

# 中华草龟内脏油的水酶法提取 及其不同部位脂质组成分析

郭晓璐<sup>1</sup>, 伍文彬<sup>2</sup>, 黄海波<sup>1</sup>, 李 想<sup>1</sup>, 胡蒋宁<sup>1</sup>

(1. 大连工业大学 食品学院, 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁 大连 116034; 2. 南昌大学 生命科学与食品工程学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047)

**摘要:**采用单因素实验对水酶法提取中华草龟内脏油工艺进行优化, 采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)和超高效液相色谱-电喷雾电离-四极杆时间质谱法(UPLC-ESI-Q-TOF-MS)分析中华草龟内脏、脂肪块、卵、肌肉脂质的脂肪酸组成、脂质组成。结果表明, 水酶法提取中华草龟内脏油最优工艺条件为使用碱性蛋白酶、酶解时间 0.5 h、酶添加量(以内脏粉质量计)0.5%、酶解温度 55 °C、pH 7、料液比 1:4, 在此条件下提油率为(66.56 ± 1.25)%。中华草龟 4 个部位脂质中检出包括异构体在内的 16 种脂肪酸, 检出 139 种脂质成分, 主要为甘油酯, 还有少量的磷脂、鞘磷脂和甘二酯。主成分分析表明, 脂肪块和内脏中的脂质成分相似, 而与卵、肌肉中脂质组成有较大差异。综上, 中华草龟脂质具有作为食用油脂开发的潜力。

**关键词:**中华草龟; 水酶法; 超高效液相色谱-电喷雾电离-四极杆飞行时间质谱(UPLC-ESI-Q-TOF-MS); 脂质组成

中图分类号: TS254; TS227

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2022)01-0010-08

## Aqueous enzymatic extraction of viscera oil and lipid composition in different parts of *Chinemys reevesiis*

GUO Xiaolu<sup>1</sup>, WU Wenbin<sup>2</sup>, HUANG Haibo<sup>1</sup>, LI Xiang<sup>1</sup>, HU Jiangning<sup>1</sup>

(1. National Engineering Research Center of Seafood, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China; 2. State Key Lab of Food Science and Technology, College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** The aqueous enzymatic extraction conditions of oil from viscera of *Chinemys reevesiis* were optimized by single factor experiment, and the fatty acid composition and lipid composition of viscera, fat, egg and meat of *Chinemys reevesiis* were analyzed by GC-MS and UPLC-ESI-Q-TOF-MS, respectively. The results showed that a high yield ((66.56 ± 1.25)%) of *Chinemys reevesiis* viscera oil extracted by aqueous enzymatic method were obtained under the optimal conditions of Alkaline protease dosage 0.5% (based on the mass of viscera), enzymolysis time 0.5 h, enzymolysis temperature 55 °C, pH 7 and solid-liquid ratio 1:4. A total of 16 fatty acids including isomers were detected from the four parts of *Chinemys Reevesiis*, and 139 lipid components were detected. In the lipid triglyceride was the most, and there were small amounts of diglycerides, phospholipids and sphingolipids. Through principal

component analysis, it was found that the lipid compositions in fat and viscera were similar, but it was different from those in egg and meat. It was concluded that *Chinemys reevesiis* lipid had the development potential to be used as edible oil.

**Key words:** *Chinemys reevesiis*; aqueous enzymatic method; ultra performance liquid

收稿日期: 2021-03-15; 修回日期: 2021-09-09

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFC1602306)

作者简介: 郭晓璐(1997), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品加工(E-mail) dlpugxl@163.com。

通信作者: 胡蒋宁, 教授, 博士(E-mail) 5103725@qq.com。

chromatography – electrospray ionization – quadrupole time – of – flight mass spectrometry (UPLC – ESI – Q – TOF – MS); lipid composition

中华草龟,又称乌龟、金龟等,主要分布在中国、韩国、日本等亚洲部分地区<sup>[1-2]</sup>,由于其适应性强、易繁育、寿命长,经常被用作食品和中药材,具有很高的经济价值<sup>[3-4]</sup>。中华草龟富含多种营养物质,龟肉的粗蛋白质中至少包含17种氨基酸,龟肉的脂肪中富含饱和脂肪酸。据报道,龟蛋白肽具有多种医疗作用,可以被用作抗氧化剂和抗肿瘤剂等<sup>[5]</sup>。龟甲是一味名贵的中药,其主要含胶质、角蛋白、脂肪、钙盐等多种营养成分<sup>[6]</sup>。

目前,随着龟鳖养殖业规模的不断扩大,除了对龟甲、龟肉等有经济价值部位的传统利用外,其他部位利用率不高,大多被丢弃,在某种程度上造成资源浪费且污染环境<sup>[7]</sup>。龟鳖副产物中含有许多重要的营养成分,如蛋白质、脂类等,尤其是脂类中饱和脂肪酸含量丰富<sup>[8]</sup>。因此,对龟鳖副产物中油脂的提取和利用有助于提高龟鳖资源的综合利用率和商业价值。

近年来,水酶法因安全、环保、设备要求低等优点<sup>[9-10]</sup>被广泛应用于植物种子中油脂的提取<sup>[11-15]</sup>,而目前还未见利用水酶法提取中华草龟内脏油(*Chinemys reevesii* viscera oil, CRVO)的相关研究报道。水酶法中酶的种类与添加量、酶解温度、pH、酶解时间等因素均会显著影响提油率<sup>[16-17]</sup>。因此,有必要探索从龟鳖副产物中高效提油的水酶法条件。

通过超高效液相色谱 – 电喷雾电离 – 四极杆飞行时间质谱法(UPLC – ESI – Q – TOF – MS)能够对脂质组成进行定性和定量分析,全面了解其营养价值并加以利用,并因其鉴定不同脂质的可靠性,以及不同组分的高效率分离和离子抑制效果小等优点而被广泛应用<sup>[18-20]</sup>。如Zhang等<sup>[21]</sup>利用此方法分析鲍鱼不同部位的脂质组成,共鉴定出10种类型,其中包括34种脂质成分,如磷脂酰胆碱(PC)、甘油三酯(TAG)等。

针对中华草龟副产物,本文采用单因素实验优化了水酶法提取中华草龟内脏油的工艺条件;同时,通过气相色谱 – 质谱(GC – MS)和UPLC – ESI – Q – TOF – MS对中华草龟不同部位的脂质进行全面的分析和评价,为有效提高中华草龟副产物的综合利用,延长产业链以及增加龟鳖产业的附加

值提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中华草龟,安徽蓝田龟鳖有限公司。

碱性蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶,美国Sigma公司;甲醇、乙酸铵,均为色谱纯,大连博诺有限公司;其他试剂均为分析纯。

Agilent 7890A/5975C气相色谱质谱联用仪,美国Agilent公司;超高效液相色谱 – 电喷雾电离 – 四极杆飞行时间质谱联用仪,德国Bruker公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 水酶法提取中华草龟内脏油

取中华草龟内脏,洗净、冻干、粉碎并真空包装,置于-4℃冷藏,并在7d内使用。称取一定量中华草龟内脏冻干粉,添加一定量的纯净水和蛋白酶,调节至设定的温度和pH,在旋转水浴中磁力搅拌酶解一定时间后,95℃水浴10min灭酶;取出并在7800g离心10min,用胶头滴管吸出上层油相,烘干至恒重并记录其质量。按下式计算提油率(Y)。

$$Y = m_a / m_b \times 100\% \quad (1)$$

式中: $m_a$ 为中华草龟内脏油的质量,g; $m_b$ 为原料的质量,g。

#### 1.2.2 脂质的提取

采用Folch法<sup>[22]</sup>从中华草龟4个部位(肌肉、内脏、脂肪块、卵)提取脂质。

#### 1.2.3 脂质脂肪酸组成分析

分别精确称量提取的脂质0.1g,加入2.5mL KOH溶液(500g/L)和5mL乙醇(95%),在60℃磁力搅拌下加热2h进行皂化,然后冷却到室温用吸管吸走上层不皂化物,用3mL正己烷洗涤下层液体6次,然后用6mol/L HCl将下层液体pH调至2.0,再用3mL正己烷重复提取脂肪酸;用去离子水洗涤正己烷提取物至中性,然后用吸管吸走下层水相,保留上层有机相,氮吹干燥。加入正己烷使其质量浓度为10mg/mL,再加入2.0mL甲基化试剂(含1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的色谱级甲醇)。在70℃水浴中磁力搅拌1h,随后冷却至室温并加入1mL去离子水;静置收集上层,过无水硫酸钠后,过0.22μm有机滤膜,进气相色谱质谱(GC – MS)联用仪进行分析,GC – MS分析条件见文献[23]。

### 1.2.4 脂质组成的测定

取一定量提取的脂质溶于氯仿-甲醇(体积比1:5)中,配制成质量浓度为1 mg/mL的溶液,再用流动相B稀释到200  $\mu\text{g/mL}$ ,过0.22  $\mu\text{m}$ 有机滤膜,待UPLC-ESI-Q-TOF-MS分析<sup>[21]</sup>。

UPLC条件:Waters ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_8$ 柱(2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ );流动相A为超纯水,流动相B为甲醇-异丙醇(体积比85:15),流动相A、B中均含有0.1%的乙酸和10 mmol的乙酸铵;洗脱梯度为0~1 min 70% B,1~6 min 70%~75% B,6~10 min 75%~85% B,10~15 min 85%~88% B,15~32 min 88%~99.9% B,32~33 min 99.9%~75% B,33~35 min 75% B;流速0.4 mL/min;柱温50  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量5  $\mu\text{L}$ 。MS条件:采用正离子模式,质量扫描范围( $m/z$ )50~1 500,脱溶剂气流量8 L/min,溶剂温度200  $^{\circ}\text{C}$ ,喷雾器压力0.2 MPa,毛细管电压4 500 V,总循环时间1.2~1.8 s。仪器通过ESI-L低浓度调谐混合物进行校准。

### 1.2.5 脂质种类的鉴别和定量

通过Bruker Q-TOF MS系统采集数据,用甲酸钠校准曲线校准脂质的相对分子质量。采用开源软件MS-DIAL通过去卷积对小分子进行定性和定量,并且得到准确的相对分子质量信息。通过分析保留时间、质量精度和二级质谱与谱库(HMDB, ChEBI, FooDB)的匹配度最终实现脂质种类的鉴别。采用面积归一化法确定脂质的相对含量。通过序列方法对不同的样品、不同的平行样调整保留时间和质荷比偏差。

### 1.2.6 数据分析

所有实验均重复3次,结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。采用Origin9.5和SPSS16.0对实验数据进行统计分析。其中主成分分析(PCA)采用SIMCA 13.0进行统计。样品平均值之间的差异性使用Duncan法比较( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 水酶法提取中华草龟内脏油的单因素实验

#### 2.1.1 酶的种类和酶解时间对提油率的影响

固定料液比1:4、酶添加量0.5%(以中华草龟内脏粉质量计,下同)、酶解温度55  $^{\circ}\text{C}$ 和pH 7,选用4种商业酶,按1.2.1方法提取中华草龟内脏油,考察酶种类和酶解时间对中华草龟内脏提油率的影响,结果见图1。由图1可以看出,随着酶解时间的延长,4种蛋白酶的提油率均先增大后减小,碱性蛋

白酶和风味蛋白酶在酶解1.0 h时提油率达到最大,分别为(66.12  $\pm$  0.74)%和(64.29  $\pm$  0.70)%。而复合蛋白酶和中性蛋白酶的提油率在酶解2.0 h达到最大,分别为(62.76  $\pm$  0.44)%和(67.06  $\pm$  1.13)%。这可能与不同类型和来源的酶对蛋白质的水解作用不同有关。酶解时间在影响提油率的同时,还影响油品的品质,长时间加热搅拌,可能会引起油品的氧化导致其品质降低。因此,综合考虑,选择碱性蛋白酶对中华草龟内脏油进行酶解提取,酶解时间为0.5 h。

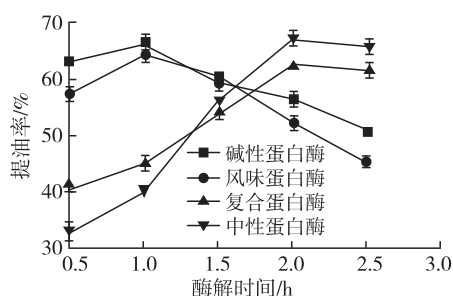
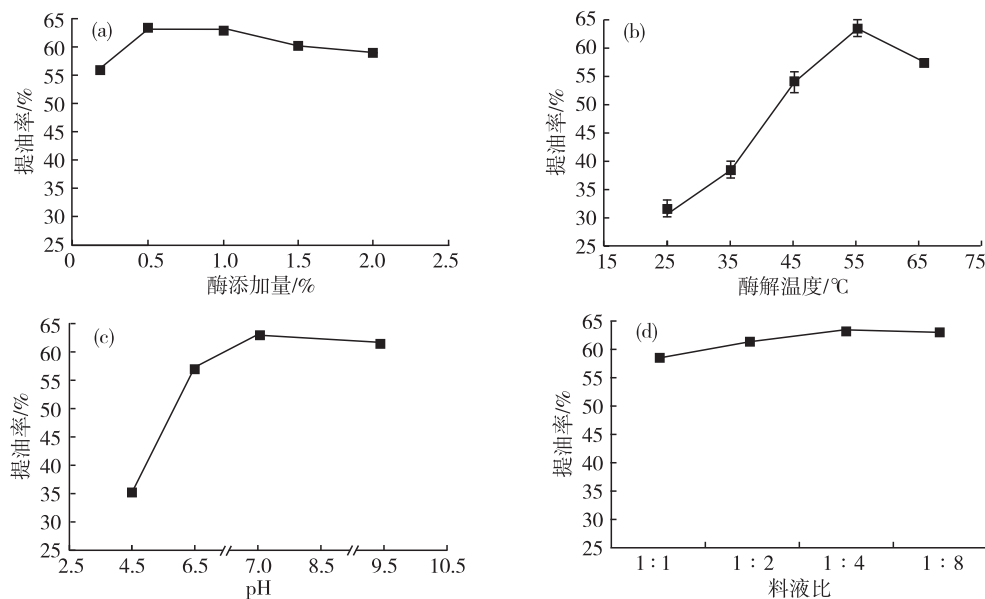


图1 酶的种类和酶解时间对提油率的影响

#### 2.1.2 酶添加量、酶解温度、pH和料液比对提油率的影响

在使用碱性蛋白酶、酶解时间0.5 h的条件下,采用水酶法提取中华草龟内脏油,考察酶添加量、酶解温度、pH和料液比对中华草龟内脏提油率的影响,结果见图2。由图2(a)可看出,随着酶添加量的增加,提油率先增加后降低,在酶添加量为0.5%时,提油率最大。当酶添加量低时,酶量不够导致提油率低;而当酶添加量增加时,酶逐渐过量,且酶与底物结合形成的复合物对酶形成反馈抑制作用,导致反应速率降低<sup>[24]</sup>,提油率降低。综合考虑,选择酶添加量为0.5%。从图2(b)、(c)可看出,随着酶解温度的升高和pH的增加,提油率呈明显的先上升后下降趋势,在55  $^{\circ}\text{C}$ 和pH 7时对中华草龟内脏油的提取效果最佳。由图2(d)可看出,料液比在1:4时提油率最高,为63.56%,料液比过高和过低对提油率均有不利的影响,因为在料液比过高时存在稀释效应,在料液比过低时存在低流动性。

综合考虑,确定水酶法提取中华草龟内脏油的最优工艺条件为:选用碱性蛋白酶,酶解时间0.5 h,酶添加量0.5%,酶解温度55  $^{\circ}\text{C}$ ,pH 7和料液比1:4。在最优工艺条件下,经验证实验提油率为(66.56  $\pm$  1.25)%。



注:优化时固定条件分别为酶添加量0.5%,酶解温度55℃,pH 7和料液比1:4。

图2 酶添加量(a)、酶解温度(b)、pH(c)和料液比(d)对中华草龟内脏提油率的影响

## 2.2 不同部位脂质脂肪酸组成(见表1)

由表1可看出:中华草龟肌肉、内脏、脂肪块和卵脂质中共检出包括同分异构体在内的16种脂肪酸,其中C18:1n-9的含量最高,占4个部位脂质中总脂肪酸的43.39%~50.66%;另外,含量相对较高的脂肪酸还有C16:0(14.87%~20.82%)和C18:2n-6(13.78%~17.40%),同时还检出一定量的二十碳五烯酸(EPA)(0.29%~0.60%)和二

十二碳六烯酸(DHA)(0.36%~0.53%)。DHA和EPA是两类重要的脂肪酸,有助于婴儿的大脑发育,并具有抗癌、抗炎和抗衰老等功效。中华草龟4个部位脂质中饱和脂肪酸含量为20.38%~29.53%,单不饱和脂肪酸含量为53.64%~64.57%,多不饱和脂肪酸含量为15.06%~18.16%。中华草龟脂质的不饱和脂肪酸含量(70.49%~79.62%)较高,接近鳕鱼鱼油(72.6%~75.3%)<sup>[25]</sup>。

表1 中华草龟卵、内脏、肌肉和脂肪块脂质的脂肪酸组成

脂肪酸	含量/%			
	卵	内脏	肌肉	脂肪块
C12:0	0.02±0.01 <sup>a</sup>	0.05±0.00 <sup>b</sup>	0.05±0.00 <sup>b</sup>	0.03±0.00 <sup>ab</sup>
C14:0	0.89±0.01 <sup>a</sup>	1.28±0.04 <sup>b</sup>	0.89±0.02 <sup>a</sup>	1.27±0.03 <sup>b</sup>
C14:1n-5	0.05±0.00 <sup>c</sup>	0.04±0.01 <sup>bc</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.04±0.00 <sup>b</sup>
C15:0	0.09±0.00 <sup>a</sup>	0.13±0.00 <sup>c</sup>	0.11±0.00 <sup>b</sup>	0.10±0.01 <sup>a</sup>
C16:0	14.87±0.06 <sup>a</sup>	18.06±0.10 <sup>c</sup>	20.82±0.10 <sup>d</sup>	16.36±1.25 <sup>b</sup>
C16:1n-7	5.57±0.06 <sup>c</sup>	3.76±0.06 <sup>b</sup>	2.74±0.01 <sup>a</sup>	3.68±0.10 <sup>b</sup>
E-C17:1n-7	0.09±0.00 <sup>c</sup>	0.07±0.01 <sup>a</sup>	0.08±0.00 <sup>b</sup>	0.07±0.00 <sup>ab</sup>
C17:1n-7	0.07±0.00 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>c</sup>	0.10±0.00 <sup>b</sup>	0.12±0.01 <sup>c</sup>
C18:0	4.51±0.01 <sup>a</sup>	5.16±0.02 <sup>b</sup>	7.66±0.11 <sup>c</sup>	5.35±0.14 <sup>b</sup>
C18:1n-9	50.66±0.06 <sup>d</sup>	47.39±0.16 <sup>b</sup>	43.39±0.15 <sup>a</sup>	48.51±0.82 <sup>c</sup>
C18:1n-7	7.93±0.00 <sup>d</sup>	5.77±0.02 <sup>a</sup>	7.12±0.07 <sup>c</sup>	6.09±0.19 <sup>b</sup>
C18:2n-6	13.78±0.00 <sup>a</sup>	17.26±0.02 <sup>c</sup>	15.54±0.16 <sup>b</sup>	17.40±0.41 <sup>c</sup>
C20:1n-9	0.19±0.01 <sup>a</sup>	0.21±0.00 <sup>a</sup>	0.20±0.01 <sup>a</sup>	0.20±0.01 <sup>a</sup>
C20:4n-6	0.22±0.01 <sup>b</sup>	0.06±0.00 <sup>a</sup>	0.29±0.01 <sup>c</sup>	0.07±0.01 <sup>a</sup>
C20:5n-3	0.60±0.04 <sup>c</sup>	0.29±0.00 <sup>a</sup>	0.47±0.01 <sup>b</sup>	0.31±0.00 <sup>a</sup>
C22:6n-3	0.45±0.02 <sup>b</sup>	0.36±0.02 <sup>a</sup>	0.53±0.00 <sup>c</sup>	0.38±0.01 <sup>a</sup>
SFA	20.38±0.07 <sup>a</sup>	24.67±0.12 <sup>c</sup>	29.53±0.23 <sup>d</sup>	23.12±1.17 <sup>b</sup>
MUFA	64.57±0.01 <sup>d</sup>	57.36±0.12 <sup>b</sup>	53.64±0.09 <sup>a</sup>	58.72±0.90 <sup>c</sup>
PUFA	15.06±0.06 <sup>a</sup>	17.97±0.01 <sup>c</sup>	16.83±0.18 <sup>b</sup>	18.16±0.43 <sup>c</sup>

注:同行不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同

### 2.3 不同部位脂质组成

按 1.2.4 方法对中华草龟卵、内脏、肌肉和脂肪块的脂质组成进行 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析, 结果发现, 所有脂质在 25 min 内溢出, 并且甘油酯 (TAG) 主要在 20 ~ 25 min 被分离出来, 而

少量的鞘磷脂 (SM)、磷脂 (PC) 和甘二酯 (DAG) 主要在 7 ~ 14 min 被分离出来, 且 TAG 的种类和含量较多, 而 SM、PC 和 DAG 种类和含量很少。图 3 为通过正离子模式超高效液相色谱分离质控样的质谱解卷积谱图。

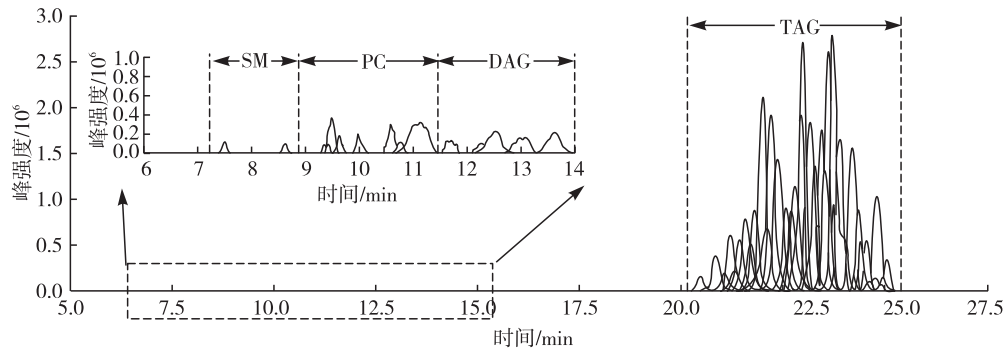


图 3 通过正离子模式超高效液相色谱分离质控样的质谱解卷积谱图

经 MS-DIAL 和 MS-FINDER 分析, 中华草龟卵、内脏、肌肉和脂肪块脂质中共检测到 139 种成分, 包括 4 种 DAG、7 种磷脂 PC、3 种 SM 和 125 种 TAG, 通过正离子模式, PC 和 SM 以  $[M+H]^+$  加和离子的形式被检出, DAG 主要以  $[M+NH_4]^+$  或  $[M+H]^+$  的形式被检出, TAG 主要以  $[M+H]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$  或  $[M+Na]^+$  的形式被检出。这些  $H^+$ 、 $NH_4^+$ 、 $Na^+$  可能来自样品、流动相或仪器中。中华草龟不同部位脂质类别的相对含量见表 2。由表 2 可看出, 从中华草龟 4 个不同部位提取的脂质主要成分均为 TAG, 在卵、内脏、肌肉和脂肪块脂质中的相对含量分别为 96.41%、99.43%、98.76% 和 99.46%。

中华草龟卵脂质中的 PC 含量最丰富, 高达 2.78%; 而在脂肪块和内脏脂质中, PC 含量极少, 这可能是由于这两个部位中的细胞外脂质含量较高, 来自细胞膜或其他部分的脂质含量低。

表 2 中华草龟不同部位脂质类别的相对含量

部位	相对含量/%			
	TAG	DAG	PC	SM
卵	96.41	0.34	2.78	0.47
内脏	99.43	0.06	0.01	0.50
肌肉	98.76	0.21	0.57	0.46
脂肪块	99.46	0.07	0	0.47

表 3 为中华草龟卵、内脏、肌肉和脂肪块脂质中主要的 TAG、DAG、PC 和 SM 组成和相对含量。

表 3 中华草龟卵、内脏、肌肉和脂肪块脂质中主要 TAG、DAG、PC、SM 组成和相对含量

编号	平均保留时间/min	平均质荷比(m/z)	化合物	加和离子	相对含量/%			
					卵	内脏	肌肉	脂肪块
1	22.62	874.8028	TAG (16:0/18:1/18:2)	$[M+H]^+$	8.703 ± 0.111 <sup>a</sup>	9.351 ± 0.114 <sup>b</sup>	9.470 ± 0.069 <sup>b</sup>	9.507 ± 0.194 <sup>b</sup>
2	23.62	902.8348	TAG (18:1/18:1/18:1)	$[M+NH_4]^+$	7.304 ± 0.058 <sup>ab</sup>	7.219 ± 0.065 <sup>ab</sup>	7.107 ± 0.187 <sup>a</sup>	7.406 ± 0.050 <sup>b</sup>
3	23.33	876.8186	TAG (16:0/18:1/18:1)	$[M+H]^+$	7.062 ± 0.120 <sup>a</sup>	8.047 ± 0.026 <sup>c</sup>	7.662 ± 0.022 <sup>b</sup>	8.086 ± 0.118 <sup>c</sup>
4	22.93	900.8191	TAG (18:1/18:1/18:2)	$[M+H]^+$	6.720 ± 0.070 <sup>ab</sup>	6.453 ± 0.143 <sup>a</sup>	6.834 ± 0.145 <sup>b</sup>	6.635 ± 0.165 <sup>ab</sup>
5	21.85	872.7871	TAG (16:1/18:1/18:2)	$[M+NH_4]^+$	6.193 ± 0.026 <sup>a</sup>	6.524 ± 0.076 <sup>bc</sup>	6.741 ± 0.026 <sup>c</sup>	6.402 ± 0.144 <sup>b</sup>
6	21.51	846.7711	TAG (16:0/16:1/18:2)	$[M+NH_4]^+$	4.916 ± 0.006 <sup>b</sup>	4.618 ± 0.111 <sup>a</sup>	4.702 ± 0.111 <sup>a</sup>	4.708 ± 0.012 <sup>a</sup>
7	22.30	848.7870	TAG (16:0/16:1/18:1)	$[M+H]^+$	4.448 ± 0.023 <sup>a</sup>	4.759 ± 0.089 <sup>b</sup>	4.671 ± 0.096 <sup>b</sup>	4.947 ± 0.036 <sup>c</sup>
8	21.45	896.7874	TAG (18:2/18:2/18:2)	$[M+H]^+$	3.168 ± 0.024 <sup>a</sup>	3.566 ± 0.096 <sup>c</sup>	3.728 ± 0.080 <sup>d</sup>	3.405 ± 0.044 <sup>b</sup>
9	24.24	904.8504	TAG (18:0/18:1/18:1)	$[M+NH_4]^+$	3.132 ± 0.061 <sup>a</sup>	4.209 ± 0.034 <sup>c</sup>	3.832 ± 0.226 <sup>b</sup>	4.325 ± 0.014 <sup>c</sup>
10	22.20	898.8031	TAG (18:1/18:2/18:2)	$[M+H]^+$	3.087 ± 0.023 <sup>a</sup>	3.440 ± 0.096 <sup>bc</sup>	3.590 ± 0.077 <sup>c</sup>	3.290 ± 0.043 <sup>b</sup>
11	21.16	820.7549	TAG (14:0/16:1/18:1)	$[M+NH_4]^+$	2.102 ± 0.017 <sup>b</sup>	2.072 ± 0.011 <sup>b</sup>	1.866 ± 0.066 <sup>a</sup>	2.062 ± 0.031 <sup>b</sup>
12	21.11	870.7714	TAG (16:1/18:2/18:2)	$[M+NH_4]^+$	2.066 ± 0.026 <sup>a</sup>	2.354 ± 0.009 <sup>c</sup>	2.307 ± 0.029 <sup>c</sup>	2.231 ± 0.041 <sup>b</sup>
13	20.75	844.7551	TAG (16:1/16:1/18:2)	$[M+H]^+$	2.051 ± 0.032 <sup>b</sup>	1.814 ± 0.043 <sup>a</sup>	1.824 ± 0.026 <sup>a</sup>	1.764 ± 0.033 <sup>a</sup>
14	22.61	967.8623	TAG (14:1/22:0/22:0)	$[M+H]^+$	1.479 ± 0.020 <sup>a</sup>	1.523 ± 0.013 <sup>a</sup>	1.590 ± 0.031 <sup>b</sup>	1.608 ± 0.028 <sup>b</sup>
15	23.32	969.8782	TAG (17:0/19:0/22:0)	$[M+H]^+$	1.425 ± 0.007 <sup>a</sup>	1.439 ± 0.010 <sup>a</sup>	1.447 ± 0.025 <sup>a</sup>	1.489 ± 0.008 <sup>b</sup>
16	21.61	920.7881	TAG (16:0/18:2/22:6)	$[M+H]^+$	1.308 ± 0.015 <sup>b</sup>	1.121 ± 0.023 <sup>a</sup>	1.104 ± 0.034 <sup>a</sup>	1.085 ± 0.006 <sup>a</sup>

续表3

编号	平均保留时间/min	平均质荷比( <i>m/z</i> )	化合物	加和离子	相对含量/%			
					卵	内脏	肌肉	脂肪块
17	21.85	965.846 7	TAG (16:0/21:1/21:1)	[M + H] <sup>+</sup>	1.267 ± 0.016 <sup>a</sup>	1.284 ± 0.012 <sup>a</sup>	1.329 ± 0.025 <sup>b</sup>	1.311 ± 0.019 <sup>ab</sup>
18	20.40	818.738 8	TAG (14:0/16:1/18:2)	[M + H] <sup>+</sup>	1.246 ± 0.019 <sup>b</sup>	0.846 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.832 ± 0.034 <sup>a</sup>	0.890 ± 0.030 <sup>a</sup>
19	23.04	850.802 6	TAG (16:0/16:0/18:1)	[M + H] <sup>+</sup>	1.208 ± 0.002 <sup>a</sup>	2.161 ± 0.031 <sup>d</sup>	1.811 ± 0.082 <sup>b</sup>	1.957 ± 0.066 <sup>c</sup>
20	21.51	939.830 6	TAG (17:0/17:0/22:1)	[M + H] <sup>+</sup>	1.064 ± 0.010 <sup>b</sup>	1.022 ± 0.013 <sup>a</sup>	1.053 ± 0.026 <sup>ab</sup>	1.062 ± 0.005 <sup>b</sup>
21	24.24	997.910 1	TAG (17:0/21:0/22:0)	[M + H] <sup>+</sup>	0.999 ± 0.022 <sup>a</sup>	1.155 ± 0.004 <sup>c</sup>	1.118 ± 0.016 <sup>b</sup>	1.201 ± 0.013 <sup>d</sup>
22	22.37	922.803 8	TAG (16:0/18:1/22:6)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.924 ± 0.022 <sup>a</sup>	0.912 ± 0.022 <sup>a</sup>	0.877 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.908 ± 0.027 <sup>a</sup>
23	24.46	930.866 3	TAG (18:1/18:1/20:1)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.902 ± 0.031 <sup>a</sup>	1.008 ± 0.036 <sup>b</sup>	1.012 ± 0.046 <sup>b</sup>	1.044 ± 0.027 <sup>b</sup>
24	21.17	894.771 7	TAG (16:0/18:2/20:5)	[M + H] <sup>+</sup>	0.883 ± 0.011 <sup>c</sup>	0.698 ± 0.009 <sup>b</sup>	0.622 ± 0.021 <sup>a</sup>	0.694 ± 0.010 <sup>b</sup>
25	22.31	941.846 3	TAG (17:0/17:0/22:0)	[M + H] <sup>+</sup>	0.881 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.919 ± 0.007 <sup>ab</sup>	0.928 ± 0.032 <sup>b</sup>	0.970 ± 0.007 <sup>c</sup>
26	23.85	928.850 8	TAG (18:1/18:2/20:1)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.861 ± 0.046 <sup>b</sup>	0.709 ± 0.038 <sup>a</sup>	0.762 ± 0.036 <sup>a</sup>	0.709 ± 0.025 <sup>a</sup>
27	22.03	922.803 5	TAG (18:1/18:1/20:5)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.843 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.408 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.439 ± 0.016 <sup>a</sup>	0.427 ± 0.014 <sup>a</sup>
28	21.96	822.770 8	TAG (14:0/16:0/18:1)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.796 ± 0.019 <sup>a</sup>	1.096 ± 0.015 <sup>c</sup>	1.001 ± 0.066 <sup>b</sup>	1.117 ± 0.002 <sup>c</sup>
29	23.05	950.835 3	TAG (18:1/18:1/22:5)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.739 ± 0.016 <sup>b</sup>	0.636 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.609 ± 0.011 <sup>a</sup>	0.615 ± 0.024 <sup>a</sup>
30	22.18	991.862 7	TAG (19:1/19:1/22:1)	[M + H] <sup>+</sup>	0.706 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.765 ± 0.028 <sup>b</sup>	0.809 ± 0.011 <sup>c</sup>	0.745 ± 0.007 <sup>b</sup>
31	21.97	946.804 0	TAG (18:1/18:2/22:6)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.704 ± 0.009 <sup>c</sup>	0.233 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.293 ± 0.012 <sup>b</sup>	0.235 ± 0.002 <sup>a</sup>
32	22.72	948.819 8	TAG (18:1/18:1/22:6)	[M + H] <sup>+</sup>	0.702 ± 0.012 <sup>b</sup>	0.481 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.480 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.470 ± 0.014 <sup>a</sup>
33	22.05	953.845 9	TAG (19:0/19:0/19:1)	[M + H] <sup>+</sup>	0.677 ± 0.011 <sup>b</sup>	0.493 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.469 ± 0.011 <sup>a</sup>	0.469 ± 0.006 <sup>a</sup>
34	20.74	937.814 4	TAG (17:0/17:0/22:2)	[M + H] <sup>+</sup>	0.655 ± 0.011 <sup>b</sup>	0.594 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.618 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.597 ± 0.018 <sup>a</sup>
35	20.84	918.772 1	TAG (16:1/18:2/22:6)	[M + H] <sup>+</sup>	0.623 ± 0.010 <sup>c</sup>	0.431 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.409 ± 0.011 <sup>a</sup>	0.407 ± 0.003 <sup>a</sup>
36	23.11	888.818 7	TAG (17:0/18:1/18:2)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.613 ± 0.031 <sup>a</sup>	0.623 ± 0.036 <sup>a</sup>	0.621 ± 0.038 <sup>a</sup>	0.600 ± 0.014 <sup>a</sup>
37	22.74	924.819 2	TAG (16:0/18:1/22:5)	[M + H] <sup>+</sup>	0.588 ± 0.013 <sup>b</sup>	0.345 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.353 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.351 ± 0.018 <sup>a</sup>
38	21.10	963.830 8	TAG (17:0/20:3/21:0)	[M + H] <sup>+</sup>	0.568 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.637 ± 0.008 <sup>b</sup>	0.648 ± 0.012 <sup>b</sup>	0.631 ± 0.006 <sup>b</sup>
39	21.17	913.814 2	TAG (18:0/18:0/18:0)	[M + H] <sup>+</sup>	0.527 ± 0.007 <sup>ab</sup>	0.535 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.501 ± 0.018 <sup>a</sup>	0.549 ± 0.012 <sup>b</sup>
40	20.75	894.771 4	TAG (18:2/18:2/18:3)	[M + H] <sup>+</sup>	0.519 ± 0.010 <sup>d</sup>	0.359 ± 0.005 <sup>c</sup>	0.338 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.317 ± 0.009 <sup>a</sup>
41	23.78	890.834 4	TAG (17:0/18:1/18:1)	[M + H] <sup>+</sup>	0.390 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.529 ± 0.031 <sup>b</sup>	0.505 ± 0.032 <sup>b</sup>	0.532 ± 0.017 <sup>b</sup>
42	13.02	612.568 4	DAG (16:0/18:1)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.040 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.019 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.031 ± 0.000 <sup>b</sup>	0.019 ± 0.001 <sup>a</sup>
43	11.68	610.552 9	DAG (16:0/18:2)	[M + H] <sup>+</sup>	0.067 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.025 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.048 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.026 ± 0.001 <sup>a</sup>
44	13.59	638.584 5	DAG (18:1/18:1)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.135 ± 0.001 <sup>b</sup>	ND	0.071 ± 0.008 <sup>a</sup>	ND
45	12.31	636.568 8	DAG (18:1/18:2)	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.099 ± 0.001 <sup>d</sup>	0.019 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.062 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.023 ± 0.001 <sup>b</sup>
46	10.47	760.599 7	PC (14:0/21:1)	[M + H] <sup>+</sup>	0.936 ± 0.065 <sup>b</sup>	ND	0.146 ± 0.012 <sup>a</sup>	ND
47	9.39	758.584 0	PC (14:0/21:2)	[M + H] <sup>+</sup>	0.637 ± 0.021 <sup>c</sup>	0.005 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.258 ± 0.017 <sup>b</sup>	ND
48	12.51	788.630 9	PC (17:0/19:1)	[M + H] <sup>+</sup>	0.113 ± 0.004	ND	ND	ND
49	11.13	786.615 5	PC (18:1/18:1)	[M + H] <sup>+</sup>	0.492 ± 0.017 <sup>b</sup>	ND	0.063 ± 0.004 <sup>a</sup>	ND
50	9.93	784.599 7	PC (18:1/18:2)	[M + H] <sup>+</sup>	0.418 ± 0.010 <sup>b</sup>	ND	0.047 ± 0.003 <sup>a</sup>	ND
51	10.48	782.581 6	PC (18:4/19:0)	[M + H] <sup>+</sup>	0.051 ± 0.007 <sup>b</sup>	ND	0.017 ± 0.002 <sup>a</sup>	ND
52	9.42	780.566 2	PC (18:5/19:0)	[M + H] <sup>+</sup>	0.136 ± 0.014 <sup>b</sup>	ND	0.037 ± 0.001 <sup>a</sup>	ND
53	7.46	675.556 7	SM (14:1/18:0)	[M + H] <sup>+</sup>	0.134 ± 0.005	ND	ND	ND
54	8.58	703.587 9	SM (14:1/20:0)	[M + H] <sup>+</sup>	0.047 ± 0.003	ND	ND	ND
55	23.05	943.861 5	SM (15:0/36:0)	[M + H] <sup>+</sup>	0.285 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.501 ± 0.012 <sup>b</sup>	0.464 ± 0.033 <sup>b</sup>	0.474 ± 0.017 <sup>b</sup>

注：“ND”表示未检测到或未追踪到的水平(<0.001%)；由于某些原因，23.05 min的SM在图3中未显示。

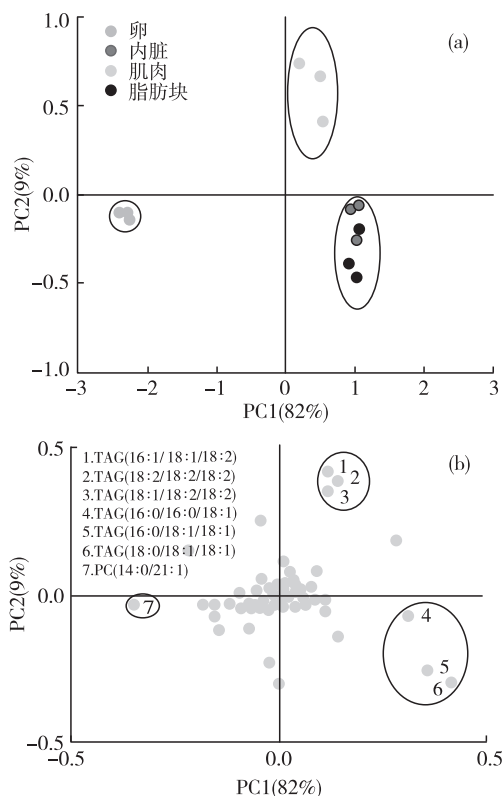
## 2.4 脂质主成分分析

图4为中华草龟不同部位脂质之间相关性的PCA结果。

由图4(a)可看出,主成分1(82%)和主成分2(9%)的累积得分为91%,表明两个成分可以较好地代表整体数据。内脏脂质和脂肪块脂质形成一

簇,表明这两个部位的脂质组成相似,而与卵和肌肉的脂质组成不同。结合图4(b)可以发现:PC(14:0/21:1)独立于其他物质之外,并且沿着与卵脂质簇矢量方向一致,表明卵脂质中该物质的含量较高;TAG(16:1/18:1/18:2)、TAG(18:2/18:2/18:2)和TAG(18:1/18:2/18:2)形成簇并且其矢量

方向表明这些物质在肌肉脂质中含量高于其他物质;TAG(16:0/16:0/18:1)、TAG(16:0/18:1/18:1)和TAG(18:0/18:1/18:1)形成一簇且矢量方向指向内脏和脂肪块脂质,表明在内脏和脂肪块脂质中这些物质的含量较高。



注:图(a)中相同的颜色表示3个平行实验组;图(b)表示卵、内脏、肌肉和脂肪块中的脂质组成。

图4 中华草龟不同部位脂质之间相关性的PCA结果

### 3 结论

本文首先采用单因素实验优化得到水酶法提取中华草龟内脏油的工艺条件,即以碱性蛋白酶为酶解用酶、酶解时间0.5 h、酶添加量0.5%、酶解温度55℃、pH 7和料液比1:4,在此条件下提油率为(66.56 ± 1.25)%。其次,分别采用GC-MS和UPLC-ESI-Q-TOF-MS对中华草龟卵、内脏、肌肉和脂肪块脂质的脂肪酸和脂质组成进行分析,结果表明,不同部位的脂质中不饱和脂肪酸含量均较高,并含有一定量的DHA和EPA。主要脂质种类为TAG,同时含有少量DAG、PC和SM。PCA结果表明,脂肪块和内脏中的脂质成分相似,但与卵和肌肉脂质组成明显不同。本研究通过对中华草龟脂质的全面分析发现,龟鳖副产物具有作为食用油脂开发的潜力。

### 参考文献:

[1] LIU W S, MA J, LI W X, et al. The long intron 1 of growth hormone gene from Reeves' turtle (*Chinemys*

*reevesii*) correlates with negatively regulated GH expression in four cell lines[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 543 [2021-03-10]. <https://doi.org/10.3390/ijms17040543>.

- [2] JIA X J, NIU C J. Molecular cloning and tissue-specific expression of Cu/Zn and Mn-superoxide dismutase in the three-keeled pond turtle, *Chinemys reevesii*[J]. *Asian Herpetol Res*, 2013, 4(2): 79-89.
- [3] CHEUNG S M, DAVID D. Quantifying the Asian turtle crisis: market surveys in southern China, 2000-2003[J]. *Aquat Conserv - Mar Freshw Ecosyst*, 2006, 16(7): 751-770.
- [4] DU W G, HU L J, LU J L, et al. Effects of incubation temperature on embryonic development rate, sex ratio and post-hatching growth in the Chinese three-keeled pond turtle, *Chinemys reevesii*[J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1/2/3/4): 747-753.
- [5] 何胜洁,毛新亮,张学武. 金钱龟酶解多肽的分离、纯化及抗肿瘤活性研究[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(10): 86-90.
- [6] 余建清. 龟甲化学、药理研究进展[J]. *中医药信息*, 1992, 9(6): 43-44.
- [7] 黄春红,罗玉双,韩庆,等. 人工养殖中华草龟的营养成分与食用价值[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(6): 157-161.
- [8] 徐莹莹,赖年悦,石扬,等. 中华草龟龟肉的营养成分分析及品质评价[J]. *肉类工业*, 2017(5): 27-35.
- [9] LATIF S, ANWAR F. Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction[J]. *Food Chem*, 2011, 125(2): 679-684.
- [10] ABDULKARIM S M, LONG K, LAI O M, et al. Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods[J]. *Food Chem*, 2005, 93(2): 253-263.
- [11] MASNI M Y, GORDON M H, ONYINYE E, et al. Aqueous enzymatic extraction of *Moringa oleifera* oil[J]. *Food Chem*, 2016, 211: 400-408.
- [12] MASNI M Y, GORDON M H, ONYINYE E, et al. High pressure pre-treatment of *Moringa oleifera* seed kernels prior to aqueous enzymatic oil extraction[J]. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2017, 39: 129-136.
- [13] LI X J, LI Z G, WANG X, et al. Application of cavitation system to accelerate aqueous enzymatic extraction of seed oil from *Cucurbita pepo* L. and evaluation of hypoglycemic effect[J]. *Food Chem*, 2016, 212: 403-410.
- [14] MENG Z, WEI S L, QI K Y, et al. Secondary structure of proteins on oil release in aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil as affected hydrolysis state[J]. *Int J Food Prop*, 2018, 21(1): 119-127.

(下转第27页)

62.03%, 异构支链脂肪酸的相对含量为 27.56%, 反异构支链脂肪酸的相对含量为 34.47%。这与陈洋等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。

### 3 结论

与精制羊毛脂(药典级)相比,本研究的原料羊毛脂色泽较深,水分及挥发物含量、灰分含量、碘值与酸值略高。羊毛脂的主要组成成分为脂肪酸酯、羧基酯、游离甾醇及多羟基物残留物,分别占羊毛脂总质量的 55.14%、25.57%、4.04% 和 13.15%。羊毛脂中甘油三酯未检出。羊毛脂中羊毛醇的主要组成为胆甾醇与羊毛甾醇,相对含量分别为 44.31%、14.62%,胆甾醇和羊毛甾醇在羊毛脂中的含量分别为 10.41%、3.43%。羊毛脂中羊毛酸的主要组成为饱和脂肪酸,碳链长度为 C13 ~ C27,其中支链脂肪酸的相对含量高达 62.03%,异构支链脂肪酸的相对含量为 27.56%,反异构支链脂肪酸的相对含量为 34.47%。

### 参考文献:

- [1] 张星华. 羊毛脂中胆甾醇的分离提取工艺[D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [2] 埃德加, 洛厄, 高大忻. 天然成份羊毛脂(英)[J]. 日用化学品科学, 1998(3): 20 - 21.
- [3] 沈一丁, 李小瑞, 任庆海. 改性羊毛脂加脂剂的制备及性能[J]. 精细化工, 1996(2): 12 - 16.
- [4] 陈小利, 林苗, 胡杰, 等. 进一步开发羊毛脂[J]. 化学世界, 2000, 41(1): 8 - 12.
- [5] 林吉文. 甾体化学基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 1989: 21.
- [6] HARTONO D, HOD Y, YANG K L, et al. The effect of cholesterol on protein - coated gold nanoparticle binding to liquid crystal - supported models of cell membranes[J]. Biomaterials, 2010, 31(11): 3008 - 3015.
- [7] 揭良, 齐策, 余仁强, 等. 胎脂和羊毛脂中支链脂肪酸组成的研究[J]. 中国油脂, 2018, 43(7): 27 - 31.
- [8] 吴敦汉, 刘德威, 岳秀枚, 等. 国产羊毛蜡分析[J]. 毛纺科技, 1981(1): 1 - 14.
- [9] 张珏, 华聘聘. 羊毛酸的提取[J]. 中国油脂, 2000, 25(3): 56 - 58.
- [10] 陈洋, 许乃恒, 王小三, 等. 羊毛脂制备羊毛酸的工艺研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(3): 27 - 31.
- [11] 沈涛. 羊毛脂中胆固醇的提取[D]. 北京: 北京化工大学, 2016.
- [12] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 国家药典标准[M]. 北京: 化学工业出版社, 1985.
- [13] 向章敏, 张婕, 蔡凯, 等. 衍生化气相色谱质谱联用法同时测定烟叶多种植物甾醇[J]. 光谱实验室, 2011, 28(5): 2536 - 2540.
- [14] RIBEIRO S A O, NICACIO A E, ZANQUI A B, et al. Improvements in the quality of sesame oil obtained by a green extraction method using enzymes[J]. LWT - Food Sci Technol, 2016, 65: 464 - 470.
- [15] 李传欣, 程敬松, 吴琼, 等. 响应面优化水酶法提取人参子油工艺[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(9): 73 - 76.
- [16] 孙睿, 张永涵, 刘婧玮, 等. 响应面法优化超临界萃取花椒籽油及  $\alpha$ -亚麻酸的工艺研究[J]. 中国调味品, 2021, 46(1): 51 - 56.
- [17] TOMAS C, OLIVER F. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography - mass spectrometry[J]. Trends Anal Chem, 2014, 61: 192 - 206.
- [18] LEE D Y, KIND T, YOON Y R, et al. Comparative evaluation of extraction methods for simultaneous mass - spectrometric analysis of complex lipids and primary metabolites from human blood plasma[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(28): 7275 - 7286.
- [19] XIE C, ZHONG D F, YU K, et al. Recent advances in metabolite identification and quantitative bioanalysis by LC - Q - TOF MS[J]. Bioanalysis, 2012, 4(8): 937 - 959.
- [20] ZHANG Y Y, QIN L, LIU Y X, et al. Evaluation of lipid profile in different tissues of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* Ino with UPLC - ESI - Q - TOF - MS - based lipidomic study[J]. Food Chem, 2018, 265: 49 - 56.
- [21] HU X P, AN Q D, ZHOU D Y, et al. Lipid profiles in different parts of two species of scallops (*Chlamys farreri* and *Patinopecten yessoensi*)[J]. Food Chem, 2017, 243: 319 - 327.
- [22] YIN F W, LIU X Y, FAN X R, et al. Extrusion of Antarctic krill (*Euphausia superba*) meal and its effect on oil extraction[J]. Int J Food Sci Technol, 2015, 50(3): 633 - 639.
- [23] 白鑫华, 罗秦, 青维, 等. 响应面法优化大鲑鱼油水酶法提取工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(17): 247 - 252.
- [24] FIORI L, SOLANA M, TOSI P, et al. Lipid profiles of oil from trout (*Oncorhynchus mykiss*) heads, spines and viscera; trout by - products as a possible source of  $\omega$  - 3 lipids[J]. Food Chem, 2012, 134(2): 1088 - 1095.

(上接第 16 页)