

# Application News

## No. L536

### 高效液相色谱法

## 鱼肉中核酸相关物质分析和利用 多数据报告自动计算鲜度 (K 值)

众所周知，鱼贝类的肌肉与畜产动物相比，组织较为柔软、水分较多，因此容易变质。正确判定这些鱼贝类的鲜度，在食品安全方面非常重要。

一般来说，消费者通过鱼眼的颜色和鱼体的紧实程度等外观判断鲜度，而将动物肌肉中能量源 ATP（三磷酸腺苷）的变化作为判断肌肉鲜度指标的方法也被广泛应用。通过数值评价鱼贝类鲜度时，常使用 K 值。

近年来，有报道组胺过敏导致的食物中毒。当红鱼例如金枪鱼腐烂时，鱼肉中续集高浓度组胺（组氨酸代谢物）。尽管可以通过 HPLC 方法检测组胺，但前处理方法复杂（衍生化），需要一套庞大的自动化前处理系统。因此，通过简单配置的 Nexera™ LC 系统检测与腐烂程度相关的 ATP 类物质是非常实用的。

本文使用 HPLC 测定新鲜金枪鱼及解冻金枪鱼的 K 值。另外，展示了各金枪鱼鲜度随时间变化的多数据报告的实例。

N. Iwata

### ATP 相关物质的分析

分析了 ATP 相关物质（次黄嘌呤 (Hx)、肌苷 (HxR)、IMP、AMP、ADP、ATP）\* 1 的混合标准溶液（各 10 μmol/L）。图 1 所示为色谱图，表 1 所示为分析条件。

采用 Shim-pack GIST C18 AQ 色谱柱进行色谱分离。该色谱柱在接近 100% 纯水相的流动相条件下柱效和耐用性优异。

一般来说，ATP 相关物质中具有代表性的碱基和核苷酸等多通过使用磷酸缓冲液的等度洗脱进行分离，分析时间也较长。

本文中通过向流动相添加离子对试剂，在结构上使其保持具有磷酸基的化合物，且通过梯度洗脱进行分离，缩短了分析时间。另外，为防止杂质吸附导致至色谱柱压力上升，追加了色谱柱清洗步骤，确保大量样本分析时的重复、稳定性。

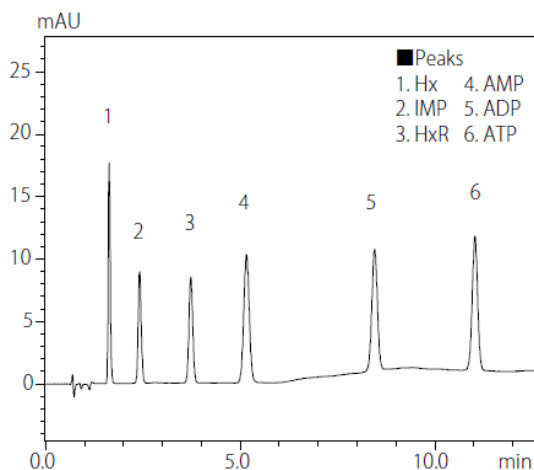


图 1 ATP 相关物质混合标准溶液的色谱图

\*1 IMP: Inosine 5'-monophosphate, AMP: Adenosine 5'-monophosphate, ADP: Adenosine 5'-diphosphate, ATP: Adenosine 5'-triphosphate

表 1 分析条件

System	: Nexera™ series
Column	: Shim-pack™ GIST 3 μm C18 AQ (100 mm L. × 3.0 mm I.D., 3 μm)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Mobile phase *2	: A) Water/Acetonitrile=100/1 (v/v) containing 0.15 mol/L Phosphoric acid, 0.225 mol/L Triethylamine B) Water/Acetonitrile=80/20 (v/v) containing 0.15 mol/L Phosphoric acid, 0.225 mol/L Triethylamine
Time Program	: 0%B (0-3.5 min) → 12%B (11 min) → 100%B (11.01-18 min) → 0%B (18.01-28 min)
Column temp.	: 30 °C
Injection volume	: 10 μL
Detection	: PDA 260 nm

\*2 Phosphoric acid: 10.2 mL } → mixture of Water/ Acetonitrile 1 L  
Triethylamine: 31 mL

### 重复性

表 2 所示为 ATP 相关物质混合标准溶液（各 2 μmol/L）在分析 6 次时保留时间与面积的相对标准偏差 (%RSD)。结果表明，所有组分的保留时间、面积的相对标准偏差均在 1% 以下。

表 2 重复分析 6 次时的各成分变动系数 (%RSD)

Compounds	Retention time	Area
Hx	0.14	0.33
IMP	0.00	0.21
HxR	0.09	0.20
AMP	0.04	0.32
ADP	0.05	0.50
ATP	0.05	0.68

### 鱼肉的鲜度测定

鱼贝类等动物使用 ATP 作为肌肉中的能量源。但是，死后会失去再产生该物质的功能，因此，ATP 按照 ATP → ADP → AMP → IMP → HxR → Hx 的顺序依次进行酶解，减少并消失。

鱼贝类肌肉的 K 值被定义为占 ATP 相关物质总量中、分子内不具有磷酸的成分（次黄嘌呤、肌苷）之和的百分率。

$$\text{公式} \frac{\text{Hx} + \text{HxR}}{\text{Hx} + \text{HxR} + \text{IMP} + \text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP}} \times 100$$

上述公式中值越小表示越新鲜。K 值受到多种因素的影响（存储温度、存储时间等）。

## ■ 校准曲线

针对 ATP 相关物质 6 种成分制作校准曲线，所有组分的相关系数均在  $R^2=0.9999$  以上，线性良好。图 2 所示为校准曲线，表 3 所示为各成分的校准曲线浓度范围和贡献率。

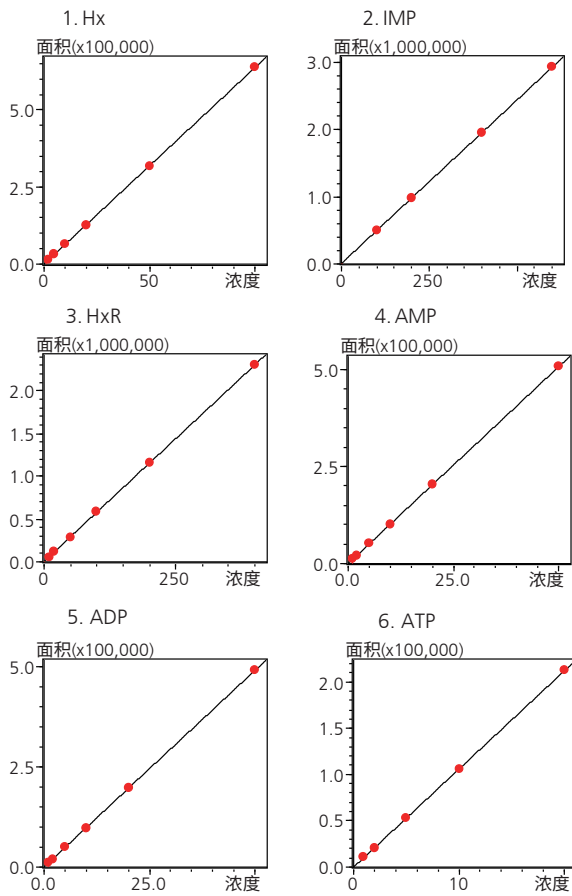


图 2 校准曲线

表 3 各成分的校准曲线浓度范围和贡献率 ( $R^2$ )

Compounds	Conc. Range ( $\mu\text{mol/L}$ )	$R^2$
Hx	2-100	0.9999972
IMP	100-600	0.9999905
HxR	10-400	0.9999822
AMP	1-50	0.9999917
ADP	1-50	0.9999960
ATP	1-20	0.9999931

## ■ 前处理

样品采用市售的新鲜长鳍金枪鱼和解冻的黄鳍金枪鱼。

前处理方法参考《关于冷冻及生鲜蓝枪鱼的 K 值产生的鲜度变化》(20121)。

使用 10% 的高氯酸萃取已匀浆的样品，然后使用 5% 的高氯酸萃取 2 次。将 3 次的萃取液上清液进行冰冷，使用 KOH 溶液 (10N、1N、0.1N) 中和后，经过滤器过滤，供 HPLC 分析。图 3 所示为前处理方案。

## ■ 金枪鱼的鲜度测定

本文中分析了购买后立即进行前处理的金枪鱼 (购买后 0 日) 和冷藏保存 1~3 日后进行前处理的金枪鱼 (购买后 1~3 日)，确认 K 值的变化。图 4 所示为新鲜的长鳍金枪鱼的色谱图，图 5 所示为解冻的黄鳍金枪鱼的色谱图。图 4、5 下部的图为放大上部图后的色谱图。另外，表 4 所示为 K 值随时间的变化和各组分的定量值。

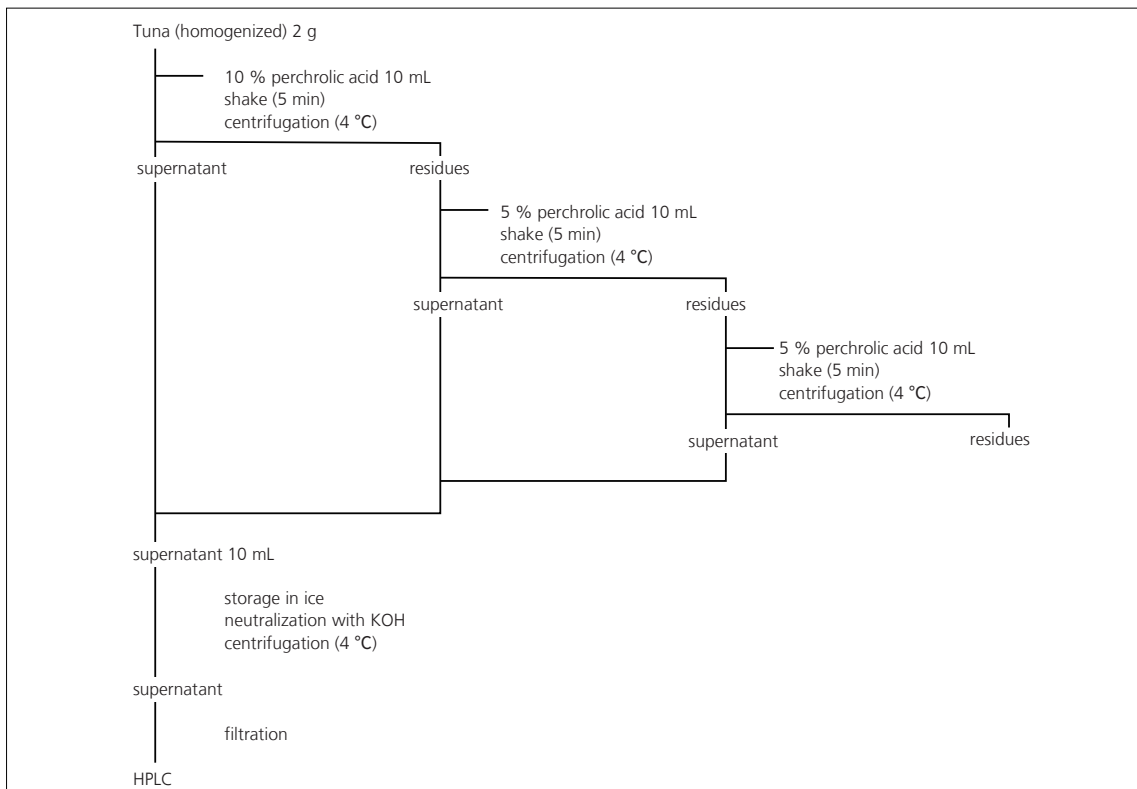


图 3 预处理方案

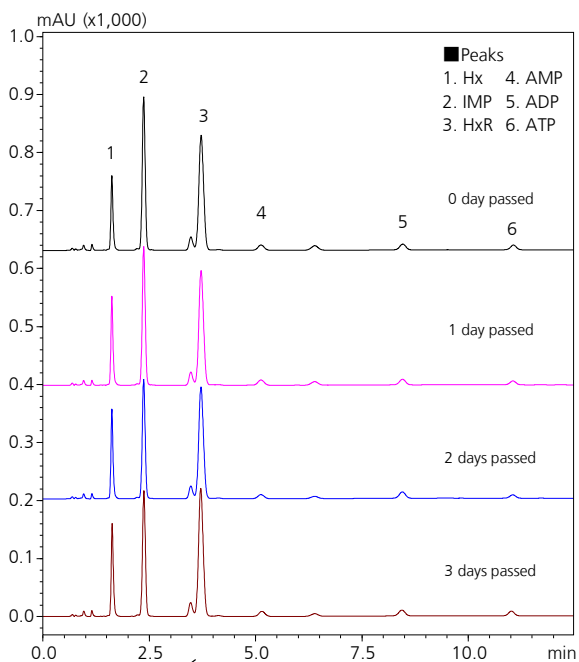


图4 新鲜长鳍金枪鱼的色谱图

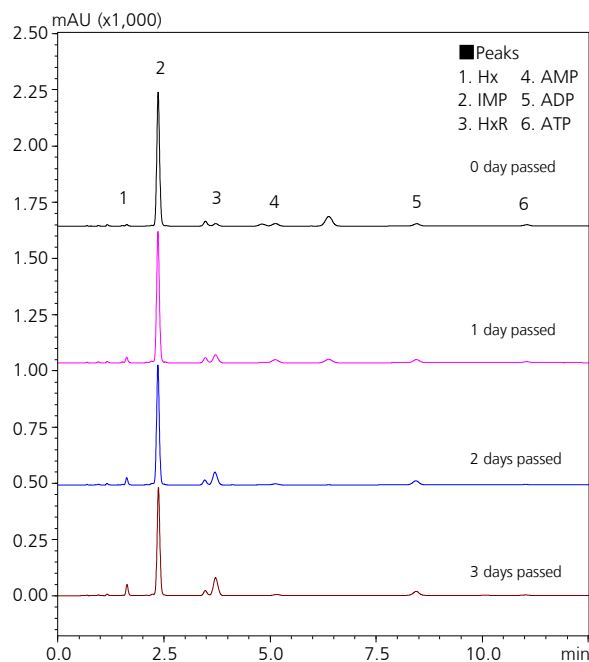


图5 解冻黄鳍金枪鱼的色谱图

表 4 K 值随着时间的变化和各成分的定量值

Albacore Tuna		Quantitative value (μmol/L)					
days	K value (%)	Hx	IMP	HxR	AMP	ADP	ATP
0	53.8	68.970	252.281	256.739	9.052	10.552	7.882
1	56.9	83.502	229.872	254.640	9.286	9.962	6.728
2	60.2	83.825	195.520	249.527	7.197	12.054	5.841
3	61.5	87.607	203.348	279.969	8.561	10.889	7.659

Yellowfin Tuna		Quantitative value (μmol/L)					
days	K value (%)	Hx	IMP	HxR	AMP	ADP	ATP
0	2.5	3.619	582.971	12.103	10.156	10.657	5.724
1	8.7	12.794	559.034	43.472	13.641	14.310	4.413
2	14.5	17.020	496.849	71.427	4.992	19.459	1.574
3	20.9	26.589	451.304	99.401	5.299	18.558	1.926

## Shim-pack GIST C18 AQ 色谱柱耐用性

Shim-pack GIST C18 AQ 是用于利用反相色谱法保留高极性化合物的色谱柱，输送 100% 纯水流动相后仍具有耐用性，可获得良好的谱峰形状。

这里确认 GIST C18 AQ 色谱柱的耐用性。确认分析实际金枪鱼样品 300 次后色谱柱负荷压（最大压）仍未上升，可稳定分析。另外，理论塔板数、对称系数方面，比较了实际样品分析前和分析 300 次后的情况。结果良好，两者的降低均不足 10%。表 5 所示为负荷压（最大压）、理论塔板数、对称系数，实际样品分析前和分析 300 次后的比较结果。

表 5 实际样品进样前和进样 300 次后各参数的减低程度

Pmax. (MPa)	Number of Injections		Decreasing rate (%)
	0	After 300	
Pmax.	22.15	22.15	0

Theoretical plate, N	Number of Injections		Decreasing rate (%)
	0	After 300	
Hx	7692	7413	3.63
IMP	5692	5256	7.66
HxR	7679	7416	3.42
AMP	7057	6410	9.17
ADP	17048	16408	3.75
ATP	31533	28970	8.13

Symmetry	Number of Injections		Deterioration rate (%)
	0	After 300	
Hx	1.165	1.163	-0.17
IMP	1.021	1.097	7.44
HxR	0.99	1.036	4.65
AMP	0.997	1.054	5.72
ADP	0.97	0.994	2.47
ATP	0.971	0.996	2.57

## 多数据报告 \*3 的使用

多数据报告是将分析结果自动转载至表计算文件的功能。在批量分析结束的同时自动加载结果。批量再次解析时也可使用，也可使用已完成分析的数据进行自动加载。该功能可缩短手动加载所花费的时间，并排除加载错误等一切风险。

本文中根据金枪鱼中的 ATP 相关物质测定结果自动制成多数据报告（图 6）。通过自动计算 K 值并制成图表，可监控 K 值随时间的变化。

此次新鲜的长鳍金枪鱼在购买当日（经过 0 日）K 值为 53.8%，鲜度下降至只适合烹饪成烤鱼。冷藏保存 2 日后 K 值超过 60%，已经变质。而解冻的黄鳍金枪鱼在购买当日（经过 0 日）K 值为 2.5%，鲜度可以作为刺身食用。但是，冷藏保存 3 日后，鲜度并不推荐生食。

\* 3 多数据报告通过 LabSolutions™ DB/CS 支持

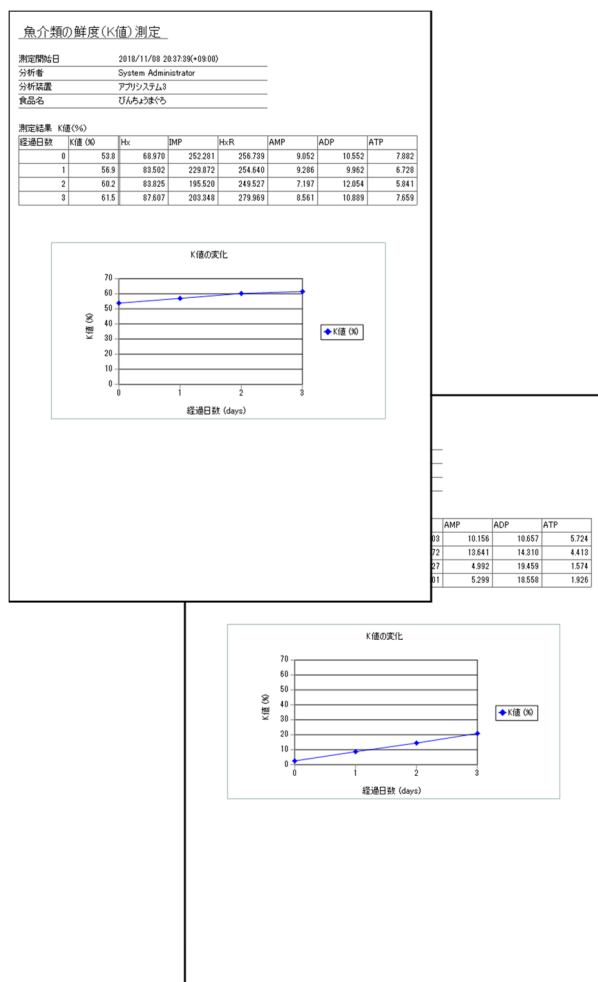


图 6 金枪鱼鲜度测定结果的多数据报告

## 总结

结果表明，使用 Nexera series 和 Shim-pack GIST C18 AQ 色谱柱，测定金枪鱼鲜度时，新鲜金枪鱼和解冻金枪鱼的鲜度有很大差异。另外，使用 GIST C18 AQ 色谱柱进行梯度分析，可缩短分析时间，进行大样本分析时仍可重复稳定分析。而使用多数据报告功能则可自动转载定量结果，通过自动计算 K 值，可以监控 K 值的变化率。

### < 参考文献 >

1) 白井一茂、渡边悦生、《关于冷冻及生鲜蓝枪鱼的 K 值产生的鲜度变化》、2012

Nexera、Shim-pack 及 LabSolutions 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

http://www.shimadzu.com.cn

用户服务热线电话： 800-810-0439  
400-650-0439

### 免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
\* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2019 年 3 月