

# 虾类冷藏期间 ATP 关联产物含量的变化及其降解途径的研究

邱伟强, 谢晶, 陈舜胜, 曲映红, 宋雪, 王丹妮

(上海海洋大学食品学院, 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 研究了冷藏期间斑节对虾(海水虾)、罗氏沼虾(淡水虾)死后 ATP 关联产物的变化及其降解途径。以高氯酸溶液作为蛋白沉淀剂, 采用高效液相色谱(HPLC)法对(4±1)℃贮藏期间斑节对虾和罗氏沼虾两种虾肉中 9 种 ATP 关联产物含量变化进行分析。结果发现: 9 种 ATP 关联产物在 25 min 内完全分离, 在 1~250 μg/mL 范围内有良好线性关系, 最低检测限在 0.02~0.10 μg/mL 之间, 加标回收率在 72.5%~110% 之间, 表明该 HPLC 法准确可靠。贮藏期间两种虾肉中 ATP、ADP 关联产物变化趋势基本相似, ATP、ADP 在贮藏 1 d 后都迅速下降, AMP、IMP、HxR 都呈先上升后下降趋势, Hx、AdR、Xt 基本都呈线性上升趋势, 未检测到 Ad, 两种虾肉中 9 种 ATP 关联产物总量基本不变, 可以初步确定虾死后 ATP 同时存在 ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx→Xt(占 99% 以上)和 ATP→ADP→AMP→AdR→HxR→Hx→Xt(占 1% 以下)两条降解途径。斑节对虾以蓄积 AMP、IMP 为主, 罗氏沼虾以蓄积 IMP 为主。

**关键词:** 虾类; 高效液相色谱; ATP 关联产物; 降解途径

文章编号: 1673-9078(2015)10-103-108

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.018

## Changes of ATP-Related Compounds Contents and Its Degradation Pathways in Shrimps during Chilled Storage

QIU Wei-qiang, XIE Jing, CHEN Shun-sheng, QU Ying-hong, SONG Xue, WANG Dan-ni

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University/Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The changes of ATP-related compounds and ATP degradation pathways in *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii* meat were studied during chilled storage at (4±1) °C. Hyperchloric acid was used to precipitate proteins, 9 ATP related compounds were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC). Results showed that all 9 ATP related compounds were completely separated within 25 minutes. Good linearity was observed in the concentration ranging from 1~250 μg/mL. Limit of detection was between 0.02~0.10 μg/mL and spike recoveries were between 72.5%~110%. This method is reliable and accurate for the analysis of ATP-related compounds in shrimp meat samples. ATP and ADP content decreased dramatically on day 1 during chilled storage. AMP, IMP and HxR all increased first then decreased latter. Hx, AdR, Xt increased linearly during storage time, Ad was not detected. The total content of 9 ATP-related compounds in the two shrimps didn't change. The degradation pathways of ATP in the two shrimps during chilled storage were proposed as ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx→Xt (major, more than 99%) and ATP→ADP→AMP→AdR→HxR→Hx→Xt (minor, less than 1%). IMP and AMP were predominantly accumulated in *P. monodon*, while IMP was predominantly accumulated in *M. rosenbergii*.

**Key words:** shrimps; HPLC; ATP-related compounds; degradation pathways

虾类属于节肢动物门(Arthropoda), 甲壳纲(Crust-

收稿日期: 2015-02-04

基金项目: 国家“十二五”支撑计划课题(2013BAD19B06); 上海市科委重点项目(14dz1205101); 上海海洋大学科技发展专项

作者简介: 邱伟强(1984-), 男, 在读博士, 助理工程师, 研究方向为水产品低温保鲜技术

通讯作者: 谢晶(1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向为水产品低温保鲜技术

acea), 十足目(Decapoda), 枝鳃亚目(Dendrobranchiata)。虾肉味道鲜美, 且具有高蛋白, 低脂肪, 低糖, 含大量微量元素和人体必需的氨基酸等特点, 已成为合理膳食结构中的重要组分, 越来越受消费者喜爱<sup>[1]</sup>。ATP 关联产物是由嘌呤碱基、嘧啶碱基、尼克酰胺等与糖磷酸酯组成的一类化合物, 如三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)、二磷酸腺苷(Adenosine Diphosphate, ADP)、腺苷酸(Adenosine Monophos-

phate, AMP)、肌苷酸(Inosinic Acid, IMP)、次黄嘌呤核苷(Inosine, HxR)、次黄嘌呤(Hypoxanthine, Hx), 腺苷(Adenosine, AdR), 腺嘌呤(Adenine, Ad)和黄嘌呤(Xanthine, Xt)等, 它们是虾类等水产动物肌肉中重要组成成分。一般认为鱼死后 ATP 依次降解为 ADP、AMP、IMP、HxR 和 Hx, Hx 又会继续被氧化成 Xt, 其中 HxR、Hx 量之和对 ATP、ADP、AMP、IMP、HxR 和 Hx 总量的比值为 K 值<sup>[2]</sup>, K 值的大小能反映鱼体从僵硬至自溶阶段的鲜度。目前国内外学者在 ATP 关联产物的研究主要集中在鱼类, Li 等<sup>[3]</sup>对冷藏期间大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) ATP 关联产物研究表明, K 值能作为评价鱼肉鲜度的重要指标; 而在虾类等无脊椎动物中 ATP 关联产物研究很少, K 值能否作为虾类鲜度指标也有待研究。沈月新等<sup>[4]</sup>认为海洋无脊椎动物 ATP 降解产物的积累形式和鱼类不同, 在头足类等无脊椎动物中 ATP 的降解不经过 IMP, 而是经过 AdR 分解为 HxR, 但虾蟹类也存在经 IMP 的分解途径。Arai 等<sup>[5-6]</sup>发现蛤蜊(*clam*)和扇贝(*escallop*)的肌肉中, ATP 的降解途径为 ATP→ADP→AMP→AdR→HxR→Hx, 由 ATP 经过 AdR 分解为 HxR, 而不经 IMP, 鲍鱼(*Abalone*)的肌肉中按途径 ATP→ADP→AMP→AdR→Ad 进行, Fujisawa 等<sup>[7]</sup>发现双壳类肌肉组织中的 AMP 脱氨酶活性比鱼类和哺乳动物中的要低得多, 这也正好支持了 Arai 等的研究结论。而 Shirai 等<sup>[8]</sup>发现日本对虾(*Penaeus japonicus*)肌肉中同时存在 ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx 和 ATP→ADP→AMP→AdR→HxR→Hx 两条降解途径。戚晓玉等<sup>[9]</sup>认为 K 值可以作为日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)潜在的鲜度指标, 但未涉及 AdR 和 Ad 含量测定以及 ATP 降解途径的研究。

综上所述, 目前对虾类冷藏期间 ATP 关联产物的变化及 ATP 降解途径的研究很少, 虾类 ATP 降解途径尚无定论, 海水虾与淡水虾中 ATP 降解途径是否异同也有待进一步研究。因此, 本研究分别以斑节对虾(*Penaeus monodon*) (海水虾) 和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) (淡水虾) 为对象, 采用 HPLC 方法对 4±1 °C 贮藏期间两种虾肉中 ATP 关联产物含量变化及 ATP 降解途径进行分析, 初步探究虾类死后 ATP 降解途径, 旨在为虾类保鲜提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和材料

实验用的鲜活斑节对虾、罗氏沼虾购于上海市铜川路水产市场, 充氧并迅速运回实验室后, 立即用冰水清洗, 沥干表面水分后进行实验或置于 4±1 °C 冰箱冷藏。

Waters e2695 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司), 配套 Waters 2996 二极管阵列检测器及 Empower2 色谱管理软件; 岛津 KUBOTA 520 离心机; 岛津 SK8200 HP 超声仪; MILLI-Q 去离子水纯化系统(美国 Millipore 公司); 日本 YAMATO 匀浆机; 分析天平(METTLER TOLEDO AB104-N); 瑞士 METTLER TOLEDO 酸度计(pH 计)。

### 1.2 试剂

ATP、ADP、GMP、AMP、IMP、HxR、Hx、AdR、Ad、Xt 标准品均购自于 Sigma 公司; 甲醇为 HPLC 级; 实验用水为超纯水; 磷酸氢二钾; 磷酸二氢钾, 高氯酸(PCA), 氢氧化钾, 磷酸, 均为优级纯。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: 岛津 ODS-3 C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: A 为 20 mmol/L 磷酸二氢钾和 20 mmol/L 磷酸氢二钾 (1:1) 溶液, 用磷酸调 pH 至 5.8, B 为纯甲醇溶液; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL; 检测波长: 254 nm。梯度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 洗脱程序为: 0~6 min, 缓冲液为 100% 流动相 A; 6~15 min, 流动相 B 线性增加至 8%; 15~20 min, 流动相 B 线性增加至 35%, 保持 2 min; 22~24 min 将流动相 A 线性调到 100% 初始梯度状态, 色谱柱平衡 6 min 后进入下一个样品。

### 1.4 标准溶液的配制

分别精确称取 ATP 关联产物标准品适量, 用超纯水配成 2000 μg/mL 的标准储备溶液, 标准溶液在 4 °C 下可保存 7 d。将含有 ATP 关联产物的标准混合溶液用超纯水进行适当稀释, 使其浓度分别为 5、10、20、50、100 和 250 μg/mL。

### 1.5 样品制备

称取虾肉样品 5.0 g 至离心管中, 加入 20 mL 预冷的 10% 高氯酸(PCA)溶液充分匀浆, 用玻璃棒搅拌均匀后, 在 5000 r/min 下冷冻离心 10 min, 收集上清液, 沉淀物再次加入预冷的 5% PCA 溶液浸提、离心, 重复操作一次, 合并上清液。用 KOH 溶液中和并调 pH 至 5.8。中和时, 先加入 10 mol/L 的 KOH 溶液, 待接近至所需的 pH 时, 改用 1 mol/L 的 KOH 溶液调

节。用已中和的 1%PCA 溶液 (pH=5.8) 将其定容到 50 mL 容量瓶中, 过滤除去高氯酸钾结晶, 再用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  微孔水相滤膜过滤, 用 HPLC 进样分析。剩余样品于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存, 测定时, 将样品溶解后上机分析。

## 1.6 核苷酸关联物的含量计算

$$X = \frac{C \times V}{m \times M}$$

注: X-样品中 9 种 ATP 关联产物的含量,  $\mu\text{mol/g}$ ; C-由工作曲线上查出的样品测定液中相当于 9 种 ATP 关联产物的浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ; V-样品提取液的体积, mL; m-样品的质量, g; M-相应 9 种 ATP 关联产物的分子量。

## 1.7 数据分析

试验中每个样品的 ATP 关联产物平行测定 3 次, 采用 SPSS 20.0 进行相关性分析, 差异性分析采用单因素方差分析方法 ( $p < 0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 ATP 及其关联物标准品的 HPLC 色谱图

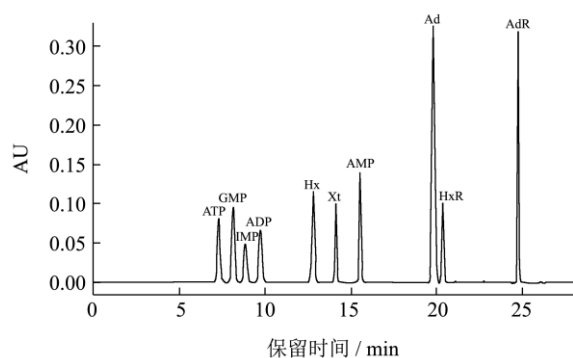


图 1 9 种 ATP 关联物及 GMP 标准品 HPLC 色谱图

Fig.1 Chromatogram of 9 ATP-related compounds and GMP standards

为防止虾肉样品中可能含有的少量鸟苷酸 (GMP) 会对待测 ATP 关联产物产生干扰, 在检测 9 种 ATP 关联产物标准品实验时另外添加了 GMP 标准品, 并试图将 GMP 与其他 9 种 ATP 关联化合物完全分离。通过实验发现, 选取岛津 ODS-3 C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 以 A(20 mmol/L 磷酸二氢钾和 20 mmol/L 磷酸氢二钾等体积混合)和 B(纯甲醇溶液)为流动相, 采用“1.3”节色谱条件进样。ATP、GMP、ADP、AMP、IMP、AdR、HxR、Hx、Xt、Ad 在 25 min 内都得到有效分离。图 1 为 9 种 ATP 关联物及 GMP 标准化合物的 HPLC 色谱图, 以往的高效

液相色谱法大多采用离子对试剂法<sup>[10]</sup>, 离子对试剂价格昂贵, 容易对色谱柱造成污染, 缩短柱子寿命, 还有的检测方法或者种类有限, 或者分析时间过长<sup>[11]</sup>。本实验所采用反相液相色谱法, 流动相配制简单, 不添加离子对试剂, 在 25 min 内对 9 种 ATP 关联物及 GMP 达到快速分离测定, 与以往的分析方法相比, 该法具有快速、简便等优点。

## 2.2 方法性能评价

试验以线性范围、检测限、精密度以及回收率等指标进行方法性能评价。在线性范围与检测限试验时, 将含有 9 种 ATP 关联物标准混合溶液用超纯水进行适当稀释, 使其浓度分别为 5、10、20、50、100 和 250  $\mu\text{g/mL}$ , 按“1.3”节色谱条件进行液相色谱测定, 每个浓度分别进样 3 次, 根据保留时间定性, 以所测色谱的峰面积与其相应的 ATP 关联物浓度绘制标准曲线, 校准曲线采用线性相关系数 ( $R^2$ ) 进行评价; 根据信噪比计算, 当待测物质色谱峰的峰高为噪音峰高 3 倍时, 确定该浓度为最低检测限 (LOD), 当色谱峰的峰高为噪音峰高 10 倍时, 确定该浓度为定量限 (LOQ); 精密度试验时, 选择日内和日间的变化作为精密度评价试验, 取适量 9 种 ATP 关联物标准品加入到虾肉样品中, 分别加入适当浓度的混合标准溶液, 按“1.5”节所述步骤进行样品处理, 对同一样本溶液在 1 d 之内进行 5 次重复试验以分析日内变化, 对同一样本溶液每天测定一次, 连续测定 5 d 进行分析日间的变化; 在回收率试验时, 取适量 9 种 ATP 关联物标准品加入到 5.0 g 虾肉样品中, 分别加入高中低 3 种浓度的混合标准溶液, 按“1.5”节所述步骤进行样品处理, 每组做 3 个平行, 用外标法计算其实际含量和加标回收率。

结果表明, 所有 9 种 ATP 关联产物在 1~250  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好, 线性相关系数 ( $R^2$ ) 在 0.9994~0.9999 之间, 最低检测限在 0.02~0.10  $\mu\text{g/mL}$  之间, 表明该方法有良好的线性关系及较高的灵敏度。日内浓度变化的 RSD 在 1.2%~3.4%, 日间浓度变化的 RSD 在 1.5%~5.4%, 回收率在 72.5%~110%, RSD 为 4.2%~8.7%, 表明仪器精密度和重现性良好, 该 HPLC 法定性和定量可靠性高。

### 2.3 4 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏期间斑节对虾和罗氏沼虾肌肉中 ATP 关联产物的变化

分别取在 4 $\pm$ 1  $^{\circ}\text{C}$  冷藏后 0、1、2、3、4、5、6 和 7 d 的虾肉样品 5.0 g 左右, 每个样品做 3 个平行, 按



“1.5”节所述步骤进行提取 ATP 关联产物，再经孔径为 0.22 μm 的水相微孔滤膜过滤，按色谱条件进样 10 μL，图 2 为斑节对虾和罗氏沼虾 4±1 °C 贮藏 0~7 d 的液相色谱图，采用外标法计算贮藏期间两种虾肉中 ATP 关联产物的变化。

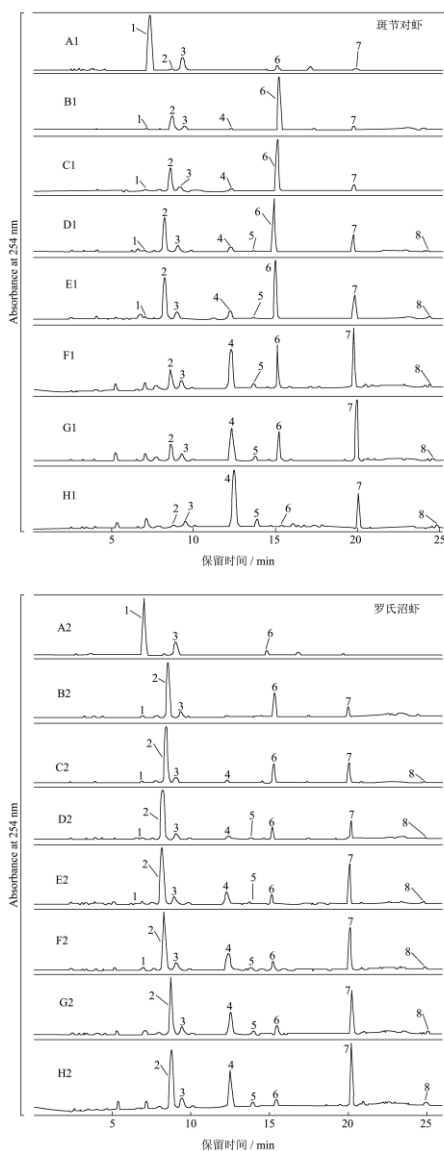


图 2 A1-H1 和 A2-H2 色谱图分别是斑节对虾和罗氏沼虾贮藏 0~7d 后的液相色谱图

Fig. 2 Chromatograms of ATP-related compounds. A1-H1 and A2-H2 are chromatograms of *P. monodon* and *M. rosenbergii* at 0~7 d, respectively

注：标峰：1. ATP 2. IMP 3. ADP 4. Hx 5. Xt 6. AMP 7.HxR 8. AdR.

由图 3 可知，两种虾刚死后肌肉中 ATP、ADP 含量都很高，其中斑节对虾肌肉中 ATP 和 ADP 含量分别为 8.62 和 2.38 μmol/g，罗氏沼虾肌肉中 ATP、ADP 含量分别为 8.50 μmol/g、1.66 μmol/g，4±1 °C 贮藏 1 d 后，两种虾肉中 ATP 都快速下降，斑节对虾、

罗氏沼虾肌肉中 ATP 含量分别降为 0.26 μmol/g、0.12 μmol/g，下降幅度分别达到 98.59%、96.98%。两种虾肉中 ADP 也有较快下降，含量分别降为 0.93 μmol/g、0.74 μmol/g。这与 Matsumoto 等<sup>[12]</sup>所报道的日本对虾结果相似。

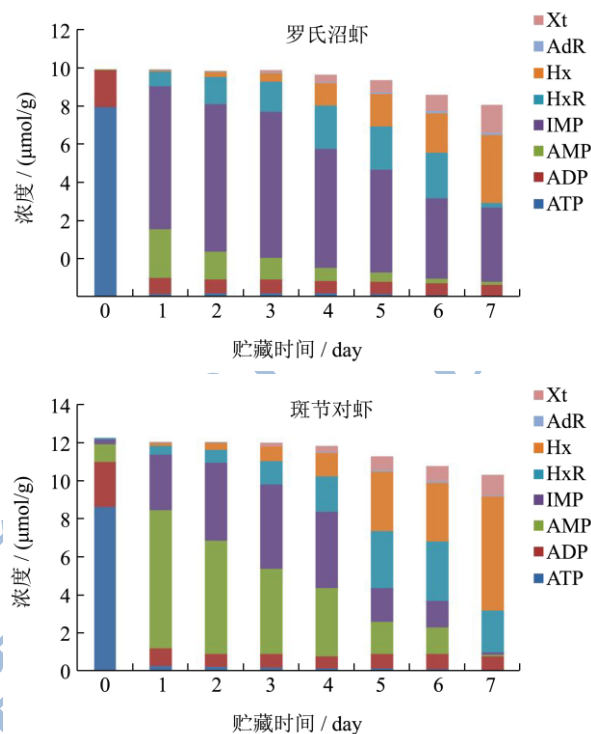


图 3 贮藏期间斑节对虾和罗氏沼虾肉中 ATP 关联产物的变化

Fig.3 Changes in levels of ATP related compounds in *P. monodon* and *M. rosenbergii* meant during chilled storage

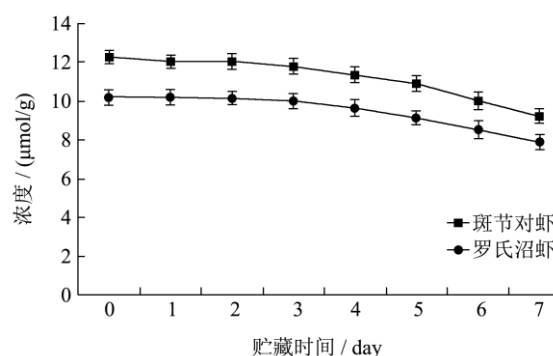


图 4 贮藏期间斑节对虾和罗氏沼虾肉中 ATP 关联产物总量的变化

Fig.4 Changes in levels of ATP related compounds in *P. monodon* and *M. rosenbergii* during chilled storage

虾类等水产品中 ATP 快速下降的原因可能与其体内高活性的 ATP 酶有关<sup>[13]</sup>。Watabe 等<sup>[14]</sup>认为 ATP 的快速下降是由于水产动物在死后最初阶段，肌细胞中肌浆网的 Ca<sup>2+</sup>吸附能力下降，使得肌浆网中的 Ca<sup>2+</sup>大量释放至细胞液中，促使肌原纤维内 Ca<sup>2+</sup>的浓度增加，进而激活了肌原纤维 ATP 酶的活性，使 ATP 迅

速降解。在此后贮藏期间,两种虾中 ATP、ADP 的含量都缓慢下降,在第 7 d,斑节对虾肌肉中 ATP、ADP 含量分别下降至 0.10  $\mu\text{mol/g}$ 、0.58  $\mu\text{mol/g}$ ,罗氏沼虾肌肉中 ATP、ADP 含量分别下降至 0.02  $\mu\text{mol/g}$ 、0.51  $\mu\text{mol/g}$ ,两种虾肉中 ATP、ADP 下降趋势一致。

两种新鲜虾的肌肉中 AMP 含量都很低,其中斑节对虾肌肉中 AMP 含量 0.92  $\mu\text{mol/g}$ ,罗氏沼虾为 0.04  $\mu\text{mol/g}$ ,4 $\pm$ 1  $^{\circ}\text{C}$ 贮藏 1 d 后,斑节对虾肉中 AMP 含量迅速增加至 7.27  $\mu\text{mol/g}$ ,由 ATP 在酶的作用下迅速通过 ADP 降解为 AMP,此后的贮藏过程中 AMP 几乎呈线性下降,贮藏 7 d 后降至 0.08  $\mu\text{mol/g}$ 。罗氏沼虾贮藏 1 d 后 AMP 含量增加至 2.17  $\mu\text{mol/g}$ ,与斑节对虾相比增幅较小,在此后的贮藏过程中其含量也基本呈线性下降趋势,在贮藏 7 d 后降至 0.13  $\mu\text{mol/g}$ 。两种虾肉中 AMP 的降解是由于 AMP 被 AMP 脱氨酶分解成 IMP,其中斑节对虾 IMP 含量从死后当 d 的 0.24  $\mu\text{mol/g}$ ,到贮藏 2 d 后含量上升到最高的 4.39  $\mu\text{mol/g}$ ,在酶的作用下从第 4 d 开始下降,贮藏 6 d 后含量仍有 1.40  $\mu\text{mol/g}$ ,贮藏 7 d 后 IMP 基本消失;罗氏沼虾肌肉 IMP 含量则是在贮藏 1 d 后迅速增加到最高的 6.42  $\mu\text{mol/g}$ ,在之后几天的贮藏过程中缓慢下降,贮藏 7 d 后 IMP 含量仍有 3.04  $\mu\text{mol/g}$ 。IMP 是具有强烈鲜味的呈味物质,虾类肉质鲜美与其高含量的 IMP 密切相关。本实验中的两种虾在贮藏期间 IMP 的变化趋势与日本对虾、日本沼虾相似<sup>[9,12]</sup>。

如图 3,斑节对虾、罗氏沼虾在贮藏期间始终未检出 Ad,而在贮藏 1 d 后都能检测到少量的 AdR,两种虾肉中 AdR 含量都为 0.03  $\mu\text{mol/g}$ ,并随着贮藏时间的延长含量都有所上升,但其含量一直都保持在较低的水平,贮藏第 7 d,斑节对虾、罗氏沼虾中 AdR 含量分别上升至 0.07  $\mu\text{mol/g}$ 、0.10  $\mu\text{mol/g}$ 。AMP 在水产动物体内可能存在两种降解方式,一种是经 AMP 脱氨酶作用降解生成 IMP,另一种是经 5'-核苷酸酶作用生成 AdR,而 AdR 在两种虾肉中都被检出,并随着贮藏时间的延长含量都有所上升,可能是因为这两种虾肉中都含有 5'-核苷酸酶<sup>[10]</sup>。

贮藏期间,两种虾肉中 HxR 的含量变化规律相似,都呈先上升后下降趋势,斑节对虾在死后当天 HxR 的含量为 0.10  $\mu\text{mol/g}$ ,在贮藏 6 d 后增加至最高值 3.12  $\mu\text{mol/g}$ ,第 7 d 开始下降至 2.21  $\mu\text{mol/g}$ ,而罗氏沼虾在贮藏 1 d 后才被检出有 HxR,含量为 0.64  $\mu\text{mol/g}$ ,贮藏 6 d 后增加至最高值 2.07  $\mu\text{mol/g}$ ,在第 7 d 时,迅速下降至 0.21  $\mu\text{mol/g}$ 。HxR 值的上升是因 IMP 在 5'-核苷酸酶的作用下由脱磷酸生成,而其含量下降则可能是由于虾在贮藏后期微生物大量繁殖产生的代

谢产物以及内源酶共同作用使 HxR 降解所致。

如图 3,两种虾肉中 Hx 含量的变化趋势相似,都随着贮藏时间的延长缓慢地呈线性上升,斑节对虾从死后当天 0  $\mu\text{mol/g}$  上升到第 7 d 的 5.96  $\mu\text{mol/g}$ ,平均每天上升 0.85  $\mu\text{mol/g}$ ,罗氏沼虾则从死后当天 0  $\mu\text{mol/g}$  上升到贮藏 7 d 后的 3.05  $\mu\text{mol/g}$ ,平均每天上升 0.44  $\mu\text{mol/g}$ ,相对于斑节对虾上升更缓慢。Hx 被认为是导致异味的物质,随着贮藏时间的延长而上升,从而导致虾体腐败味的产生。Hx 含量的增加主要是由于虾体内微生物生长所产生的代谢产物所致,因为, Hx 的水平可用作日本沼虾腐败的一种化学指标<sup>[9]</sup>。

Xt 是 Hx 在黄嘌呤氧化酶的作用下进一步降解产生,在虾贮藏过程中鲜度下降到后期产生,两种虾都在贮藏 3 d 后才检出 Xt,斑节对虾、罗氏沼虾贮藏 3 d 后 Xt 的含量分别为 0.19  $\mu\text{mol/g}$ 、0.10  $\mu\text{mol/g}$ ,之后两种虾肉中 Xt 含量都随着贮藏时间的延长而升高,在贮藏 7 d 后两种虾肉中 Xt 含量分别增加至 1.07  $\mu\text{mol/g}$  和 1.03  $\mu\text{mol/g}$ 。

鱼类肌肉中,在内源酶的作用下 ATP 快速降解至 IMP,但 IMP 降解非常缓慢,所以在鱼类肌肉中主要蓄积 IMP,而没有 AMP 蓄积。本研究发现,由图 3 可知,斑节对虾在贮藏期间主要蓄积 IMP 和 AMP,贮藏 1 d 后虾肉中 AMP 和 IMP 开始蓄积并达到最高值,虾肉中 IMP 和 AMP 含量之和占有 9 种 ATP 关联产物含量的 83.54%,AMP 和 IMP 蓄积程度相近,分别占 ATP 关联产物总量的 49.67% 和 33.88%;罗氏沼虾则是以 IMP 积蓄为主,贮藏 1 d 后 IMP 占 ATP 关联产物总量的 65.16%,而 AMP 仅占 ATP 关联产物总量的 12.57%。两种虾肉中 AMP 和 IMP 在贮藏 2 d 后开始下降。这与戚晓玉等<sup>[9]</sup>对日本沼虾的研究结果相同。

## 2.4 虾类死后 ATP 降解途径探讨

鱼类 ATP 降解一般是按 ATP $\rightarrow$ ADP $\rightarrow$ AMP $\rightarrow$ IMP $\rightarrow$ HxR $\rightarrow$ Hx 途径进行。Saito 等<sup>[5-6]</sup>发现在蛤蜊和扇贝的肌肉中,ATP 的降解途径为 ATP $\rightarrow$ ADP $\rightarrow$ AMP $\rightarrow$ AdR $\rightarrow$ HxR $\rightarrow$ Hx,由 ATP 经过 AdR 分解为 HxR,而不经 IMP,舟贝、毛蚶和鲍鱼的肌肉中以 ATP $\rightarrow$ ADP $\rightarrow$ AMP $\rightarrow$ AdR $\rightarrow$ Ad 途径进行。本实验发现斑节对虾、罗氏沼虾在贮藏期间始终未检测到 Ad,而贮藏 1 d 后在两种虾肉中都能检测到少量 AdR,且 AdR 随着贮藏时间的延长而上升,但其含量一直都保持在较低的水平。ATP 快速降解成 AMP 时,AMP 可能降解成 IMP 或 AdR,且虾肉贮藏 1 d 后,在 IMP 蓄积期间,两种虾肌肉中的 AdR 所占 IMP 和 AdR 总

量比值都不到 1%。综上所述,本研究认为,斑节对虾、罗氏沼虾 4±1℃贮藏期间,ATP 降解途径是按 ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx→Xt (主要途径,占 99%以上)和 ATP→ADP→AMP→AdR→HxR→Hx→Xt (次要途径,占 1%以下),并不存在 ATP→ADP→AMP→AdR→Ad。这与 Shirai 等<sup>[8]</sup>研究发现的珍宝蟹 (*Cancer magister*) 和日本对虾肌肉中 ATP 降解途径结果相似。由图 4,4±1℃贮藏期间,两种虾肉中 ATP 关联产物总量在死后初期基本保持不变,在后期略有下降,因为 ATP 以 ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx→Xt 途径降解或者以 ATP→ADP→AMP→AdR→HxR→Hx→Xt 途径降解,所有 ATP 关联产物的总摩尔数理论上不变,这也恰好证明了本研究所提出的虾类死后肌肉中 ATP 的两条降解途径的观点。此外,本研究还发现斑节对虾总 ATP 关联产物含量显著高于罗氏沼虾 ( $P<0.05$ ),可能因为斑节对虾是海水养殖,虾体为适应海水环境,保持与海水相近的渗透压,因此,体内比淡水养殖的罗氏沼虾有更高的核苷酸类等可以调节渗透压的物质。斑节对虾属和罗氏沼虾都属于无脊椎动物,两种虾肉中 ATP 降解途径并没有区别,都以 ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx→Xt 途径为主,只是蓄积产物有所区别,斑节对虾主要蓄积 IMP 和 AMP,罗氏沼虾则主要蓄积 IMP。

鱼类死后 ATP 降解途径已经确定,可以用 K 值作为其鲜度指标,如下式表示<sup>[2]</sup>:

$$K = \frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx} \times 100\%$$

本研究发现斑节对虾、罗氏沼虾死后 ATP 的降解途径与鱼类不同,可能同时存在两条途径,ATP 降解成 AMP 时,AMP 可能降解成 IMP 或 AdR 两种物质,而最后的降解产物都为 HxR、Hx 和 Xt,因此,本研究认为对于斑节对虾、罗氏沼虾来说,鲜度指标 K 值应该为 HxR、Hx 和 Xt 量之和对 ATP、ADP、AMP、IMP、AdR、HxR、Hx 和 Xt 总量的比值,由于经 AdR 的途径是次要途径(仅占 1%以下),AdR 含量几乎不影响对 K 值的计算结果,因此,本研究认为虾类 K 值的可以用下式 Ks 表示更合理,但也需进一步研究。

$$K_s = \frac{HxR + Hx + Xt}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx + Xt} \times 100\%$$

### 3 结论

本研究以高氯酸溶液作为提取剂,采用 HPLC 方法能有效分离测定虾肉中 9 种 ATP 关联产物。4±1℃贮藏期间,斑节对虾、罗氏沼虾虾肉中 ATP 关联产物

的变化基本相似,ATP 和 ADP 贮藏 1d 后就迅速下降,AMP、IMP、HxR 先上升后下降,Hx、AdR、Xt 含量基本呈线性上升,两种虾中均未检测到 Ad,贮藏期间两种虾肉中 ATP 关联产物总量基本不变,本研究初步确定斑节对虾(海水虾)、罗氏沼虾(淡水虾)死后 ATP 都同时存在 ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx→Xt (主要途径,占 99%以上)和 ATP→ADP→AMP→AdR→HxR→Hx→Xt (次要途径,占 1%以下)两条降解途径,两种虾降解途径基本相同,其中斑节对虾以蓄积 AMP、IMP 为主,罗氏沼虾以蓄积 IMP 为主。

### 参考文献

- [1] Sujay P, Md. S R, Abu S M S, et al. Effect of Sodium Tri Polyphosphate (STPP) and Foreign Materials on the Quality of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) under Ice Storage Condition [J]. Food and Nutrition Sciences, 2012, 3(1): 34-39
- [2] Zhu S h, Zhong Y Z, Li G F, et al. Postmortem changes in physicochemical properties of songpu mirror carp (*Cyprinus carpio*) during iced storage [J]. Food Bioscience, 2015, 9(1): 75-79
- [3] Li T T, Li J R, Hu W Z. Changes in microbiological, physicochemical and muscle proteins of post mortem large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Food Control, 2013, 34(2): 514-520
- [4] 沈月新.水产食品学[M].北京:中国农业出版社,2000  
SHEN Yue-xin. Aquatic Food Science [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000
- [5] Arai K I, Saito T. Changes in adenine nucleotides in the muscle of some marine invertebrates [J]. Nature, 1961, 480(192): 451-452
- [6] Yoneda C, Kasamatsu C, Hatae K. Changes in taste and textural properties of the foot of the Japanese cockle (*Fulvia mutica*) by cooking and during storage [J]. Fisheries Science, 2002, 68: 1138-1144
- [7] Fujisawa K, Yoshino M. Distribution of AMP deaminase and adenosine deaminase in muscle of mammals, fish, molluscs and crustaceans [J]. Journal of Food Sciences and Nutrition of Japan, 1985, 38: 322-326
- [8] Shirai T, Kikuchi Y. Extractive components of kuruma prawns *Penaeus japonicas* [J]. Fisheries Science, 2002, 68(2): 1386-1389
- [9] 戚晓玉,李燕,周培根.日本沼虾冰藏期间 ATP 降解产物变化及鲜度评价[J].水产学报,2001,25(5):482-484

- QI Xiao-yu, LI Yan, ZHOU Pei-gen. Changes in content of ATP related compounds in the muscle of *Macrobrachium nipponense* during ice storage and evaluation of the freshness [J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(5): 482-484
- [10] Sonia P, Antonio V, Izaskun I. Simultaneous determination of adenosine and related purines in tissues and hemolymph of mussel by HPLC [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2013, 36(4): 470-485
- [11] Shi W M, Gao W F, Ronald R, et al. Estimation of PMI depends on the changes in ATP and its degradation products [J]. Legal Medicine, 2013, 15(5): 235-238
- [12] Matsumoto M, Yamanaka H. Post-mortem biochemical changes in the muscle of kuruma prawn during storage and evaluation of the Freshness [J]. Nippon Suisan GakkaiShi, 1990, 56(7): 1145-1149
- [13] Gram L, Huss H H. Microbiological spoilage offish and fish products [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(1): 121-137
- [14] Watabe S, Ushio H, Iwamoto M, et al. Temperature dependency of rigor mortis of fish muscle: myofibrillar  $Mg^{2+}$ -ATPase activity and  $Ca^{2+}$  uptake by sarcoplasmic reticulum [J]. Journal of Food Science, 1989, 54(5): 1107-1115