

# Nexera™ 双进样系统快速测定鱼肉的新鲜度和变质状态

## - 同时分析鱼肉中与 ATP 有关的物质、组胺和氨基酸

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新鲜度，对保证食品的安全非常重要。

目前广泛使用的一种方法是利用与动物肌肉能源 ATP（腺苷三磷酸）有关物质的变化作为肌肉新鲜度的指标，此外，在对鱼肉新鲜度进行评估时经常使用 K 值。

另一方面，近年来，有报道称作为非挥发性变质胺的组胺会引起食物中毒，导致过敏病症。金枪鱼等红肉鱼变质后，会累积高浓度的组胺（氨基酸之一的组氨酸的代谢物）。组胺具有热稳定性，在烹饪过程中不能去除，一旦产生，就无法预防食物中毒。因此，以国际食品标准委员会（Codex）和欧洲为首的各国制定了组胺的限值标准。

L536 号应用介绍了一个测定鱼肉 K 值并针对新鲜度随时间的变化创建多数据报告的例子。在此，我们介绍一个使用 Nexera 双进样系统同时分析作为新鲜度指标的 K 值、作为变质状态指标的组胺的例子。此外，在本文的分析条件下，还可以同时分析鱼肉中所含的、以鲜味为人们所知的营养成分 - 氨基酸和核酸。

N. Iwata

### ■ 可同时进行两个系统分析的双进样系统

通常，在分析与 ATP 相关的物质和氨基酸（包括组胺）时，两者所用的分析条件（例如流动相，分析色谱柱和检测器）是不同的，因此，需要使用 2 台 HPLC 分别进行分析，或者使用 1 台 HPLC 实施 2 次分析。但是，对于随时间变化的样品（例如新鲜度或变质状态），应尽快获得结果。

使用 Nexera 双进样系统，可以通过将样品注入两个独立的流路同时分析。此外，由于将获得的两个分析数据存储在一个数据文件中，因此对同一样品的综合分析和数据管理非常容易（图 1）。

在本文中，分别使用光电二极管阵列（PDA）检测器（SPD-M40）和荧光检测器（RF-20AXS）检测 ATP 相关物质和包括组胺在内的氨基酸。

### ■ 目标成分

目标成分共有 31 种，包括 6 种 ATP 相关物质，组胺和 24 种氨基酸（20 种蛋白质和 4 种与鱼肉有关的成分）。表 1 显示了目标成分。

表 1 目标成分

ATP-related compounds *1		10	Serine	21	Tyrosine
1	Hx	11	Glutamin	22	Valine
2	IMP	12	Glycine	23	Methionine
3	HxR	13	Histidine	24	Histamine
4	AMP	14	Threonine	25	Cystine
5	ADP	15	$\beta$ -Alanine	26	Tryptophan
6	ATP	16	Arginine	27	Phenylalanine
Histamine and amino acids		17	Alanine	28	Isoleucine
7	Aspartic acid	18	Taurine	29	Leucine
8	Glutamic acid	19	Anserine	30	Lysine
9	Asparagine	20	Carnosine	31	Proline

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

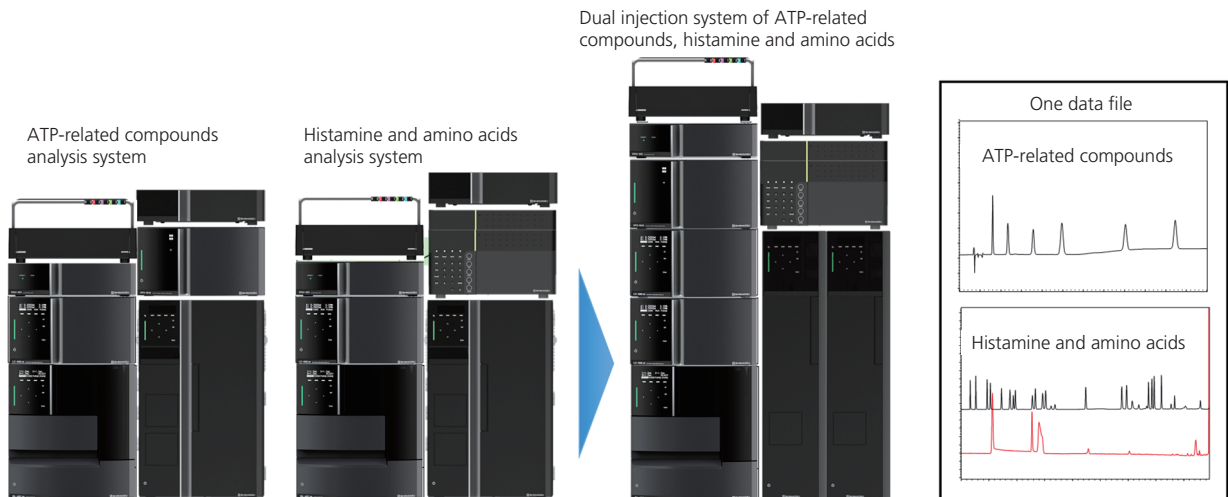


图 1 单个系统（左）和双进样系统（右）

## ■ 预处理方法以及 HPLC 分析条件

使用金枪鱼作为样品。用高氯酸萃取后除去蛋白质，然后进行中和，用 HPLC 进行分析<sup>1)</sup> (图 2)。

分析条件如表 2 所示。ATP 相关物质，组胺和 24 种氨基酸通常通过梯度洗脱来分离，将在多样品分析中反复获得稳定结果的条件作为梯度洗脱的条件。组胺和氨基酸的分析，需要使用邻苯二甲醛 (OPA) 和 9- 苄基甲基氯甲酸酯 (FMOC) 进行荧光衍生，自动进样器即可自动进行柱前荧光衍生 (表 3 和 4)。这样就无需进行复杂的手动预处理 (例如丹磺酰氯衍生化)，并保证了从衍生化到开始分析的时间保持恒定。

此外，在本文中，使用了低吸附玻璃瓶 TORAST™-H GlassVial (图 3)。该样品瓶有两个产品系列：1.5 mL 和小容量的 150 μL。衍生化试剂和衍生化前的样品使用 1.5 mL 小瓶，样品和衍生化试剂反应的小瓶，使用在少量的情况下也易于混合的 150 μL 小瓶。图 4 显示了自动进样器的样品设置。Nexera 的自动进样器 SIL-40 系列可以设置三个样品架，因此如图 4 所示，通过为每种用途设置不同样品瓶，可以防止样品设置错误。

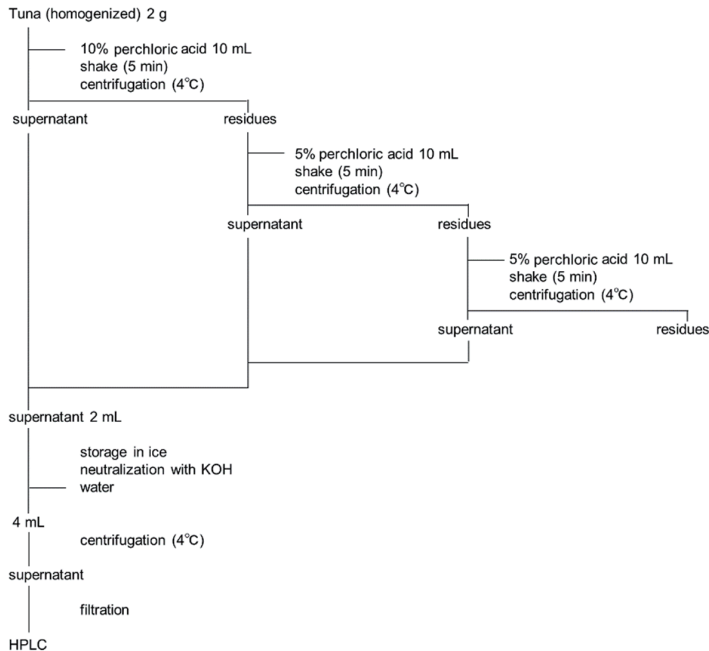


图 2 预处理方案

表 3 柱前自动衍生流程

- ① MPA\*2 solution 20 μL
- ② OPA reagent 20 μL
- ③ Sample 10 μL
- ④ Mix
- ⑤ FMOC reagent 5.0 μL
- ⑥ Mix
- ⑦ Injection

\*2 Mercaptopropionic acid



图 3 TORAST-H Glass Vial

表 4 衍生试剂的制备

- Mercaptopropionic acid solution  
Add 10 μL of 3 - mercaptopropionic acid into 10 mL of 0.1 mol/L borate buffer.
- OPA Reagent  
Add 0.3 mL of ethanol into 10 mg of *o* - phthalaldehyde and dissolve completely. Then add 0.7 mL of 0.1 mol/L borate buffer and 4 mL of ultrapure water.
- FMOC Reagent  
Dissolve 10 mg of 9 - fluorenylmethyl chloroformate into 50 mL of acetonitrile.

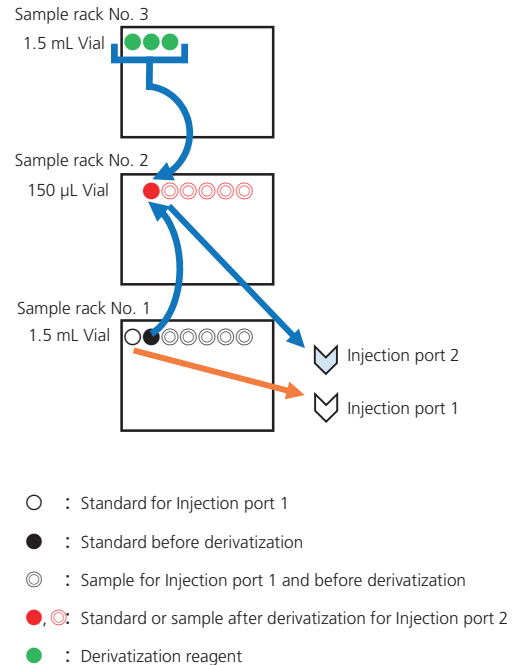


图 4 自动进样器的样品设置图例

表 2 分析条件

System	: Nexera dual injection system	
Column	<ATP-related compounds> : Shim-pack™ GIST 3μ m C18 AQ (100 mm L, 3.0 mm I.D., 3 μ m)	<Histamine and amino acids> Shim-pack Velox™ C18 (100 mm L, 3.0 mm I.D., 2.7 μ m)
Flow rate	: 0.8 mL/min	
Mobile phase	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	A) 20 mmol/L (Potassium) phosphate buffer (pH 6.5) B) Acetonitrile/ Methanol/ Water =45/40/15 (v/v/v)
Time program	: 0%B (0-4 min)→12%B (11.5 min)→100%B (11.51-18.5 min) → 0%B (18.51-32 min)	5%B (0 min)→13%B (8 min)→25%B (15 min)→ 52%B (21.5 min) →100%B (21.51-27.50 min)→ 5%B (27.51-32 min)
Column temp.	: 30°C	
Injection volume	: 10 μ L	
Detection	: PDA 260 nm	
		FL Ex: 350 nm, Em: 450 nm (Ch1) Ex: 266 nm, Em: 305 nm (Ch2)

## ■ 预处理萃取溶剂和添加回收率的确认

此前已经报道过用高氯酸提取 ATP 相关物质的预处理方法，我们讨论了是否可以同样地提取组胺和氨基酸。作为实验空白，分别添加 1 $\mu$ mol 组胺和组氨酸，以水和高氯酸进行萃取，两者均能获得稳定的萃取效率（表 5）。

另外，使用金枪鱼，根据“食品中农药残留等相关试验方法的稳定性评价指南”，同时进行 6 个添加回收试验。添加组胺使浓度达到国际食品标准委员会 (Codex) 的标准浓度 (10mg/100g)，静置 30 分钟后，同时处理 6 个样品。添加回收试验结果如表 6 所示。准确性（回收率的平均值）和精密度的结果都很好。

表 5 萃取溶剂不同时组胺和组氨酸的萃取效率

N	Extraction efficiency (%)			
	Histamine		Histidine	
	Water	Perchloric acid	Water	Perchloric acid
1	84.0	97.7	93.8	92.5
2	100.8	95.7	102.1	93.0

表 6 组胺的添加回收试验 (N = 6)

N	Recovery rates (%)
1	96.8
2	98.3
3	99.8
4	99.8
5	101.0
6	103.0
Average (%RSD)	99.8 (2.14%)

## ■ 校准曲线

针对 31 种目标成分创建校准曲线，所有成分的相关系数均在  $R^2=0.999$  以上，线性良好。表 7 所示为各成分的校准曲线浓度范围和相关系数（表 7）。

## ■ 鱼肉中的 ATP 相关物质、组胺和氨基酸的同时分析以及 k 值、组胺浓度测定

使用生黄鳍金枪鱼，在购买后立即预处理，与改变储存温度一天后预处理进行比较分析，确认 K 值和组胺浓度。储存温度为冷藏保存 (4 $^{\circ}$ C) 和室温 (25 $^{\circ}$ C)。购买一天后（存储在 4 $^{\circ}$ C 下）进行预处理与购买后立即预处理相比较，K 值略有增加 (+1.4%)，并且观察到新鲜度随时间发生了变化。此外，比较储存温度时，K 值在 25 $^{\circ}$ C 时明显增加 (+25.1%)，并且新鲜度下降，但是没有生成组胺。同样，确认了购买后冷藏储存 6 天的鲜长鳍金枪鱼的 K 值和组胺浓度。结果显示 K 值增加到 70.4%，达到所谓的变质区域，并且检测到低于 Codex 标准值的组胺。浓度为 2.1 mg/100 g。图 5 为标准品和金枪鱼中目标成分的色谱图，表 8 显示了经过不同天数、不同储存温度下的金枪鱼 K 值和组胺浓度。此外，还可以从许多氨基酸中分离并检测出组胺，也可同时分析鱼肉中常见的组氨酸、丙氨酸、牛磺酸、鹅肌肽、肌肽和赖氨酸等成分。表 9 显示了黄鳍金枪鱼中常见的核酸与氨基酸的浓度。

表 8 经过不同天数、储存温度下的金枪鱼 K 值和组胺浓度

	days	Temperature ( $^{\circ}$ C)	K value* <sup>3</sup> (%)	Histamine (mg/100 g)
Yellowfin Tuna	0	4	36.1	N.D.
		25	61.2	N.D.
	1	4	38.7	N.D.
Albacore Tuna	6	4	70.4	2.1

\*3 Definition formula for K value

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

表 7 校准曲线浓度范围和相关系数 ( $R^2$ )

Compound	Conc. range ( $\mu$ mol/L)	$R^2$	Compound	Conc. range ( $\mu$ mol/L)	$R^2$
1 Hx	1-300	0.99982	17 Alanine	0.25-100	0.99994
2 IMP	1-300	0.99983	18 Taurine	0.25-100	0.99995
3 HxR	1-300	0.99984	19 Anserine	0.25-100	0.99997
4 AMP	1-300	0.99987	20 Carnosine	0.25-100	0.99995
5 ADP	1-200	0.99998	21 Tyrosine	0.25-50	0.99995
6 ATP	1-200	0.99944	22 Valine	0.25-50	0.99995
7 Aspartic acid	0.25-50	0.99994	23 Methionine	0.25-50	0.99996
8 Glutamic acid	0.25-50	0.99995	24 Histamine	0.25-50	0.99999
9 Asparagine	0.25-50	0.99995	25 Cystine	0.25-25	0.99953
10 Serine	0.25-50	0.99995	26 Tryptophan	0.25-50	0.99993
11 Glutamin	0.25-50	0.99995	27 Phenylalanine	0.25-50	0.99995
12 Glycine	0.25-100	0.99996	28 Isoleucine	0.25-50	0.99995
13 Histidine	0.25-100	0.99968	29 Leucine	0.25-50	0.99996
14 Threonine	0.25-50	0.99994	30 Lysine	0.25-100	0.99995
15 $\beta$ -Alanine	0.25-50	0.99991	31 Proline	1-25	0.99953
16 Arginine	0.25-50	0.99994			

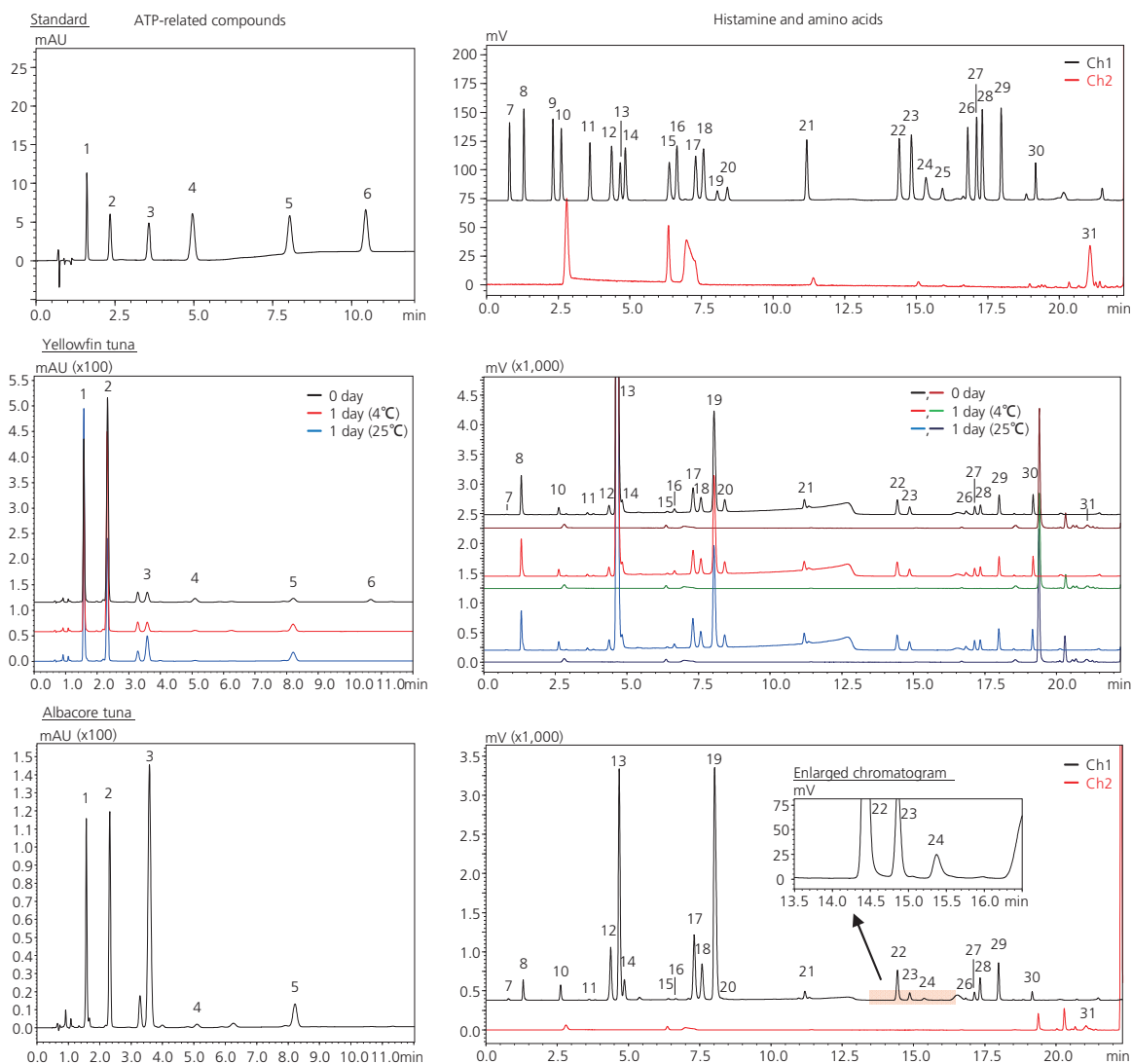


图 5 标准品和金枪鱼（黄鳍、长鳍）目标成分的色谱图

表 9 黄鳍金枪鱼中的核酸和氨基酸的浓度

		Yellowfin Tuna (0 day) ( $\mu\text{mol/L}$ ) *4
2	IMP	278.9
8	Glutamic acid	46.6
13	Histidine	(2416.0)
17	Alanine	55.7
18	Taurine	27.8
19	Anserine	(1062.5)
20	Carnosine	82.0
22	Valine	23.6
29	Leucine	20.4
30	Lysine	50.7

\*4 Values in parentheses are outside the quantification range.

[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 值产生的新鲜度变化的比较、神奈川县水产技术中心研究报告, 第 5 号, 11-14 (2012 年)

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

## 结论

使用 Nexera 双进样系统, 可以完成金枪鱼新鲜度和由于组胺引起的鱼肉变质状况的测定。ATP 相关物质和组胺可以通过相同的预处理进行萃取。换言之, 可以通过相同预处理程序获得待测样品。

K 值随储存天数和温度的变化而变化, 温度越高, K 值越大, 新鲜度越低。此外, 在 K 值显示变质的样品中也检测到了组胺。组胺可以从氨基酸中分离检测, 并且该系统可以同时分析鱼肉中所含的氨基酸。

使用 Nexera 双进样系统可同时分析鱼肉新鲜度和变质状态, 快速获得结果, 从而可以多角度地评估鱼肉样品。

岛津应用云



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 12 月