

非抑制离子色谱法测定水产品中 氧化三甲胺及其分解产物的方法

孙 永 周德庆* 柳淑芳 王联珠 宁劲松

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 建立了一种能够同时测定水产品中氧化三甲胺及其分解产物二甲胺和三甲胺的非抑制性离子色谱方法。样品使用 10% 三氯乙酸溶液浸提, 浸提液通过离心, 稀释过滤后直接进样; 方法使用 4mmol/L 硝酸+3% 乙腈作为淋洗液, 色谱分离柱为 Metrosep C4 150(150mm×4mm); 二甲胺、氧化三甲胺和三甲胺的保留时间分别为 6.22、8.21、9.09min, 检出限分别为 0.025、0.050、0.050mg/kg; 该方法具有较好的线性相关性($r>0.999$), RSD 为 1.41%~3.83% ($n=5$), 加标回收率为 91.5%~100.3%。通过比较, 含有内源性甲醛的水产品样品中检出二甲胺, 而不含有内源性甲醛的样品没有检测到二甲胺。

关键词 离子色谱 氧化三甲胺 二甲胺 三甲胺

中图分类号 S912 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2012)06-0118-05

Determination of trimethylamine-N-oxide and its decomposition in fishery products by non-suppressed ion chromatography

SUN Yong ZHOU De-qing* LIU Shu-fang

WANG Lian-zhu NING Jin-song

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT An ion chromatography method with non-suppressed conductivity detection was developed for the simultaneous determination of trimethylamine-N-oxide (TMAO) and its decomposition products (trimethylamine, TMA, and dimethylamine, DMA) in fishery products. Fishery samples were treated with 10% trichloroacetic acid, afterwards the extracted solution was centrifuged and diluted before injection to the ion chromatography device. The targeted compounds were eluted from a Metrosep C4 150 (150mm×4mm) column by 4mmol/L nitric acid with 3% acetonitrile (v/v). The retention time of DMA, TMAO and TMA were 6.22min, 8.21min and 9.09min, and the detection limits were 0.025mg/kg, 0.050mg/kg and 0.050mg/kg, respectively. The coefficients of linear equations were all above 0.999. The RSD were between 1.41% and 3.83% ($n=5$), and the recoveries were between 91.5%~100.3%. DMA

国家自然科学基金项目(30871949)资助

* 通讯作者。E-mail:zhoudq@ysfri.ac.cn, Tel:(0532)85819337

收稿日期:2012-03-26;接受日期:2012-07-03

作者简介:孙 永(1982-),男,硕士,主要从事水产品质量与安全利用研究。E-mail:oohyeah@yeah.net, Tel:13589200852

was found in the samples which contain endogenous formaldehyde, while sample without endogenous formaldehyde was DMA free.

KEY WORDS Ion chromatography Trimethylamine-N-oxide Dimethylamine
Trimethylamine

氧化三甲胺(Trimethylamine-N-oxide, TMAO)是一种广泛存在于大多数海水鱼类中的含氮有机化合物,其作用是在高渗透压环境中保持渗透压平衡并维持其机体功能正常运行(Yancey *et al.* 1982),在一些海洋动物如鲑鱼、鲈鱼等中,含量很高。TMAO 及其分解产物的含量与水产品质量密切相关。有研究表明,二甲胺(Dimethylamine, DMA),三甲胺(Trimethylamine, TMA)均是 TMAO 的分解产物(Hebard *et al.* 1982)。TMAO 在微生物作用下被还原成 TMA,产生海水鱼类特有的鱼腥味,因此 TMA 的含量是指示水产品新鲜程度的重要参数(Barrett *et al.* 1985)。一些水产品种类(如鲑科鱼类)在低温贮藏过程中,微生物作用被抑制,其体内的 TMAO 会在自身酶的作用下分解为等量的 DMA 和甲醛(Formaldehyde, FA)(Amona *et al.* 1965),FA 对人体有害,可使水产品蛋白质变性、疏水性增加、品质下降(Carmen *et al.* 1995),可用 DMA 含量表征冷冻水产品的品质。鉴于不同水产品中甲醛可能为内源性 FA,也可能是人为添加 FA。因此,测定 DMA 的含量可为鉴定 FA 是内源产生还是人为添加提供重要参考。

传统测定 DMA、TMA 和 TMAO 的方法均为分光光度计比色法(Dyer *et al.* 1945)。测定过程中以甲苯或者苯等有毒有机溶剂做提取剂,方法灵敏度低、检出限较高,只能测定一种成分,而且操作繁琐,结果重现性差。由于 TMAO 等生物胺的离子特性,能够通过离子色谱法有效分离测定。本研究旨在建立一种快速分离测定水产品中 TMAO 及其分解产物的方法,为判定水产品品质和深入研究内源性甲醛产生机理提供新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 仪器

Metrohm 882 Compact IC plus 离子色谱仪,863 Compact 自动进样器:瑞士万通中国有限公司;Milli-Q Q8 纯水系统:默克密理博中国有限公司;Sartorius 精密天平:赛多利斯科学仪器北京有限公司;T18 Basic 高速匀浆机:IKA 公司。

1.2 试剂

TMAO·4H₂O:Fluka 公司;TMA·HCl,DMA·HCl:Sigma 公司;乙腈:CNW 公司;优级纯硝酸:北京化工厂;三氯乙酸(TCA):国药集团;实验所用去离子水均为 Milli-Q 纯水系统所处理的 18.2MΩ 纯水。

1.3 色谱条件

Metrosep C4 150 阳离子色谱柱,电导检测器(池常数:15.4cm;温度:40℃)(Metrohm 公司),淋洗液为 4mmol/L 硝酸+3%乙腈,流速 0.9ml/min,进样量为 20μl。外标法定量。

1.4 标准溶液制备

精密称取一定量的 TMAO·4H₂O、TMA·HCl 和 DMA·HCl,用去离子水溶解配制成上述各组浓度均为 100.00mg/L 的混合标准储备液,同时配制各组的单标标准储备液。标准储备液经稀释后得到不同浓度标准溶液。

1.5 样品前处理

水产品样品按照 1:4 比例加入 10% TCA(m/V)溶液,使用高速匀浆机匀浆至无肉眼可见固体颗粒为

止,所得匀浆液 37℃ 条件下水浴振荡浸提 15min 后,4℃ 条件下 5 000g 离心 10min,所得离心上清液用去离子水按比例稀释后经 0.22 μ m 水性滤膜过滤,上机前 4℃ 冰箱保存。

1.6 数据处理

使用 Metrohm 公司的 MagIC Net 2.0 软件对数据进行处理。

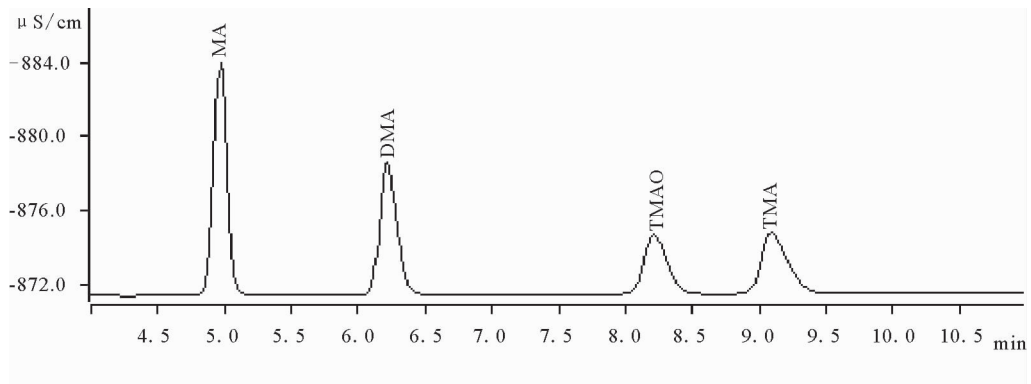
2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

不同的淋洗液流速对应着不同的压力和组分保留时间,随着流速的增加,色谱柱柱压明显上升,组分保留时间缩短。但流动相流速过大会引起基线不稳,造成方法灵敏度降低。实验选择淋洗液流速为 0.9ml/min,淋洗液中加入 3%乙腈能够更好地保持各组分色谱峰的对称峰型,降低拖尾现象。

2.2 色谱峰定性

在确定的色谱条件下进混合标准溶液,得到各峰的保留时间;然后分别取各组分的单标溶液,在同样条件下进样,得到对应各峰的保留时间,从而确定各分析物的对应色谱峰。所得标准图谱如图 1 所示。从图 1 可看出 DMA、TMAO、TMA 的保留时间分别是 6.22、8.21、9.09min。



4 种组分浓度均为 10 mg/L,MA 甲胺作为对照

Concentration of the four analytes are all 10 mg/L, with MA as a reference

图 1 标准色谱

Fig. 1 Chromatography of standards

2.3 方法的标准曲线和检出限

在选定的色谱条件下,进不同稀释梯度的混合标准溶液(分别为 1、10、20、50、100mg/L)。对 DMA、TMA 和 TMAO 进行线性和检出限测定。检出限按照 S/N=3 进行测算。在选定的浓度范围内,线性相关系数 $r > 0.999$ 。

表 1 DMA、TMA 和 TMAO 的线性关系和检出限

Table 1 Detection limits and linear range of DMA, TMA, and TMAO

分析物 Analyte	线性范围 Linear range(mg/L)	回归方程 Regression equation	相关系数 R Correlation coefficient	检出限(S/N=3) Detection limits(mg/kg)
DMA	1~100	$y = -6.51335E-4 + 5.31627E-3x$	0.9999	0.025
TMA	1~100	$y = -8.90144E-3 + 3.87844E-3x$	0.9999	0.050
TMAO	1~100	$y = 6.56266E-3 + 3.18973E-3x$	0.9999	0.050

2.4 方法精密度和回收率

按照实验方法,使用不含有 TMAO 的淡水鱼草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* 肌肉作为空白基质进行不同浓度加标回收率实验,平行测定 5 次,结果见表 2。

表 2 方法的回收率和精密度($n=5$)
Table 2 The recovery and precision of the method($n=5$)

分析物 Analyte	空白含量 Blank content(mg/kg)	加入标准量 Standard addition(mg/kg)	回收率 Recovery(%)	RSD (%)
DMA	*	2	94.2	3.21
		10	96.2	
		50	100.3	
TMA	*	2	91.5	3.83
		10	96.6	
		50	98.5	
TMAO	*	2	92.2	1.41
		10	91.5	
		50	94.1	

* 为未检出

* :Not detected

2.5 实际样品分析

按照实验方法,对一些水产品样品进行了测定,结果见图 2~图 4 所示。

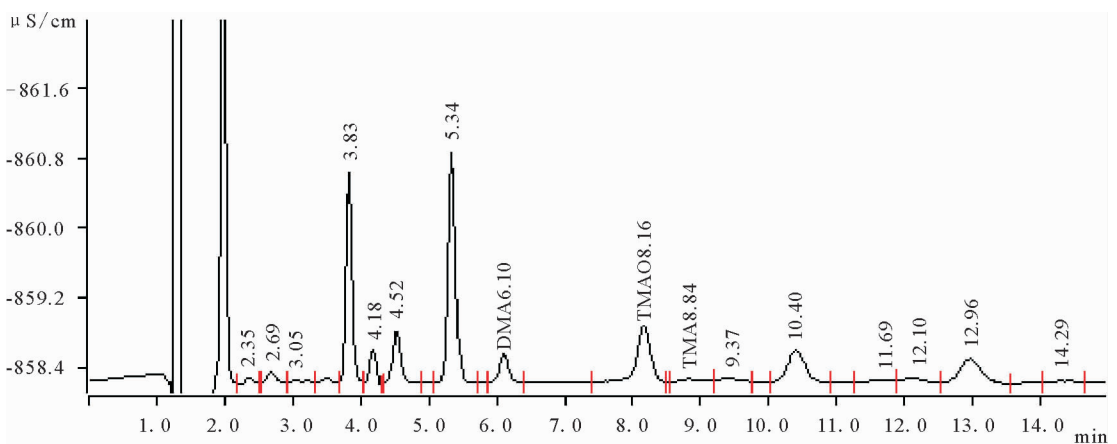


图 2 狭鳕样品谱

Fig. 2 Chromatogram of Pollock *Theragra chalcogramma* sample

从图 2~图 4 可见,3 种海水鱼中均含有大量的 TMAO 和少量的 TMA,而在含有内源性 FA 的狭鳕和龙头鱼中,存在含量较高的 DMA(分别为 113.5、225.9mg/kg)。在前期水产品中内源性甲醛本底含量调查中发现红鲷是不含有内源性甲醛的种类(段文佳等 2011),而实验中红鲷样品没有检出 DMA。

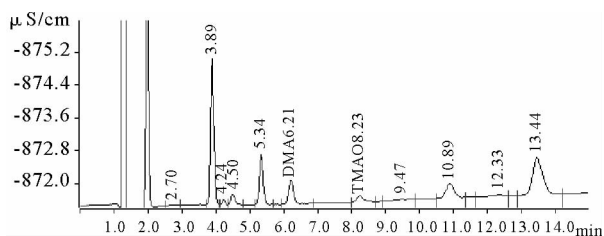


图3 龙头鱼样品谱

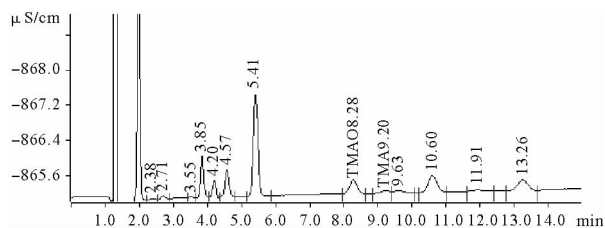
Fig. 3 Chromatogram of Bombay duck
Harpodon neheceus sample

图4 红鲷样品谱

Fig. 4 Chromatogram of Red snapper
Pagrosomus major sample

3 结论

本研究建立了一种能够同时测定水产品中 TMAO 及其分解产物的非抑制性离子色谱法。方法使用 4mmol/L 硝酸+3%乙腈作为淋洗液,流速为 0.9ml/min,被测组分在 10min 内完成分离测定,分离度良好,检出限低,样品处理简单,方法的加标回收率和精密度较好,具有较高的实际应用价值。该方法比传统方法更易于操作,避免了有毒有机溶剂的使用,测定结果更准确,为判定水产品品质和深入探索内源性甲醛产生机理奠定了基础。

参 考 文 献

- 马敬军,周德庆,张双灵. 2004. 水产品中甲醛本底含量与产生机理的研究进展. 海洋水产研究, 25(4): 85~89
- 孙永,靳肖,周德庆. 2010. 龙头鱼中内源性甲醛产生的酶促机理初探. 渔业科学进展, 31(6): 36~42
- 宋丹阳,周德庆,杜永芳,柳淑芳. 2007. 氧化三甲胺酶研究进展. 食品科学, 28(1): 350~353
- 段文佳,周德庆,张瑞玲. 2011. 鲜活水产品中甲醛本底含量状况调查. 中国农学通报, 27(3): 383~390
- 靳肖,周德庆,孙永. 2011. 鲑鱼丝氧化三甲胺热分解模拟体系的研究. 食品工业科技, (3): 106~108
- Amona, K., and Yamada, K. 1965. Studies on biological formation of formaldehyde and dimethylamine in fish and shellfish-VII. Bull. Jan. Soc. Sci. Fish. 31: 1 030~1 037
- Barrett, E. L., and Kwan, H. S. 1985. Bacterial reduction of trimethylamine oxide. Ann. Rev. Microbiol. 39: 131~149
- Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tanaka, M. 2003. Partial purification and characterization of trimethylamine-N-oxide demethylase from lizardfish kidney. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 135(2): 359~371
- Dyer, W. J., and Mounsey, Y. A. 1945. Amines in fish muscle. II. Development of trimethylamine and other amines. Fish. Res. Board Can. 6: 359~367
- Hebard, E., Flick, J., Martrin, E. et al. 1982. Chemistry and biochemistry of marine food products. AVI Publishing Company Westport, Connecticut, 149~304
- Phillippy, B. Q., and Hultin, H. O. 1993. Distribution and some characteristics of trimethylamine N-Oxide (TMAO) demethylase activity of red hake muscle. J. Food Biochem. 17: 235~250
- Rehbein, H., and Schreiber, W. 1984. TMAOase activity in tissues of fish species from the Northeast Atlantic. Comp. Biochem. Physiol. 79B: 447~452
- Sotelo, C. G., Piñeiro, C., and Pérez-Martín, R. I. 1995. Denaturation of fish proteins during frozen storage; formaldehyde role on it. Z. Leb-ensm Unters Forsch, 200(1): 14~23
- Sun, Y., Zhou, D. Q., and Zhao, F. 2011. Enhancing effect of Fe²⁺ on the formaldehyde production from trimethylamine N-oxide decomposition catalyzed by the extract of *Harpodon nehereus* kidney. Journal of Ocean University of China, 10(1): 67~72
- Takeuchi, K., Hatanaka, A., Kimura, M. et al. 2003. Aspolin, a novel extremely aspartic acid-rich protein in fish muscle, promotes iron-mediated demethylation of trimethylamine N-oxide. J. Biol. Chem. 278(48): 47 416~47 422
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., and Somero, G. N. 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. Science, 217(4 566): 1 214~1 222