

## 大黄鱼HPLC指纹图谱的建立及其在产地溯源和物种鉴别中的应用

顾得月, 任西杰, 迟长凤\*, 王 斌, 徐梅英, 吴常文

(浙江海洋学院海洋科学与技术学院, 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022)

**摘要:** 通过优化实验条件, 选择真空冷冻干燥的方法处理实验原材料, 以乙酸乙酯为溶剂采用超声法(功率为250 W、提取时间2 h)制备原材料中的有效成分。运用Agilent 1260 DAD-HPLC, 采用Thermo ODS-C<sub>18</sub>色谱柱, 利用乙腈-0.1%磷酸水作为流动相, 在流速0.5 mL/min、进样量20  $\mu$ L、210 nm条件下, 建立了舟山养殖大黄鱼、福建养殖大黄鱼、小黄鱼、黄姑鱼和黑鳃梅童鱼的HPLC指纹图谱, 以及具有18个共有峰的指纹图谱共有模式。相似度分析表明, 其他几类样品和舟山大黄鱼的相似度排序为福建养殖大黄鱼>小黄鱼>黄姑鱼>黑鳃梅童鱼。应用SPSS18.0数据分析软件, 对18个共有峰的相对峰面积进行聚类分析、主成分分析和判别分析。聚类分析结果表明, 大黄鱼、小黄鱼、黑鳃梅童鱼和黄姑鱼各自聚为一类, 可用于鉴别不同的鱼类。经主成分分析, 共选取到3个主成分PC1、PC2和PC3, 涵盖了HPLC图谱数据信息的80.36%。根据3个主成分的得分绘制散点图, 5种样品各自归于一定的区域, 实现了不同产地大黄鱼以及大黄鱼与其他鱼类的鉴别。在此基础上, 选择对主成分贡献较大的色谱峰的峰面积建立了5种样品的判别方程式, 交互验证的正确率高达98.4%, 可用于鉴别不同产地的大黄鱼及相同产地的相近鱼种。因此, 本实验的研究结果为HPLC指纹图谱技术应用于大黄鱼产地溯源提供了理论和数据支持。

**关键词:** 大黄鱼; HPLC指纹图谱; 相似度分析; 聚类分析; 主成分分析; 判别分析

**中图分类号:** S 968.4

**文献标志码:** A

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)属石首鱼科(Sciaenidae)黄鱼属(*Pseudosciaena*), 是我国重要的经济鱼类之一<sup>[1]</sup>。但由于长期滥捕, 大黄鱼野生资源日益减少, 20世纪70年代后期, 大黄鱼渔汛已难以形成<sup>[2]</sup>。为解决大黄鱼产量问题, 我国水产工作者积极开展大黄鱼人工养殖技术研究, 至20世纪80年代末, 大黄鱼人工育苗技术取得突破, 网箱养殖技术逐渐成熟完善, 较好地满足了人们对大黄鱼产量的需求, 但养殖大黄鱼的品质与野生大黄鱼的品质存在较大差别, 且在不同环境和养殖方式下的大黄鱼品质也参差不齐<sup>[3-6]</sup>。为了提高养殖大黄鱼质

量, 阐明影响大黄鱼品质差异的因素, 不少研究者对大黄鱼的肌肉成分进行了比较分析<sup>[5-11]</sup>, 结果表明不同生长模式、不同家系、不同地域的大黄鱼所含的营养成分、理化指标, 特别是脂肪含量差异明显, 从而导致养殖大黄鱼口感差别明显。

目前, 水产品的产地溯源和鉴别技术主要依靠性状鉴别<sup>[12]</sup>和分子生物学方法。性状鉴别法主要依靠鉴别者的实践经验, 易受主观因素影响; 分子生物学方法所需试剂昂贵、实验周期长并要求检测者具有较高的技术水平。本实验采用的HPLC法, 准确度高、操作简便、实验成

收稿日期: 2015-05-02 修回日期: 2015-08-20

资助项目: 国家科技支撑计划(2011BAD13B08); 浙江省水产新品种选育项目(2012C12907-8)

通信作者: 迟长凤. E-mail: chichangfeng@hotmail.com

本较低,且已在中药材和部分海洋药物[如贻贝(*Mytilus edulis*)<sup>[13]</sup>、斑海马(*Hippocampus trimaculatus*)<sup>[14]</sup>、马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)<sup>[15]</sup>等]的质量控制和产地溯源领域得到应用。但目前基于鱼类化学成分建立的HPLC指纹图谱较少。因此,本实验采用HPLC法建立了大黄鱼指纹图谱,结合数理统计的方法,对不同产地大黄鱼进行产地溯源和质量鉴定,同时利用该技术进行了石首鱼科部分鱼类的种类鉴别,取得了较好结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Agilent 1260, 配备G1311B四元泵, G1329B自动进样器, G1316A恒温箱, G1315B DAD检测器)、真空冷冻干燥机(EYELA FD-1000上海爱朗仪器有限公司)、超声清洗机(KQ-250B 昆山超声波仪器有限公司)、电子天平(BSA323S赛多利斯科学仪器有限公司)。

无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯(分析纯)购于国药集团化学试剂有限公司;乙腈(色谱纯)购于瑞典沃普森公司。实验所用大黄鱼、小黄鱼(*L. polyactis*)、黄姑鱼(*Nibea albiflora*)和黑鳃梅童鱼(*Collichthys niveatus*)采集于浙江舟山、福建宁德和福建沙埕等地(表1)。样品经浙江海洋学院赵盛龙教授鉴定。

### 1.2 实验方法

**样品预处理及供试液的制备** 取冰鲜样品,冷水冲洗解冻,清洗干净,取靠近头部的背部肌肉研碎,真空冷冻干燥,再次研磨,过100目

筛,密封于自封袋中于-20 °C保存。

称取样品0.65 g,倒入锥形瓶中。按照料液比1:100加入乙酸乙酯65 mL,称重。超声提取2 h,乙酸乙酯补足失重,密封静置24 h。滤去残渣,利用旋转蒸发器于40 °C以下除去乙酸乙酯,加入40 mL甲醇溶解残余物,0.45 μm滤膜微滤,ODS-C<sub>18</sub>小柱(150 mm × 1.6 mm)除杂质,浓缩,甲醇定容至5 mL。

**色谱条件** 取冰鲜样品冷水冲洗解冻,清洗干净,取靠近头部的背部肌肉研碎,真空冷冻干燥,再次研磨,过100目筛,密封于自封袋中于-20 °C保存。色谱柱: Thermo C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流速: 0.5 mL/min,检测波长: 210 nm,进样量: 20 μL,柱温: 25 °C,流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸水(B),梯度洗脱条件(A相): 0~5 min, 1%~3%; 5~8 min, 3%; 8~10 min, 3%~10%; 15~20 min, 30%~45%; 20~23 min, 45%~55%; 23~25 min, 55%~60%; 25~30 min, 60%~70%; 30~35 min, 70%~85%; 35~40 min, 85%~87%; 40~43 min, 87%~90%; 43~45 min, 90%~95%; 45~47 min, 95%~100%; 47~60 min, 100%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 实验条件的优化

**样品处理方法的选择** 实验比较了100 °C烘干、50 °C烘干和真空冷冻干燥样品原材料(鱼肉)对后续实验的影响(图1)。原材料受处理温度影响较为明显,温度太高时(100 °C)会造成部分色谱峰丢失或含量减少。因此,后续实验选择真

表1 不同实验样品的来源

Tab. 1 Sources of the samples

样品名称 name	批次 sample batch	采集地点和样品参数 collection area and sample parameters	采集时间 collection time
养殖大黄鱼 ( <i>L. crocea</i> )	18批(Z1- Z18)	浙江舟山东极岛,深水网箱养殖,养殖饲料为冰鲜小杂鱼,300~350 g/尾	2013.11
养殖大黄鱼 ( <i>L. crocea</i> )	5批(N1- N5)	福建宁德蕉城区三都澳,网箱养殖,养殖饲料为人工配合饲料和冰鲜小杂鱼,体质量300~350 g/尾	2013.11
养殖大黄鱼 ( <i>L. crocea</i> )	6批(S1- S6)	福建宁德福鼎市沙埕镇,网箱养殖,养殖饲料为人工配合饲料和冰鲜小杂鱼,体质量300~350 g/尾	2013.11
野生小黄鱼 ( <i>L. polyactis</i> )	15批(H1-H15)	浙江舟山市南珍水产品市场,体质量80~100 g/尾	2013.11
养殖黄姑鱼( <i>N. albiflora</i> )	11批(HG1-HG11)	浙江舟山登步岛附近海域网箱养殖,养殖饲料主要为冰鲜小杂鱼,体质量300~350 g/尾	2013.11
野生黑鳃梅童鱼( <i>C. niveatus</i> )	15批(M1-M15)	浙江舟山市南珍水产品市场,体质量30~35 g/尾	2013.11

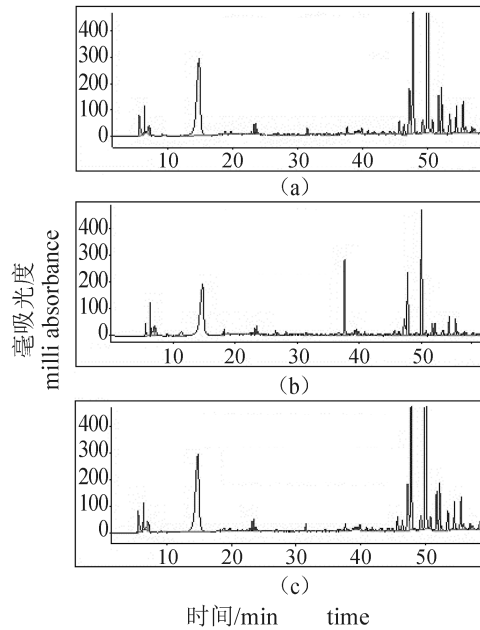


图1 不同原材料处理条件下的大黄鱼样品有效成分的色谱图

(a) 样品干燥方式: 100 °C烘干; (b) 样品干燥方式: 50 °C烘干;  
(c) 样品干燥方式: 真空冷冻干燥

Fig. 1 The chromatograms of samples prepared under different treatment conditions

(a) sample drying methods: drying at 100 °C; (b) sample drying methods: drying at 50 °C; (c) sample drying methods: vacuum freeze drying

空冷冻干燥的方法处理原材料。

**提取溶剂的选择** 实验比较了水、50%甲醇+50%水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯作为溶剂对提取物的影响(图2)。溶剂极性越大, 提取物中含有的大极性物质越多, 样品共有峰的峰面积所占总峰面积的比例降低, 低于90%, 图谱无法达到代表样品整体有效成分的作用。以乙酸乙酯作为提取溶剂时, 大极性物质提取率低, 峰面积所占比例小, 共有峰数量多。因此, 本实验选取乙酸乙酯作为提取溶剂。

**提取时间及提取功率的选择** 实验比较了2个时间梯度(1和2 h)和2个功率(100和250 W)对样品有效成分提取情况的影响(图3, 图4)。在设定的提取时间和功率下, 所得样品有效成分的图谱具有一定的差别, 在2 h、250 W条件下, 提取的样品有效成分色谱峰的分离效果和峰的强度较好。因此, 本实验选取的提取时间为2 h, 仪器功率为250 W。

**流动相的选择** 实验比较了乙腈-水和乙腈-0.1%磷酸水2种流动相对样品有效成分色谱图的

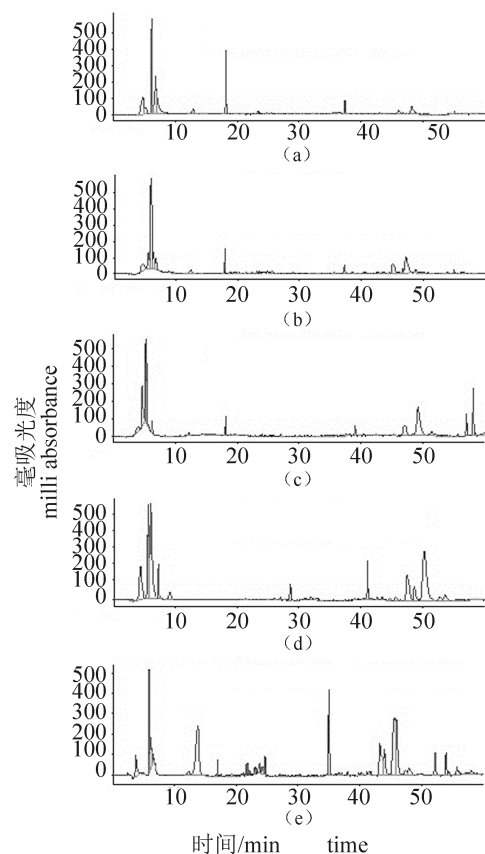


图2 不同提取溶剂条件下大黄鱼样品有效成分的色谱图

(a) 提取溶剂: 水; (b) 提取溶剂: 50%甲醇+50%水; (c) 提取溶剂: 甲醇; (d) 提取溶剂: 乙醇; (e) 提取溶剂: 乙酸乙酯

Fig. 2 The chromatograms of samples prepared with different solvents

(a) extraction solvent: water; (b) extraction solvent: 50%methanol + 50%water; (c) extraction solvent: methanol; (d) extraction solvent: ethanol; (e) extraction solvent: ethyl acetate

影响(图5)。流动相中加入0.1%的磷酸后, 有效成分的峰型尖锐, 分离度增加, 更利于后续的数据分析。因此, 本实验将流动相确定为乙腈-0.1%磷酸水。

**吸收波长的选择** 实验比较了210, 230, 254和280 nm 4个紫外吸收波长对大黄鱼样品有效成分色谱图的影响(图6)。210 nm吸收波长检测条件下得到的色谱图吸收峰数量多、吸收强度大, 更利于后续数据统计分析。因此, 本实验选择210 nm作为样品的检测波长。

**色谱柱的选择** 实验比较了Hibar、Thermo 2个品牌的液相色谱柱的分离效果(图7)。Thermo C<sub>18</sub>色谱柱的分离效果好, 出峰数目多, 基线平稳。因此, 本实验选择Thermo C<sub>18</sub>色谱柱进行后

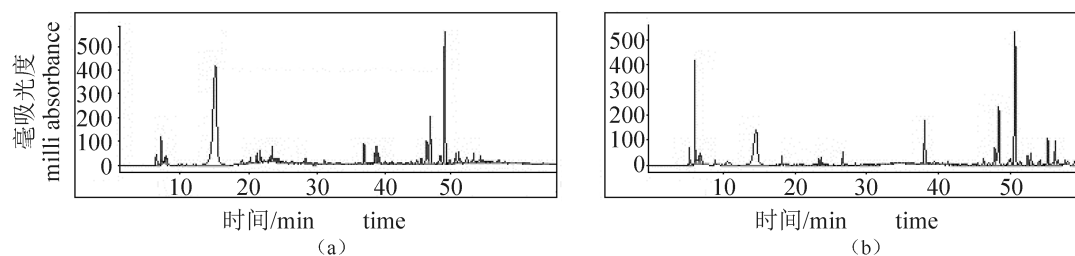


图3 不同提取时间下大黄鱼样品有效成分的色谱图

(a) 提取时间: 1 h; (b) 提取时间: 2 h

Fig. 3 The chromatograms of sample prepared with different extract time

(a) extraction time: 1 h; (b) extraction time: 2 h

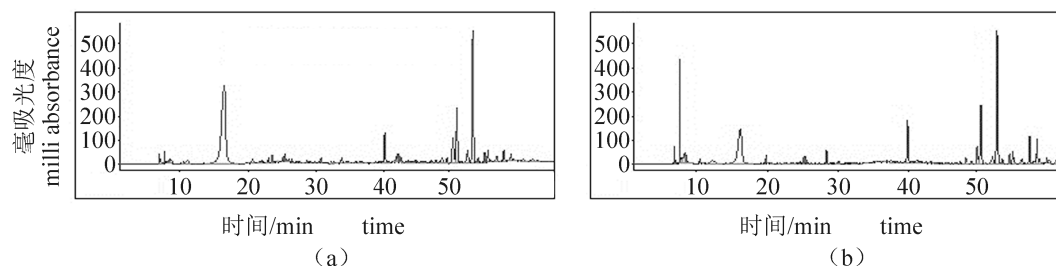


图4 不同提取功率下大黄鱼样品有效成分的色谱图

(a) 提取功率: 100 W; (b) 提取功率: 250 W

Fig. 4 The chromatograms of samples prepared with different power

(a) extraction power: 100 W; (b) extraction power: 250 W

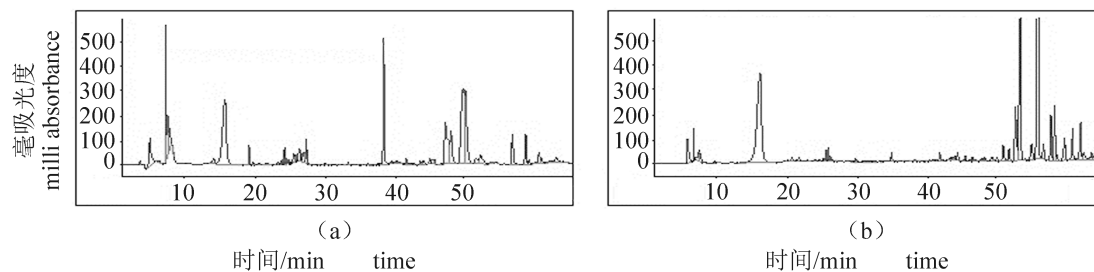


图5 不同流动相下大黄鱼样品有效成分的色谱图

(a) 流动相: 乙腈-水; (b) 流动相: 乙腈-0.1%磷酸水

Fig. 5 The chromatograms of samples with different mobile phases

(a) mobile phase: acetonitrile-water; (b) mobile phase: acetonitrile-water (0.1% phosphoric acid)

续实验。

**流速的选择** 实验比较了0.5, 0.8和1 mL/min 3个不同流速对于样品色谱图的影响(图8)。结果表明: 当流速为0.5 mL/min时, 出峰效果最好, 柱压较低。因此, 选择0.5 mL/min的流速进行后续实验。

**进样量的选择** 实验比较了10, 15和20  $\mu$ L 3个进样量对样品色谱图的影响(图9)。当进样量为20  $\mu$ L时, 各个吸收峰的强度略大, 有助于后续共有峰的比较分析。因此, 本实验后续实验进样量为20  $\mu$ L。

综上所述, 通过对实验条件的优化, 最终选择真空冷冻干燥的方法处理实验原材料, 利用乙酸乙酯作为提取试剂, 在超声波功率为250 W、提取2 h制备原材料中的有效成分。HPLC实验流动相为乙腈-0.1%磷酸水、紫外检测波长为210 nm、色谱柱为Thermo C<sub>18</sub>、流速为0.5 mL/min、进样量为20  $\mu$ L。

## 2.2 方法学考察

**精密度实验** 使用实验方法中的色谱条件, 选Z1号供试样品液, 连续进样5次, 经计算, 所

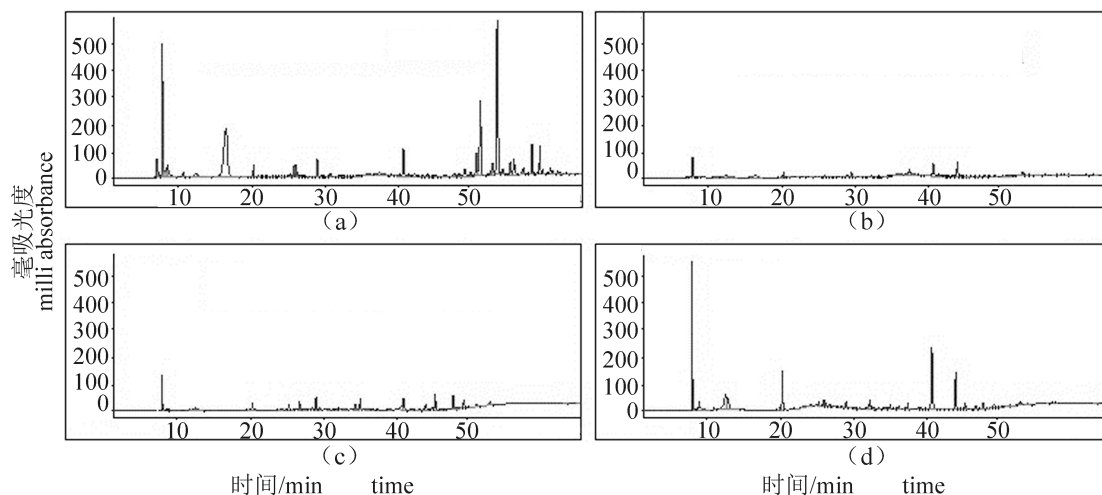


图6 不同检测波长条件下大黄鱼样品有效成分的色谱图

(a) 检测波长: 210 nm; (b) 检测波长: 230 nm; (c) 检测波长: 254 nm; (d) 检测波长: 280 nm

Fig. 6 The chromatograms of samples detected by different wavelengths

(a) detection wavelength: 210 nm; (b) detection wavelength: 230 nm; (c) detection wavelength: 254 nm; (d) detection wavelength: 280 nm

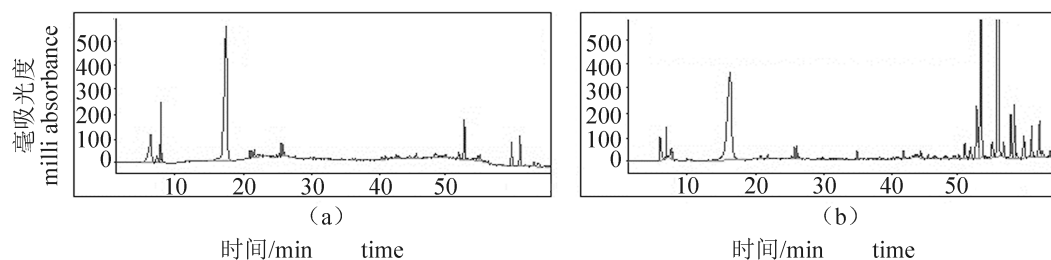


图7 不同色谱柱条件下的大黄鱼样品有效成分的色谱图

(a) 色谱柱: Hibar C<sub>18</sub>; (b) 色谱柱: Thermo C<sub>18</sub>

Fig. 7 The chromatograms of samples using different HPLC columns

(a) chromatographic column: Hibar C<sub>18</sub>; (b) chromatographic column: Thermo C<sub>18</sub>

有色谱峰相对保留时间的相对标准偏差(RSD)均小于0.8%, 相对峰面积的RSD均小于2.5%。实验表明仪器精密度良好。

**稳定性实验** 使用实验方法中色谱条件, 选Z1号供试样品液, 分别在0, 4, 6, 8, 12, 24 h进样, 经计算, 所有色谱峰相对保留时间的RSD值均小于1%, 相对峰面积的RSD值均小于2.0%。实验表明制备的样品液在24 h以内是稳定的。

**重现性实验** 平行取Z1号样品5份, 使用样品预处理及供试液的制备方法制备供试样品液, 采用实验方法中的色谱条件, 经统计, 所有色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.8%, 相对峰面积的RSD均小于2.5%。实验表明样品液的制备方法可靠、稳定。

以上结果表明, 大黄鱼乙酸乙酯提取物

HPLC图谱中共有峰数目、峰面积基本一致, 相似度较高, 符合HPLC指纹图谱研究的要求。

### 2.3 舟山大黄鱼HPLC指纹图谱的建立及分析

**HPLC指纹图谱共有模式的建立及相似度分析**  
使用样品预处理及供试液制备的方法制备样品液, 采用实验方法中的色谱条件制作18个舟山大黄鱼样品(Z1-Z18)的HPLC图谱, 运用国家药典委员会制定的用于生成共有模式的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)<sup>[16]</sup>, 将样品HPLC图谱导入到软件中; 然后以舟山大黄鱼Z1号样品为参照样品, 采用平均值法, 时间窗口设定为0.2, 经自动匹配后生成对照指纹图谱, 输出相似度数据。18个大黄鱼样品的相似度依次为0.919, 0.960, 0.953, 0.940, 0.554, 0.947, 0.541, 0.908, 0.964, 0.571, 0.952,

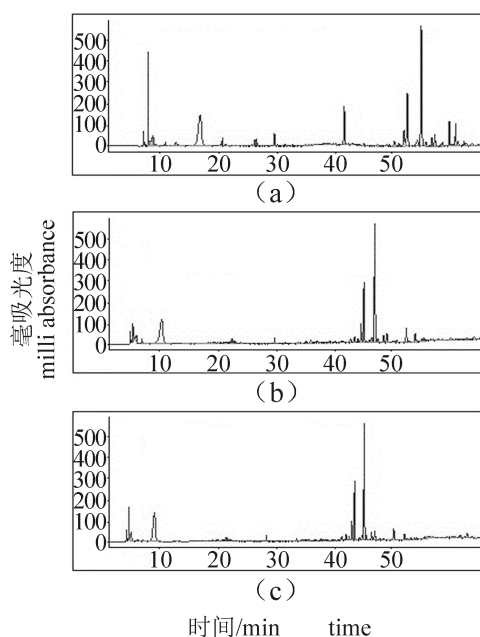


图 8 不同流速条件下的大黄鱼样品有效成分的色谱图

(a) 流速: 0.5 mL/min; (b) 流速: 0.8 mL/min; (c) 流速: 1.0 mL/min

Fig. 8 The chromatograms of samples at different flow rates

(a) flow rate: 0.5 mL/min; (b) flow rate: 0.8 mL/min; (c) flow rate: 1.0 mL/min

0.929, 0.953, 0.949, 0.963, 0.931, 0.921和0.931。剔除相似度较小的样品(Z5、Z7和Z10), 以相似度大于0.9的15批样品建立舟山大黄鱼指纹图谱(图10-a)。

将其他样品的图谱依次导入相似度软件中, 采用平均值法, 时间窗口设为0.3, 比较种内相似度, 剔除相似度较低的个体, 排除种内差异。分别建立福建养殖大黄鱼(图10-b)、舟山小黄鱼(图10-c)、舟山黄姑鱼(图10-d)、舟山黑鳃梅童鱼(图10-e)的HPLC指纹图谱。经自动匹配, 5种样品的指纹图谱共含18个共有峰(图11)。共有峰1峰型尖锐, 峰型良好, 在各样品的指纹图谱中均稳定存在, 故选峰1做参照峰S, 计算其他17个共有峰的相对保留时间和相对保留峰面积, 统计结果表明所有共有峰相对保留时间的RSD均小于1.0%, 相对峰面积的RSD均小于2.5%, 共有峰面积大于总积分面积的90%, 符合指纹图谱绘制的指标要求。同时, 以舟山大黄鱼HPLC指纹图谱共有模式为标准, 依次比较其他鱼种的相似度(表2)。

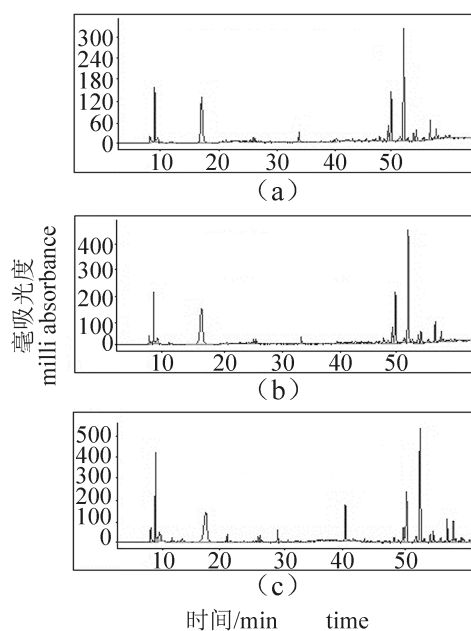


图 9 不同进样量条件下的大黄鱼样品有效成分的色谱图

(a) 进样量: 10 µL; (b) 进样量: 15 µL; (c) 进样量: 20 µL

Fig. 9 The chromatograms of samples prepared with different sample amount

(a) injection volume: 10 µL; (b) injection volume: 15 µL; (c) injection volume: 20 µL

相似度比较结果表明, 福建养殖大黄鱼、小黄鱼、黄姑鱼、黑鳃梅童鱼与舟山养殖大黄鱼相比, 相似度排序为福建养殖大黄鱼 > 小黄鱼 > 黄姑鱼 > 黑鳃梅童鱼。

比较不同样品的指纹图谱, 发现不同样品所含化学成分的种类和含量存在较大差异(图10)。因此, 按照保留时间将指纹图谱分为4个区域。第一区域为0~10 min, 第二区域为10~30 min, 第三区域为30~45 min, 第四区域为45~65 min<sup>[17]</sup>。第一区域中, 黄姑鱼的色谱峰数明显多于其他几种鱼; 第二区域17 min附近, 福建、舟山大黄鱼的色谱峰和其他样品相比数量较少, 峰面积较小; 第三区域内, 小黄鱼、黑鳃梅童鱼的色谱峰较多, 尤其是黑鳃梅童鱼37 min附近的色谱峰峰型尖锐, 吸收强度明显高于其他样品; 第四区域内, 52 min后, 大黄鱼色谱峰数目最多。

**聚类分析** 聚类分析是将大量数据进行自然分组、非常实用的工具<sup>[18]</sup>。因此, 将各样品的18个共有峰的相对峰面积导入SPSS18.0软件中, 采用组间联接法, 以欧氏距离为测度, 进行聚

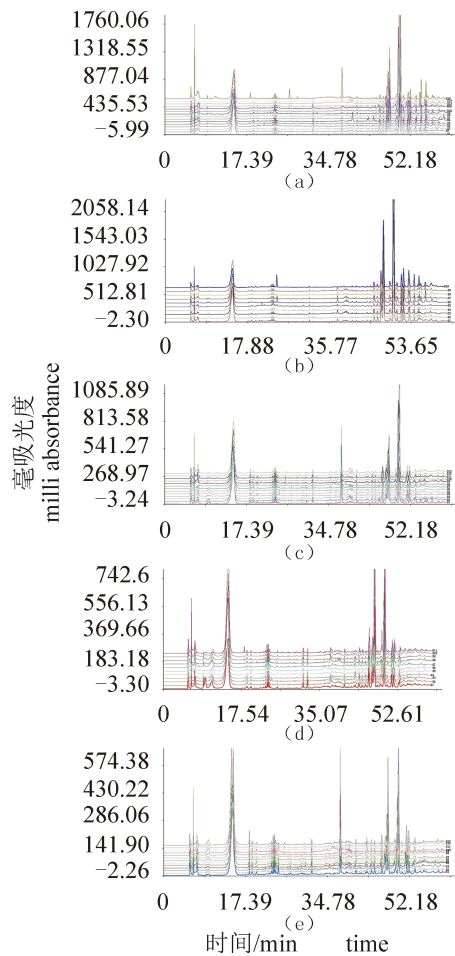


图 10 舟山养殖大黄鱼(a)、福建养殖大黄鱼(b)、小黄鱼(c)、黄姑鱼(d)和黑鳃梅童鱼(e)的HPLC指纹图谱

Fig. 10 HPLC fingerprints of Zhoushan cultured *L. crocea* (a), Fujian cultured *L. crocea* (b), *L. polyactis* (c), *N. albiflora* (d) and *C. niveatus* (e)

类分析(图12)。舟山、福建两产地的大黄鱼样品未能有效分离。而小黄鱼、黄姑鱼、黑鳃梅童

鱼基本都各自归为一类。因此,采用HPLC指纹图谱,结合相似度分析和聚类分析可以区分所测试的石首鱼科不同鱼类,但是不能够区分不同产地的大黄鱼。

**主成分分析** 主成分分析是一种常用的降维方法,它将原始数据进行变换,组合成一组新的变量,即主成分,同时,这些变量要尽可能多地表征原变量的数据结构特征,而不丢失信息<sup>[19]</sup>。将各样品18个共有峰的相对峰面积导入SPSS18.0中进行因子分析,共选取出3个主成分,第一主成分(PC1)的贡献率为55.59%,第二主成分的贡献率为18.00%,第三主成分的贡献率为6.77%,累计贡献率达到80.36%(大于80%),可见选取的3个主成分涵盖了样品的大部分信息,可用作后续分析。

根据PC1、PC2和PC3得分绘制散点图(图13),结果表明:(1)舟山养殖大黄鱼的PC1得分为-1.5~-0.5,PC2得分为-0.5~0,PC3得分为0~1.5,样品分布紧凑,质量稳定。(2)福建养殖大黄鱼PC1得分为-1.5~-0.5,PC2上的得分为-1~0.5,PC3上的得分为-2~0。(3)小黄鱼在PC1上的得分为-1~0,PC2上的得分为-1~0,PC3上的得分为0~3。(4)黄姑鱼在PC1上的得分为0~1.5,PC2上的得分为1.5~3.0,PC3上的得分为-1.0~1.5。黄姑鱼样品分布较分散,个体间的差异较大。(5)黑鳃梅童鱼在PC1上的得分为1~2,PC2上的得分为-2~0,PC3上的得分为-1.5~0.5。黑鳃梅童鱼与其他样品的得分差距较大,距离最远。主成分分析的结果表明不同产地、不同品种鱼类各自聚集在不同区域且区别明显。

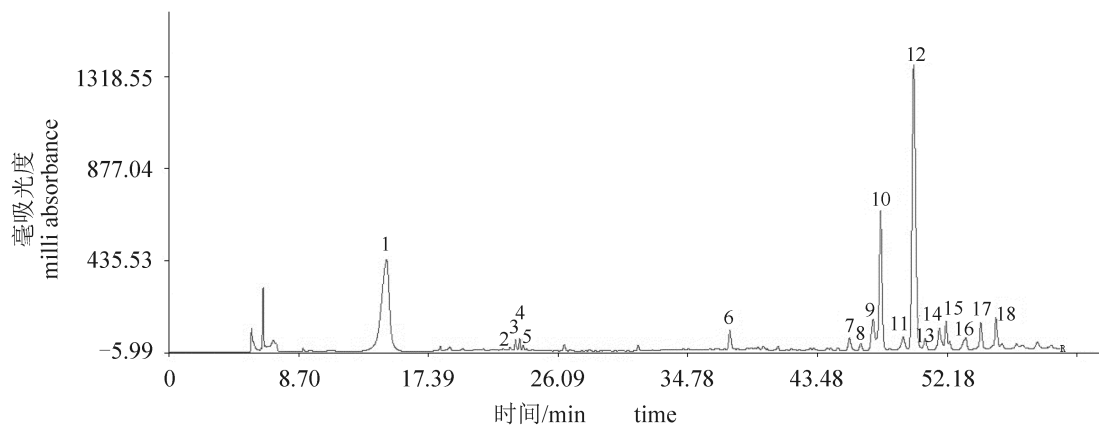


图 11 舟山养殖大黄鱼对照指纹图谱及18个共有峰标识

Fig. 11 Identification of 18 common peaks

表 2 舟山和福建养殖大黄鱼、小黄鱼、黄姑鱼和黑鳃梅童鱼 HPLC 指纹图谱的相似度分析

Tab. 2 Similarity analysis of cultured *L. crocea* from Zhoushan and Fujian, *L. polyactis*, *N. albiflora* and *C. niveatus*

名称 name	相似度 similarity	名称 name	相似度 similarity	名称 name	相似度 similarity	名称 name	相似度 similarity	名称 name	相似度 similarity
N1	0.847	H1	0.710	H11	0.741	HG8	0.650	M7	0.182
N2	0.817	H2	0.601	H12	0.726	HG9	0.641	M8	0.197
N3	0.867	H3	0.714	H13	0.739	HG10	0.485	M9	0.189
N4	0.802	H4	0.711	HG1	0.567	HG11	0.625	M10	0.276
S1	0.894	H5	0.726	HG2	0.640	M1	0.220	M11	0.197
S2	0.735	H6	0.725	HG3	0.605	M2	0.296	M12	0.195
S3	0.873	H7	0.728	HG4	0.639	M3	0.117	M13	0.120
S4	0.818	H8	0.739	HG5	0.581	M4	0.204		
S5	0.794	H9	0.549	HG6	0.651	M5	0.122		
S6	0.845	H10	0.745	HG7	0.355	M6	0.189		

判别方程的建立 18个共有峰中,峰1、峰2、峰3、峰4、峰5、峰7、峰8、峰15对第一主成分的贡献率较大,峰9、峰10、峰11、峰12、峰15、峰17对第二主成分的贡献率较大(表3),峰18对第三主成分的作用较大,峰6、峰13、峰14、峰16对3个主成分的作用均低于0.7,作用偏小。为使实验结果更为精确,选择对主成分作用最大的峰的相对峰面积,进行下一步的判别分析,建立舟山养殖大黄鱼、福建养殖大黄鱼、小黄鱼、黑鳃梅童鱼、黄姑鱼的判别方程式。

$$Y_Z = 25.293X_1 + 967.823X_2 + 407.940X_3 + 101.448X_4 + 59.194X_5 - 123.471X_6 + 1593.172X_7 + 345.458X_8 - 38.876$$

$$Y_F = -105.747X_1 + 987.959X_2 + 705.193X_3 + 37.103X_4 - 52.803X_5 - 245.897X_6 + 1451.686X_7 + 1118.618X_8 - 81.642$$

$$Y_H = 170.568X_1 + 1700.890X_2 + 587.987X_3 + 431.557X_4 + 175.667X_5 - 113.420X_6 + 2405.938X_7 + 191.474X_8 - 234.316$$

$$Y_{HG} = 234.779X_1 + 3415.322X_2 + 1452.328X_3 + 946.577X_4 + 365.135X_5 - 325.426X_6 + 2404.938X_7 + 598.140X_8 - 312.921$$

$$Y_M = 990.890X_1 + 5338.798X_2 + 1156.344X_3 + 848.064X_4 - 268.936X_5 - 325.381X_6 + 1883.674X_7 + 536.360X_8 - 310.757$$

$X_1 \sim X_8$ 依次代表了峰4、峰5、峰7、峰10、

峰11、峰12、峰15、峰18的相对峰面积。将未分组的样品的峰面积代入上述方程中,比较4个Y值的大小。最大的Y值就是该样品的种类。在SPSS18.0分析软件中进行交互验证,仅野生小黄鱼的一个样品发生了错误,交互验证的正确率高达98.4%(表4)。说明判别函数稳定性良好,可用于鉴别不同产地的同种鱼类及相同产地的相近鱼种。

### 3 讨论

肌肉品质是养殖动物的重要经济性状,与养殖产品的价值和养殖业的效益密切相关,成为衡量养殖产品肌肉品质的重要指标<sup>[7]</sup>。水产生物生活在水环境中,影响其肉质的因素较陆生动物多且复杂,种质特性(遗传背景)、生理状态、生态环境和饲料等都会对其肉质产生影响<sup>[20-21]</sup>。大黄鱼是我国养殖量较大的海洋鱼类<sup>[22]</sup>,在巨大产量的背后,是参差不齐的养殖条件和技术水平。目前市场上出售的养殖大黄鱼由于生存环境等多方面的影响,其风味、口感和营养成分差别很大,良莠不齐,长久下去,必然影响大黄鱼养殖业的长远发展。因此,建立一种有效的方法来进行大黄鱼产地溯源和质量控制非常必要。

目前,分子生物学方法是大黄鱼的产地溯源和鉴别技术经常采用的方法。但是,在遗传背景相同的情况下,分子生物学方法难以将不同产地的大黄鱼区分开来。而大黄鱼人工养殖过



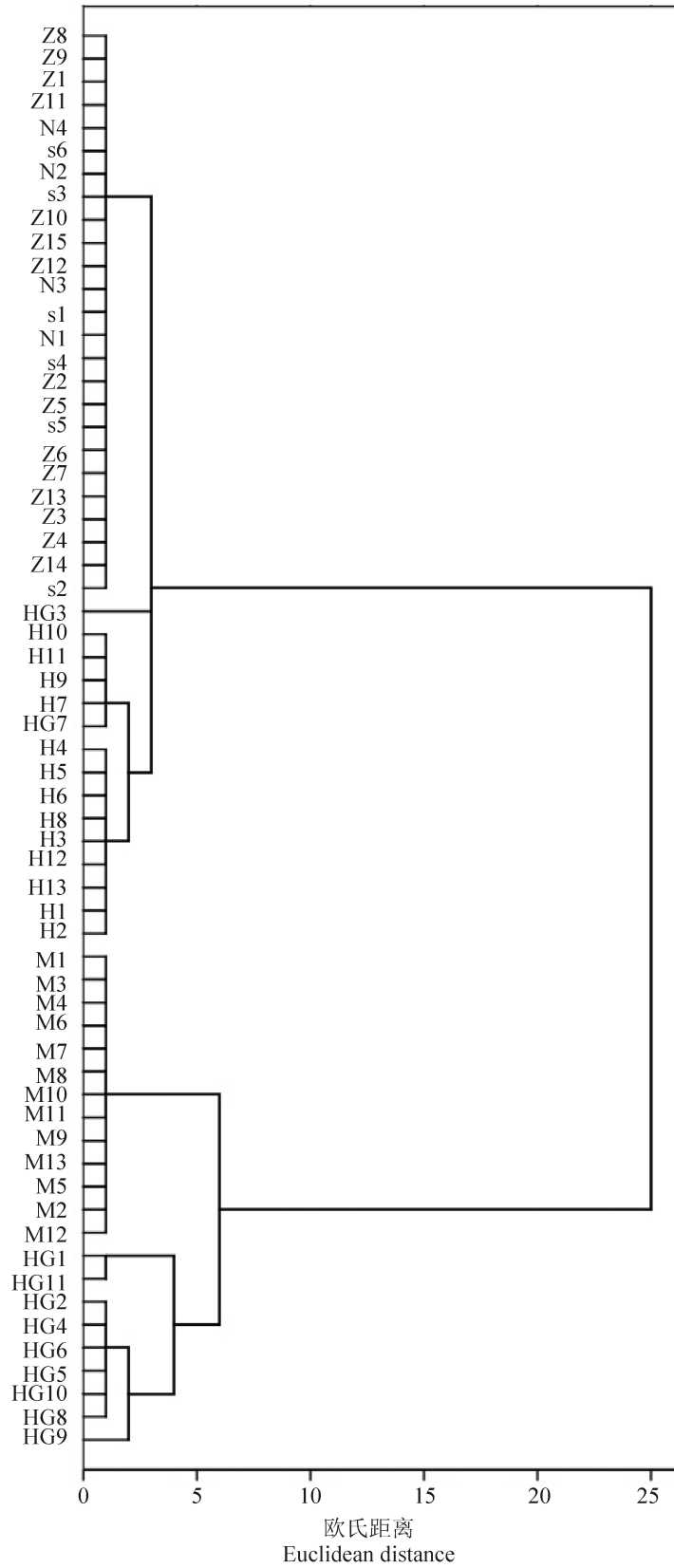


图 12 舟山和福建养殖大黄鱼、小黄鱼、黄姑鱼和黑鳃梅童鱼相似度的聚类分析结果

Fig. 12 Chart of agglomeration of similarity of cultured *L. crocea* from Zhoushan and Fujian, *L. polyactis*, *N. albiflora* and *C. niveatus*

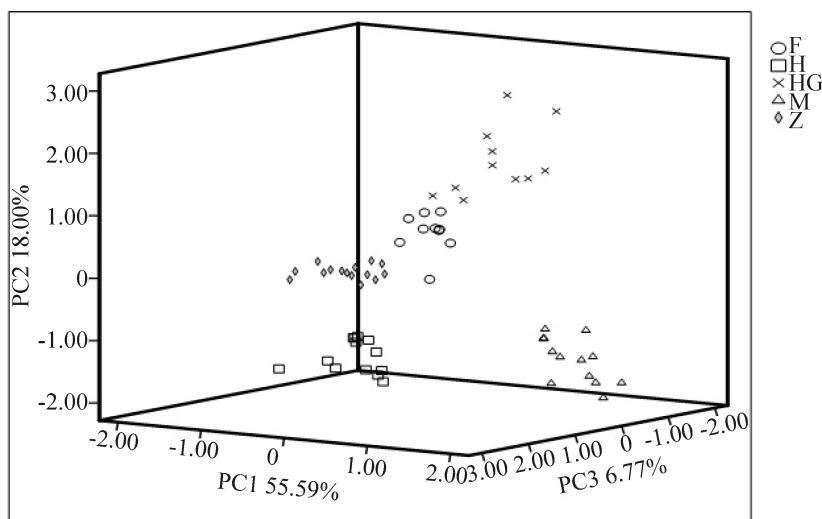


图 13 实验样品主成分得分图

F. 养殖大黄鱼(福建宁德福鼎市沙埕镇); H. 野生小黄鱼; HG. 养殖黄姑鱼; M. 野生黑鳃梅童鱼; Z. 养殖大黄鱼(浙江舟山山东极岛)

Fig. 13 PCA score plot of the samples

F. cultured *L. crocea* (Shacheng Town, Fuding City, Ningde City, Fujian Province); H. wild *L. polyactis*; HG. cultured *N. albiflora*; M. wild *C. niveatus*; Z. cultured *L. crocea* (Dongji Island, Zhoushan City, Zhejiang Province)

表 3 载荷因子矩阵

Tab. 3 Component matrix

编号 NO.	成分 contents			编号 NO.	成分 contents		
	1	2	3		1	2	3
1	0.800	0.533	0.009	10	0.165	0.913	-0.111
2	0.886	0.425	0.047	11	0.009	0.916	-0.170
3	0.864	0.469	-0.015	12	0.192	0.945	0.163
4	0.919	0.336	0.054	13	0.596	0.005	0.070
5	0.919	0.337	0.054	14	-0.155	0.078	-0.569
6	0.667	0.688	-0.043	15	-0.891	0.216	0.037
7	0.969	-0.015	0.103	16	0.564	0.717	0.307
8	0.808	0.325	-0.278	17	0.006	0.827	0.445
9	0.392	0.828	0.049	18	-0.178	0.212	0.786

程中, 种苗通常会来自同一个地方, 如浙江养殖大黄鱼的部分种苗来自于福建。HPLC法是建立在所检测样品的化学成分差别基础之上的方法, 更注重的是所含化学成分种类和含量的多少, 遗传因素对其影响很小。因此, 即使具有相同遗传背景的大黄鱼, 由于其生长环境不同所积累的化学成分种类和含量必然存在一定差异。根据文献[5-11]和本实验对HPLC检测样品的研究, 不同生长环境和养殖方式的大黄鱼在脂肪酸、磷脂等成分含量等方面差异明显, 而

这些差异在HPLC图谱中将会有所体现。所以, HPLC指纹图谱可以很好地弥补分子生物学方法的缺陷, 应用于大黄鱼的产地溯源和质量控制之中。

本研究根据大黄鱼肌肉中所含脂肪酸类物质的种类和含量差异建立了其指纹图谱, 结合相似度分析、聚类分析、主成分分析、判别分析达到了预期的实验目的。在大黄鱼的生产 and 销售过程中, 可以较好地地区分产品的质量, 剔除以假乱真或者质量低下的产品, 规范行业发

表4 交互验证结果

Tab. 4 Cross-validation results

分类变量 classification		预测组成员 prediction group members					总计 total
		1	2	3	4	5	
计数 counting	1	15	0	0	0	0	15
	2	0	10	0	0	0	10
	3	1	0	12	0	0	13
	4	0	0	0	11	0	11
	5	0	0	0	0	13	13
计数/% counting	1	100	0	0	0	0	100
	2	0	100	0	0	0	100
	3	7.7	0	92.3	0	0	100
	4	0	0	0	100	0	100
	5	0	0	0	0	100	100

注：已对交互验证分组案例中的98.4%的样品进行了正确分类

Notes: 98.4% of the samples in prediction group were classified correctly

展。当然，本实验所用的样品数和产地来源还相对较少，特别是未能对野生大黄鱼样品进行对比分析，致使实验结果存在一定的局限性，后续实验将进一步扩大样本量，完善现有实验条件，更好地服务于大黄鱼产业的发展。

#### 参考文献：

- [1] 胡银茂. 东海海区大黄鱼种质资源的历史演变和现状分析[J]. 绍兴文理学院学报, 2006, 26(7): 49-53.  
Hu Y M. The historical and present status of large yellow croaker germplasm in East Sea [J]. Journal of Shaoxing University, 2006, 26(7): 49-53 (in Chinese).
- [2] 苗新, 曹娟娟, 徐玮, 等. 核苷酸对大黄鱼生长性能、肠道形态和抗氧化能力的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(8): 1140-1148.  
Miao X, Cao J J, Xu W, et al. Effects of dietary nucleotides on growth performance, intestinal morphology and anti-oxidative capacities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(8): 1140-1148 (in Chinese).
- [3] 孙瑞健, 徐玮, 米海峰, 等. 饲料脂肪水平和投喂频率对大黄鱼生长、体组成及脂肪沉积的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(3): 401-409.  
Sun R J, Xu W, Mi H F, et al. Effects of dietary lipid level and feeding frequency on growth, body composition and lipid deposition in juvenile large yellow

croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(3): 401-409 (in Chinese).

- [4] 缪伏荣. 不同养殖模式大黄鱼*Pseudosciaena crocea* (Richardson)品质的比较[J]. 现代渔业信息, 2008, 23(10): 3-6.  
Miao F R. Analysis on meat quality traits of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) under different culture modes [J]. Modern Fisheries Information, 2008, 23(10): 3-6 (in Chinese).
- [5] 郑斌, 郭远明, 陈雪昌, 等. 大黄鱼*Pseudosciaena crocea* (Richardson)肌肉中脂肪含量的比较分析[J]. 现代渔业信息, 2003, 18(6): 25-26.  
Zheng B, Guo Y M, Chen X C, et al. Comparative analysis of the fat content in muscle of *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. Modern Fisheries Information, 2003, 18(6): 25-26 (in Chinese).
- [6] 徐继林, 严小军, 罗瑜萍, 等. 岱衢族野生大黄鱼与养殖大黄鱼肌肉脂类和脂肪酸组成的比较研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(1): 108-1143.  
Xu J L, Yan X J, Luo Y P, et al. Comparison of lipids and fatty acids composition in muscle between wild and farmed *Pseudosciaena crocea* from Tai-chu Race [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(1): 108-1143 (in Chinese).
- [7] 林利民, 王秋荣, 王志勇, 等. 不同家系大黄鱼肌肉营养成分的比较[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2):

- 286–291.
- Lin L M, Wang Q R, Wang Z Y, *et al.* Comparison of biochemical compositions of muscle among three stocks and wild-caught large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 286–291 (in Chinese).
- [ 8 ] 段清源, 钟惠英, 斯列钢, 等. 网箱养殖大黄鱼与天然大黄鱼营养成分的比较分析[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2000, 19(2): 125–128.
- Duan Q Y, Zhong H Y, Si L G, *et al.* Comparative analyses of biochemical composition in net cultured and wild *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2000, 19(2): 125–128 (in Chinese).
- [ 9 ] 韩坤煌, 黄伟卿, 戴燕彬. 围网与普通网箱养殖大黄鱼营养成分的比较与分析[J]. 河北渔业, 2011, (12): 24–28, 57.
- Han K H, Huang W Q, Dai Y B. Comparison and analysis of the nutrient components of *Larimichthys crocea* in seine net and traditional net cage [J]. Hebei Fisheries, 2011, (12): 24–28, 57 (in Chinese).
- [10] 张农, 刘海新, 李庐峰, 等. 养殖大黄鱼和天然大黄鱼的理化指标比较[J]. 渔业现代化, 2007, 34(6): 26–30.
- Zhang N, Liu H X, Li L F, *et al.* Comparative study of physicochemical parameters of cultured and wild Yellow croaker [J]. Fishery Modernization, 2007, 34(6): 26–30 (in Chinese).
- [11] 徐继林, 朱艺峰, 严小军, 等. 养殖与野生大黄鱼肌肉脂肪酸组成的比较[J]. 营养学报, 2005, 27(3): 256–260.
- Xu J L, Zhu Y F, Yan X J, *et al.* Comparison of fatty acids composition between farmed and wild yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2005, 27(3): 256–260 (in Chinese).
- [12] 廖锐, 区又君, 勾效伟, 等. 黄唇鱼、大黄鱼、丁氏鲷和棘头梅童鱼的形态差异和判别分析[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(4): 305–310.
- Liao R, Ou Y J, Gou X W, *et al.* Morphological variations and discrimination of four fish species Chinese bahaba *Bahaba flavolabiata*, large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, Ting' wak *Wak tingi* and spinyhead croaker *Collichthys lucidus* [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(4): 305–310 (in Chinese).
- [13] 吕兆国, 胡海建, 唐旭利, 等. 海洋药用生物紫贻贝的HPLC化学指纹图谱[J]. 中国海洋药物杂志, 2011, 30(3): 14–19.
- Lü Z G, Hu H J, Tang X L, *et al.* Study on HPLC fingerprint of marine medicinal organisms *Mytilus edulis* Linnaeus [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2011, 30(3): 14–19 (in Chinese).
- [14] 李蓉, 唐旭利, 李国强, 等. 海洋药用生物系列HPLC化学指纹图谱研究 II. 三斑海马HPLC化学指纹图谱研究[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(4): 729–734.
- Li R, Tang X L, Li G Q, *et al.* Study on Series of HPLC Fingerprint II: *Hippocampus trimaculatus* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(4): 729–734 (in Chinese).
- [15] 赵恒强, 陈军辉, 王虹, 等. 马粪海胆高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2009, 28(3): 34–38.
- Zhao H Q, Chen J H, Wang H, *et al.* Study on the HPLC fingerprint of sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2009, 28(3): 34–38 (in Chinese).
- [16] 陈根顺, 徐丽芳, 李鹏. 草珊瑚的HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药, 2011, 42(2): 293–296.
- Chen G S, Xu L F, Li P. HPLC fingerprint for whole herb of *Sarcandra glabra* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(2): 293–296 (in Chinese).
- [17] 王巧, 刘荣霞, 于海兰, 等. 白芍与赤芍HPLC指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(8): 581–584.
- Wang Q, Liu R X, Yu H L, *et al.* Studies on HPLC fingerprint of white peony roots and red peony roots [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2007, 42(8): 581–584 (in Chinese).
- [18] Bibel J, Datta S, Datta S. Cluster analysis: Finding groups in Data [M] //Rajan K. Informatics for Materials Science and Engineering. Amsterdam: Elsevier Inc., 2013, 4: 53–70.
- [19] 王燕, 王斌, 徐焕志, 等. 基于聚类分析和主成分分析法的淡菜醇提物红外指纹图谱研究[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1146–1152.
- Wang Y, Wang B, Xu H Z, *et al.* Infrared fingerprint analysis of ethanol extracts from mussel coupled with cluster analysis and principal component analysis [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(7): 1146–1152 (in Chinese).

- [20] 邓时铭, 廖伏初, 蒋国民, 等. 影响养殖过程中水产动物肉质的主要因素[J]. 动物营养学报, 2011, 23(1): 15–19.  
Deng S M, Liao F C, Jiang G M, *et al.* The major factors influencing meat quality of aquatic animals during cultivation [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(1): 15–19 (in Chinese).
- [21] 李明月, 郑岳夫, 管丹东, 等. 大黄鱼四家系肌肉营养成分差异及品质选育分析[J]. 水产学报, 2009, 33(4): 632–638.  
Li M Y, Zheng Y F, Guan D D, *et al.* The nutrition of fatty acid and amino acid analysis of four genealogies *Pseudosciaena crocea* (Richardson) [J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(4): 632–638 (in Chinese).
- [22] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业年鉴(2014)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014.  
The Ministry of Agriculture, Bureau of Fishery and Fishery Administration. Chinaese Fisheries Yearbook (2014) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014 (in Chinese).

## HPLC fingerprint of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its application to geographical origin traceability and species identification

GU Deyue, REN Xijie, CHI Changfeng\*, WANG Bin, XU Meiyang, WU Changwen

(National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, School of Marine Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

**Abstract:** Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) is one of the important economic fishes in China. Since 1970s, wild resources of large yellow croaker have been almost extinct due to overfishing. To solve the production problem, artificial breeding and cultured technology for large yellow croaker obtained successful breakthrough and the output of large yellow croaker was improved significantly. However, the quality of the cultured and wild large yellow croaker has great difference. In addition, the quality of cultured large yellow croaker from different environment is uneven. Therefore, the quality control methods for large yellow croaker are important for the development of large yellow croaker breeding industry. At present, fingerprint analysis has been widely applied to quality control systems of traditional Chinese medicines because of its advantages and popularity, and more chromatography and spectral methods including high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography, infrared spectrometry and mass spectrometry have been used for the fingerprint analysis, but HPLC fingerprint technology is rarely used in the quality control of aquatic products at present. In this paper, conditions for sample pre-processing, component extraction and HPLC analysis method were optimized, and a validated HPLC method coupled with cluster analysis, principal component analysis and discriminant analysis has been developed for the study of the HPLC fingerprint of large yellow croaker. Under the optimum conditions, muscles from cultured large yellow croaker (*L. crocea*) from Zhoushan and Fujian, *L. polyactis*, *Nibeia albiflora* and *Collichthys niveatus* were freeze-dried and their chemical components were extracted using ethyl acetate. The chemical components from different samples were detected by Agilent 1260 DAD-HPLC on Thermo ODS-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) eluted by acetonitrile-water (0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) under the optimum conditions: Flow rate 0.5 mL/min, inject volume 20 μL, and wavelength 210 nm. The HPLC fingerprints and mutual mode of large yellow croaker from Zhoushan and Fujian, *L. polyactis*, *N. albiflora* and *C. niveatus* were established using similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (Version 2004). Similarity analysis results indicated that the similarity order of other samples to large yellow croaker from Zhoushan was large yellow croaker from Fujian > *L. polyactis* > *N. albiflora* > *C. niveatus*. The same species had the similar characteristic peaks of HPLC and could be clustered together, but cluster analysis could not distinguish large yellow croaker from Zhoushan and

Fujian. In the principal component analysis, three principal components (PC1, PC2 and PC3) were selected and accounted for 80.36% of the original data. According to the results of principal component scores, the scatter diagram of 62 samples was drawn, and each sample was able to form distinct cluster in the principal component space, then the identification of large yellow croaker from Zhoushan and Fujian, *L. polyactis*, *N. albiflora* and *C. niveatus* was basically achieved. Based on the results of principal component analysis, PC1 was used to develop the discrimination function for distinguishing different type samples. The accuracy of the discrimination function was 98.4%. Therefore, the established method had good stability, precision and reproducibility, and it was also a very reliable and useful method for distinguishing large yellow croaker from different species and/or environment. On the whole, HPLC fingerprint combined with reasonable methods of mathematical statistics provides an effective method for large yellow croaker geographical origin traceability and species identification.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; HPLC fingerprint; similarity; clustering analysis; principal component analysis; discriminant analysis

**Corresponding author:** CHI Changfeng. E-mail: chichangfeng@hotmail.com

**Funding projects:** National Key Project of Scientific and Technical Supporting Programs Funded by Ministry of Science & Technology of China (2011BAD13B08); Zhejiang Provincial Program Foundation for Selective Breeding and Development of New Agricultural Varieties (2012C12907-8)