK K L, PIRGOZLIEV V R, et al. Metabonomic profiling of chicken eggs during storage using high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(12): 7489-7494.
- [10] DITTGEN C L, HOFFMANN J F, CHAVES F C, et al. Discrimination of genotype and geographical origin of black rice grown in Brazil by LC-MS analysis of phenolics [J]. *Food Chem*, 2019, 288(3): 297-305.
- [11] JOHNSON A E, SIDWICK K L, PIRGOZLIEV V R, et al. The use of metabolomics to uncover differences between the small molecule profiles of eggs from cage and barn housing systems[J]. *Food Control*, 2019, 100(1): 165-170.
- [12] SAMMAN S, KUNG F P, CARTER L M, et al. Fatty acid composition of certified organic, conventional and omega-3 eggs [J]. *Food Chem*, 2009, 116(4): 911-914.
- [13] Fraeye I, BRUNEEL C, LEMAHIEU C, et al. Dietary enrichment of eggs with omega-3 fatty acids: a review [J]. *Food Research International*, 2012, 48(2): 961-969.
- [14] 李颖. 气相色谱法检测食品中脂肪酸方法的优化[J]. *食品安全导刊*, 2018(30): 128-135.
- [15] KUMAR F, TYAGI P K, MIR N A, et al. Dietary flaxseed and turmeric is a novel strategy to enrich chicken meat with long chain ω -3 polyunsaturated fatty acids with better oxidative stability and functional properties [J]. *Food Chem*, 2020, 305: 1-8.
- [16] LI W J, LIU X, WANG J Z, et al. Synthesis and characterization of structural lipids with a balanced ratio of n-6/n-3 from mulberry seed oil and α -linolenic acid using a microfluidic enzyme reactor [J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2020, 120(12): 21-32.
- [17] 李湛. EPA DHA 对体内脂质代谢影响的研究进展 [J]. *生物技术世界*, 2015(1): 117-118.
- [18] DECKELBAUM R J, CALDER P C. Is it time to separate EPA from DHA when using omega-3 fatty acids to protect heart and brain? [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2020, 23(2): 65-67.
- [19] GHASEMI-FARD S, WANG F L, SINCLAIR A J, et al. How does high DHA fish oil affect health? A systematic review of evidence [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 59(11): 1684-1727.
- [20] 魏凤,段力萌. 微藻二十二碳六烯酸菌种选育和发酵培养技术研究 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(23): 7973-7980.
- [21] KRALIK Z, KRALIK G, GRČEVIĆ M, et al. Microalgae *Schizochytrium limacinum* as an alternative to fish oil in enriching table eggs with polyunsaturated fatty acids [J]. *J Sci Food Agricul*, 2019, 100(2): 1-15.
- [22] CUBERO-LEON E, DE RUDDER O, MAQUET A. Metabolomics for organic food authentication: results from a long-term field study in carrots [J]. *Food Chem*, 2018, 239(6): 760-770.