

滤纸电泳分析检测鱼的鲜度 K 值

陶志华¹, 佐藤实²

(1. 广东工业大学食品工程系, 广东广州 510006)

(2. 日本东北大学农学研究科水产资源化学研究室, 日本仙台 981-8555)

摘要:为了监控鱼类的鲜度水平, 本文建立了简单的鱼肉鲜度 K 值的滤纸电泳检测方法。样品经 1N HCl 提取、混匀后, 经高速离心机 (8000 ×g) 离心 15 min, 取上清液 10 μL 于直径 6 mm 的滤纸片上, 然后把含样品液的滤纸片放置在用醋酸吡啶缓冲液浸润的 (醋酸:吡:=10:1.289, pH=3.7) 电泳用滤纸上, 经 800 V 20 in 的滤纸电泳分离后, 在 254 nm 的紫外光视觉化处理下, 观察到 ATP+ADP+IMP, AMP, HxR+Hx 有效的分离, 样品经数据处理软件处理后进行定量分析。标准品 ATP+ADP+IMP, AMP, HxR+Hx 在 0.001 μmol 至 0.01 μmol 浓度之间, 有良好的线性关系线, 线性关系系数均为 0.99。鱼肉样品分别添加 0.3 μmol ATP 及其分解产物, 其平均回收率为 98%、96%、103%, 相对标准偏差为 0.75~5.8%。结果表明该方法具有快速、简便、准确的优点, 并且不需要昂贵的设备, 适合鱼肉鲜度 K 值的现场测定。

关键词: 鱼肉; K 值; 滤纸电泳; UV 灯

文章编号: 1673-9078(2013)10-2509-2511

Determination of K Value for Fish Freshness by Filter Paper Electrophoresis

TAO Zhi-hua¹, SATO Minoru²

(1. Department of Food and Biology Technology, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. Laboratory of Marine Biochemistry, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, 981-8555, Japan)

Abstract: In order to monitor the freshness level of fish, a simple filter paper electrophoresis was developed for the analysis of K value in fish meat. ATP and its breakdown products were extracted and homogenized from fish meat samples by 1N HCl. Each homogenate was centrifuged at 8000 ×g for 15 min, then the paper disc (6 mm in diameter) containing 10 μL supernatant was set at the electrophoresis paper which immersed in the pyridine-acetic acid buffer solution (acetic acid:pyridine:water = 1:10:289, pH 3.7), ATP and its breakdown products were separated by electrophoresis paper and analyzed under UV light at 254 nm. The visualized sample colored spots was digitized and calculated by image processing software. Successful separation of HxR and Hx from ATP and other ATP breakdown products were thus achieved. And the linearities of the mixture of ATP, ADP and IMP, AMP, and the mixture of HxR and Hx were within 0.001~0.01 μmol ($R^2=0.99$). The average recoveries of ATP and its breakdown products were 98%, 96% and 103%, respectively, with the relative standard deviations (RSD) being of 0.75~5.8%. The method was simple, effective and accurate that could be applied to determinate K value for fish freshness.

Key words: fish; K value; filter paper electrophoresis; UV light

海水鱼类具有较高的营养价值, 越来越受到消费者的青睐, 尤其是生鱼片。但是捕捞后的生鲜鱼类由于受到微生物和自身酶的作用, 营养成分逐渐降解, 鲜度逐渐下降。在鲜度下降过程中, 作为肌肉收缩的能量物质三磷酸腺苷在三磷酸腺苷酶的作用下, 逐渐降解为二磷酸腺苷 ADP, 磷酸腺苷 AMP, 肌苷酸 IMP,

收稿日期: 2013-06-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101743)

作者简介: 陶志华 (1973-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事食品质量安全方面的研究

最后分解成次黄嘌呤核苷 HxR 和次黄嘌呤 Hx。死后的新鲜鱼肉, ATP 和 ADP 的含量迅速减少, 0 °C 贮藏的新鲜鱼肉, ATP 的含量在鱼体死后大约 24 h 内基本消失。IMP 的含量在鱼体死后 5~24 h 迅速增加, 然后逐渐降低, 而 HxR 和 Hx 的含量随着 IMP 含量的降低而逐渐增加^[1]。据日本学者斋藤报道^[2], 鱼类鲜度质量指标可以通过 K 值来估算。而 K 值是通过黄嘌呤和次黄嘌呤与三磷酸腺苷的分解产物总和的比值而得到, 如下式所示。

$$K \text{ 值} / \% = [(\text{HxR} + \text{Hx})] / [(\text{ATP} + \text{ADP} + \text{IMP} + \text{AMP} + \text{HxR} + \text{Hx})] \times 100$$

斋藤报道说,死后鱼类K值的变化与鱼类营养成分的化学变化有很好的相关性。K值为20%的鱼类为新鲜鱼类,50%是中度新鲜,高于70%的鱼类是不新鲜。当K值低于20%的鱼肉,可以用作生鱼片的原材料,如果K值介于20~60%之间,可以烧烤烹饪和生产加工相应的产品。作为衡量鱼类鲜度的ATP及其分解产物的检测是很有必要的。

国内外对鱼类鲜度的测定主要有高效液相色谱法(HPLC)、生物传感器等的测定方法等^[1-8]。鉴于ATP及其分解产物能通过滤纸电泳得到分离,并且ATP及其分解产物在254 nm UV灯下产生蓝色荧光,本文建立了一种通过滤纸电泳分离及UV检出方法测定ATP及其分解产物,并能通过面积分析软件进行定量分析,并进一步通过新鲜鱼肉中的ATP及其分解产物的定时变化,证明该方法准确、简单,适用鱼肉制品的鲜度检测。

1 材料和方法

1.1 仪器设备、试样和样品

电泳装置,滤纸,UV灯,日本QS-Solution公司;高速组织匀浆机,瑞士KINEMATICA公司。

三磷酸腺苷二钠盐,二磷酸腺苷二钠盐标样,磷酸腺苷标样,肌苷酸标样,次黄嘌呤核苷标样,次黄嘌呤标样,AR级标准品,美国西格玛奥德里奇公司;醋酸,吡啶,日本和光。

鱼样品购置于日本仙台鱼清水产品市场,在冰鲜情况下输送到日本东北大学水产资源化学实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的处理

鱼肉样品切成小块,分别贮藏在-20℃、0℃、4℃和常温,分别在0h、24h、48h、72h取样,准确称取样品2g于样品管中,加入5倍量0.1N HCl,用高速组织匀浆机30s,8000×g离心15min,取上清液样品10μL进行电泳分离实验,样品同样通过Oasis® Max cartridge-spectrophotometer(日本水产资源化学研究室的实验操作手册)进行比较分析。

1.2.2 样品的测定

取10μL的上清液于直径6mm的圆型滤纸片上,然后放置于醋酸吡啶缓冲液(吡啶:醋酸:水=1:10:289)浸润的H孔型滤纸片上,在800V的电压下泳动分离20min,泳动后的滤纸干燥后,在254nm UV灯照射下进行视觉分析处理,ATP及其分解产物产生蓝色荧光,蓝色荧光图像转换后,通过面积分析软件进

行定量分析(Lane & Spot Analyzer, Japan)。标准样品通过同样的方法进行测定。

1.2.3 Oasis® Max cartridge-spectrophotometer (FSC) 色谱分析

Oasis® Max cartridge - spectrophotometer (FSC) 色谱分析鱼的鲜度K值按照日本水产资源化学研究室的实验手册进行操作^[9]。

1.2.4 回收率的分析

为验证此方法的准确性,在鱼肉样品中分别添加0.3 μmol ATP+ADP+IMP、AMP、HxR+Hx等标准样品,分别测定添加和没添加标样的鱼肉中ATP及其分解产物的量。

2 结果和讨论

2.1 ATP及其分解产物的电泳分离

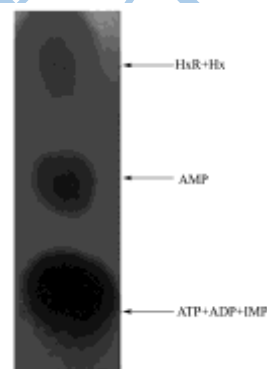


图1 ATP及其分解产物电泳分离图

Fig.1 Paper electrophoresis separation pattern of standard HxR+Hx, AMP and ATP+ADP+IMP on the electrophoresis paper (The position of HxR was same as Hx, and the position of ATP was same as ADP, IMP)

通过254 nm的紫外灯视觉化处理观察到,ATP移动位置与ADP、IMP在同一点,而AMP单独在同一位置,HxR移动位置同Hx一样。因此,ATP+ADP+IMP、AMP、HxR+Hx能进行有效分离(图1),鲜度K值能通过下列公式计算。 $K \text{ 值}/\% = (\text{HxR}+\text{Hx}) \times 100 / (\text{ATP}+\text{ADP}+\text{AMP}+\text{IMP}+\text{HxR}+\text{Hx})$

HxR+Hx是K值计算式的分子,而ATP+ADP+IMP、AMP、HxR+Hx计算式的分母,ATP+ADP+IMP、AMP、HxR+Hx在800V电压20min纸电泳成功分离后,在254nm紫外光视觉化处理后,通过分析软件处理,计算K值。在样品分离过程中,乳酸能在紫外光下被观察到,随着滤纸100℃加热时间20min,乳酸就消失了。

2.2 线性范围

ATP+ADP+IMP、AMP、HxR+Hx 标准品以 1 N 盐酸稀释成 1、5、10 mM 的标准溶液，每一标准样品吸 3 μL 到滤纸片上，在标准物质浓度为 0.001 μmol 至 0.01 μmol 之间，ATP+ADP+IMP、AMP、HxR+Hx 的浓度与紫外光视觉化点的面积有较好的线性关系，ATP+ADP+IMP 的校正曲线为： $Y_1=19839X-15562$ ， $R^2=0.997$ ，AMP 的校正曲线为 $Y_2=16020X-11977$ ， $R^2=0.999$ ，HxR+Hx 的校正曲线为 $Y_3=17978X-11091$ ， $R^2=0.997$ （图 2）。

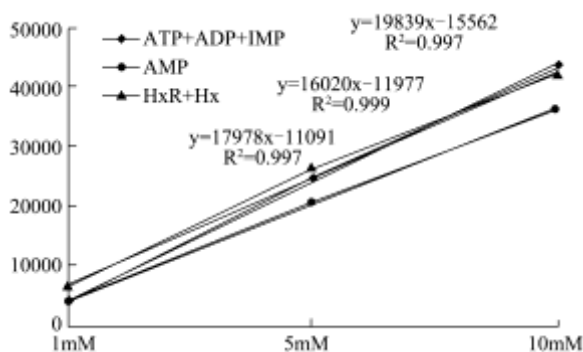


图 2 ATP+ADP+IMP、AMP、HxR+Hx 线性关系图

Fig.2 Calibration curves of AMP, the mixture of ATP, ADP and IMP and the mixture of HxR and Hx

2.3 鱼肉样品中的核苷酸成分分析

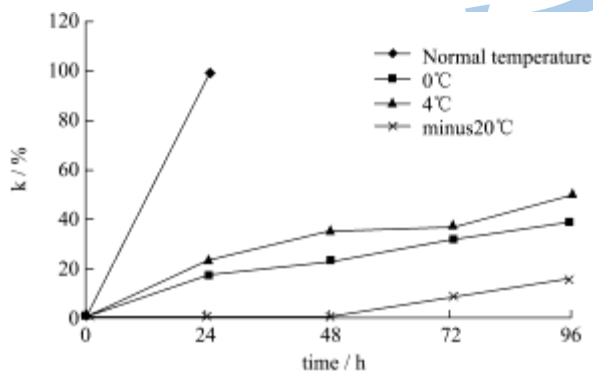


图 3 贮藏于 20 °C、0 °C、4 °C 及常温下的剥皮鱼的鲜度 K 值的变化

Fig.3. Variation of K value in the muscle of thread-sail filefishes stored at -20 °C, 0 °C, 4 °C and normal temperature

在 -20 °C、0 °C、4 °C 及常温贮藏 0 h、24 h、48 h、72 h 的鱼肉样品被滤纸电泳分离后，通过面积计算软件被分析。即杀后鱼的鲜度 K 值为 0，随着贮藏时间的延长而增加。在 -20 °C 贮藏 48 h 的鱼肉 K 值仍为零，在贮藏时间延长到 72 h 时为 8%。而贮藏于 0 °C 和 4 °C 的鱼肉鲜度 K 值的变化曲线基本一致，而贮藏于 0 °C 鱼肉鲜度 K 值略低于在 4 °C 贮藏的鱼肉，而在常温贮藏的鱼肉在 24 h 时 K 值已经达到 100%（图 3），而在 4 °C 贮藏的鱼肉样品通过滤纸电泳和色谱测定分析，

两种方法测得的鲜度 K 值能取得良好的一致（表 1）。

表 1 滤纸电泳和固相萃取柱分析剥皮鱼的 K 值变化/%

Table 1 The change of K value in thread-sail filefishes by paper electrophoresis and Oasis Max Cartridge assay

分析方法	贮藏时间/h			
	0	24	48	72
Paper electrophoresis	0	23.2±1.1	35.1±0.7	37.2±0.9
Oasis Max Cartridge assay	0	23.9±0.6	35.6±0.5	37.5±0.4

2.4 精确度及回收率的分析实验

表 2 剥皮鱼肉中的 ATP+ADP+IMP、AMP、HxR+Hx 的添加回收率

Table 2 Recovery of added ATP+ADP+IMP, AMP, HxR+Hx in fish flesh samples by paper electrophoresis assay

样品	添加前浓度/μmoles	添加浓度/μmoles	回收值/μmol	回收率/%	RSD/%
ATP+ADP+IMP	0.051	0.3	0.279~0.389	98	5.8
AMP	0.026	0.3	0.306~0.321	96	0.75
HxR+Hx	0	0.3	0.295~0.326	103	1.6

为了验证滤纸电泳检测方法的精确度，ATP、ADP、IMP、AMP、HxR、Hx 各标准溶液 0.3 mol 添加到鱼肉样品中，通过滤纸电泳分离，视觉化处理后利用面积处理软件分析其回收率，并计算其标准偏差，如表 2 所示。鱼肉中 ATP+ADP+IMP、AMP、HxR+Hx 回收率分别能达到 98%、96%、103%。各标准样品的回收率均超过 96%。相对标准偏差为 0.75~5.8%。对鱼肉鲜度 K 值的分析能得到满意的结果。

3 结论

采用盐酸提取、电泳分离、紫外视觉化处理处理方法，建立鱼肉鲜度 K 值的检测方法。对于鱼肉样品中分别添加 ATP+ADP+IMP、AMP、HxR+Hx 添加 0.3 mol 的标准样品，回收率分别能达到 98%、96%、103%，相对标准偏差为 0.75~5.8%，能满足鱼肉鲜度的监控要求。该方法能较简便准确地应用在水产品加工厂及相关科研部门，也可为其它农产品的鲜度检测提供参考。

参考文献

[1] Watanabe E, Tamada Y, Hamada-Sato N. Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on K_f value [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 21: 534-538

[2] Saito T, Arai K, Matsuyoshi M. A new method for estimating the freshness of fish. [J] Bulletin of Japanese Society

- Scientific Fisheries, 1959, 24 (9): 749-750
- [3] Currie RW, Spoms P, Wolfe FH. A method for the analysis of ATP metabolites in beef skeletal muscle by HPLC [J]. Journal of Food Science, 1982, 47: 1226-1228, 1234
- [4] Ryder J M. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of agriculture and food chemistry, 1985, 33: 678-680
- [5] Vazquez-Ortiz FA, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sanchez ME, et al. Application of the freshness quality index (K value) for fresh fish to canned sardines from Northwestern Mexico [J]. Journal of Food composition Analysis. 1997, 10: 158-165
- [6] Hamada-Sato N, Usui K, Kobayashi T, et al. Quality assurance of raw fish based on HACCP concept [J]. Food Control, 2005, 16 (4): 301-307
- [7] Karube I, Matsuoka H, Suzuki S, et al. Determination of fish freshness with an enzyme sensor system [J]. Journal of agriculture and food chemistry, 1984, 32 (1): 314-319
- [8] Okuma H, Takahashi H, Yazawa S, et al. Development of a system with double enzyme reactors for the determination of fish freshness [J]. Analytica Chimica Acta, 1992, 260(1): 93-98