

Application News

No.L554AK

High Performance Liquid Chromatography

Nexera™ Dual Injection 시스템을 이용한 어육 신선도 및 부패정도의 빠른 동시 측정

Quick Estimation of the Freshness and the Level of Putrefaction in Fish Meat Using Nexera™ Dual Injection System

어육(Fish muscle)은 가축의 근육에 비해 구조가 거칠고 수분이 많아 쉽게 상합니다. 그 결과, 어육의 신선도에 대한 정확한 예측은 식품의 안정성을 유지하기 위해 매우 중요합니다.

동물의 근육에너지의 원천인 아데노신삼인산(ATP)의 분산이 동물성 고기 신선도의 지표로 많이 사용됩니다. 생선의 신선도를 수치적으로 예측할 때 ATP 분해와 관련된 고유 K값을 일본에서는 일반적으로 사용합니다.

반면 부패성 아민 중 하나인 히스타민은 식품 중독 상태를 통해 알러지를 유발하는 것으로 알려졌습니다. 히스타민(히스티딘의 대사체 중 하나)은 부패의 과정에서 붉은 생선살에 고도로 축적됩니다.

히스타민이 생성되면, 열에 강하고 조리과정에서 제거할 수 없어 식품 중독 예방이 불가능합니다. 이 문제를 해결하기 위해 Codex Alimentarius Commission(Codex, 코덱스 알리멘타리우스 위원회), 유럽국가, 그 밖의 다른 나라들은 허용 가능한 히스타민 농도 수준에 대한 공식적인 제한을 설정했습니다.

어플리케이션 뉴스 No.L536은 어육의 K값 결정과 시간이 지남에 따른 신선도의 변화에 대한 다중 데이터 보고서를 소개했습니다. 본 자료에서는 Nexera 이중주입시스템(dual injection system)을 이용하여 부패와 신선도의 지표인 K값을 동시에 측정하는 것을 소개합니다. 이 자료에 기술된 분석 조건 하에서, 어육에 포함된 감칠맛을 포함한 영양 화합물로 알려진 아미노산과 핵산도 동시에 분석할 수 있었습니다.

N. Iwata

■ 동시에 두 가지 다른 분석이 가능한 이중 주입 시스템(Dual injection system)

일반적으로 ATP 관련 화합물과 히스타민이 동시에 분석되지 않아 두 개의 독립적인 HPLC 분석이 필수적입니다. 우리의 새로운 시스템 설정(Nexera dual injection system)은 서로 다른 HPLC 조건을 필

요로 하는 두 가지 유형의 기능성 화합물을 쉽게 동시에 분석할 수 있어 상당한 이익을 제공합니다. 또한 획득한 각각의 분석 데이터는 하나의 데이터 파일로 저장됩니다. 이것은 동일한 샘플에 대한 통합 분석과 데이터 관리를 용이하게 합니다. 본 시스템의 설정에서는 단일 HPLC 설정 내에 2개의 독립 유로로 PDA 검출기와 형광 검출기를 설치하였습니다. PDA와 형광 검출기로 히스타민을 포함한 ATP 관련 화합물과 아미노산을 각각 검출하였습니다.

■ 대상 화합물

대상 화합물은 ATP 관련 화합물 6종, 히스타민, 아미노산 24종(단백질 화합물 20종, 어육 관련 화합물 4종) 등 31개 화합물입니다..

이러한 화합물은 Table 1 에서 확인 할 수 있습니다.

Table 1 ATP 관련 화합물 목록, 히스타민 및 24개의 아미노산

ATP-related compounds*1		10	Serine	21	Tyrosine
1	Hx	11	Glutamine	22	Valine
2	IMP	12	Glycine	23	Methionine
3	HxR	13	Histidine	24	Histamine
4	AMP	14	Threonine	25	Cystine
5	ADP	15	β-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

Dual injection system(ATP관련 성분, 히스타민, 아미노산 분석)



Fig. 1 분석별 각각의 시스템(좌측)과 이중주입 시스템;Dual injection system(우측)

■ 시료 준비 및 분석 조건

참치 샘플은 단백질 제거, 추출, pH 조절을 통해 준비 되었습니다.(Fig.s)

Table 2는 분석 조건입니다. ATP 관련 화합물은 gradient elution으로 인해 분석 안정성이 개선된 반면, isocratic elution은 일반 분석에 사용되었습니다. 히스타민을 포함한 아미노산은 o-phthalaldehyde와 9-fluorenylmethyl chloroformate로 자동 유도체화 되었습니다(Table3 & 4). 따라서 복잡한 수동 전처리(예;dansyl chloride 유도체화)가 필요하지 않으므로 유도체화를 포함한 분석 간격이 일정하게 유지될 수 있습니다.

이 자료에서는 TORAST™-H Glass Vial, 저 흡착 유리 바이알이 사용 되었습니다.(fig.3). 이 바이알은 1.5mL와 150uL 두 가지 크기로 구입 할 수 있습니다. 1.5mL 바이알은 유도체 시약과 유도체 전의 시료 용도로 사용되었습니다.

시료는 작은 바이알에서 좋은 반응 효율을 얻기 위하여, 유도체시약 과 150uL 바이알 내에서 반응시켰습니다. Fig4는 오토샘플러 내에서의 샘플 위치를 보여줍니다. Nexera 시스템용 SIL-40시리즈는 3개의 샘플 랙을 포함할 수 있으며, fig.4와 같이 특정 목적에 대해 독립 랙을 사용하여 샘플을 잘못 세팅하지 않도록 방지할 수 있습니다.

Table 3 overview of automatic pre-column derivatization

- 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



Fig.3 TORAST-H Glass Vial

Table 4 Preparation of derivatization reagent

- MPA 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.

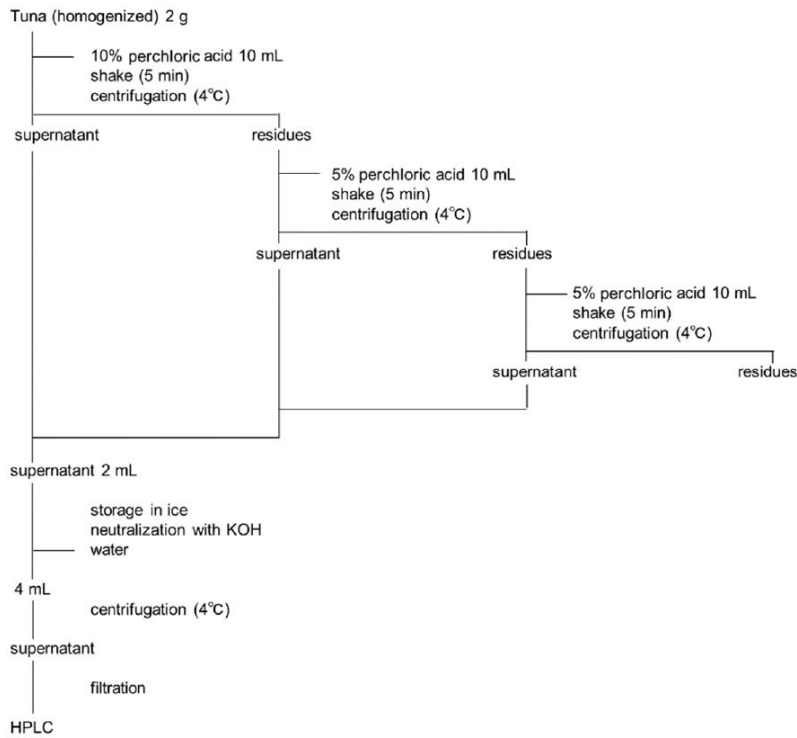


Fig. 2 시료 준비 프로토콜

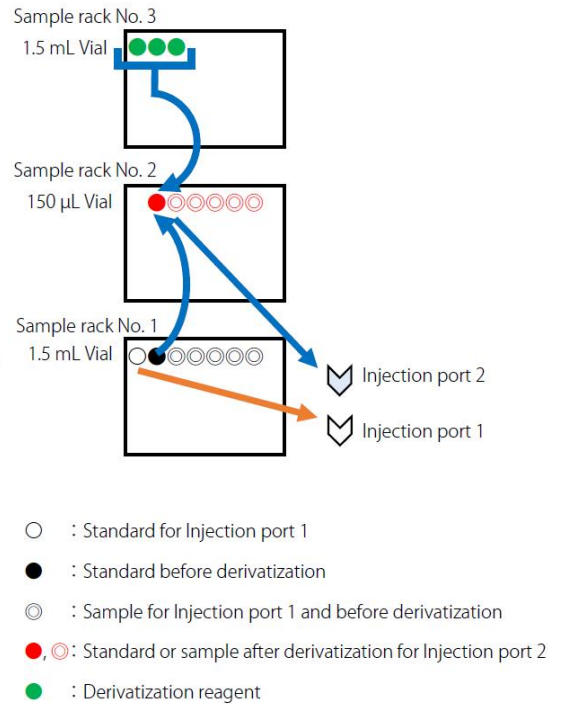


Fig. 4 오토샘플러 내부의 시료 세팅

Table 2 분석 조건

System	: Nexera dual injection system	
Column	<ATP-related compounds> : Shim-pack™ GIST 3 µm C18 AQ (100 mm L, 3.0 mm I.D., 3 µm)	<Histamine and amino acids> Shim-pack Velox™ C18 (100 mm L, 3.0 mm I.D., 2.7 µm)
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 µL	
Detection	: PDA 260 nm FL Ex: 350 nm, Em: 450 nm (Ch1) Ex: 266 nm, Em: 305 nm (Ch2)	

■ 시료 준비 및 분석 조건

과염소산(perchloric acid)으로 ATP 관련 화합물을 추출하기 위한 준비 프로토콜은 오랫동안 보고되어 왔습니다. 히스타민과 아미노산의 추출 효율도 같은 방법으로 확인되었습니다. 대조시험으로 히스타민과 히스티딘은 물과 과염소산으로 추출했습니다. 그 결과 과염소산은 안정적인 추출 효율을 제공하였습니다. (Table 5)

그리고 나서, 6개의 참치 샘플에 히스타민 표준물질을 첨가하여 Codex에서 정한 한계치인 10mg/100g의 농도를 만들었습니다. 30분 후에 샘플 준비를 수행하였습니다. Table 6은 6개 표본의 결과에서 얻은 평균 회수율을 나타냅니다.

Table 5 서로 다른 추출 용액을 사용한 히스타민과 히스티딘의 추출 효율

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

Table 6 히스타민의 회수율(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%)

■ 검정 곡선(Calibration Curve)

31개 화합물을 분석하기 위해 교정 곡선을 만들었습니다. 각 화합물에 대하여 $r^2=0.999$ 이상으로 양호한 직선성을 얻었습니다. 각 화합물에 대한 검정곡선의 농도 범위와 r^2 값은 Table 7과 같습니다.

■ 어육 중 ATP 관련 화합물, 히스타민 및 아미노산의 동시 측정 그리고 K값 및 히스타민 농도 결정

보관일과 온도가 다른 황다랑어는 K값과 히스타민 농도를 확인하기 위하여 분석되었습니다. 저장 온도는 4°C, 25°C이었습니다. 하루동안 4°C로 유지된 참치에서는 K값이 2.6% 소폭 상승했고 구매 직후에 비해 신선도가 떨어졌습니다. 히스타민은 K값이 25.1% 증가한 25°C에서 하루동안 저장한 후 생성되지 않았습니다.

6일동안 냉장 보관한 생날개다랑어는 K값이 70.4%로 부패화 되고 히스타민이 검출되었습니다. 히스타민 농도는 2.1mg/100g으로 Codex 한계치(Figure 5와 Table 8)보다 낮았습니다.

또한 히스타민은 어육 속에 풍부하게 들어 있는 히스티딘, 알라닌, 타우린, 안세린, 카르노신, 라이신 등 많은 아미노산과 분리 될 수 있었습니다. Table 9는 참치 샘플에 포함된 ATP 관련 화합물과 아미노산의 농도를 보여줍니다.

Table 8 참치 내 히스타민 농도와 K값의 변화 및 보관온도

	days	Temperature (°C)	K value*3 (%)	Histamine (mg/100 g)
Yellowfin Tuna	0	4	36.1	N.D.
		4	38.7	N.D.
	1	25	61.2	N.D.
Albacore Tuna	6	4	70.4	2.1

*3 Definition formula for K value

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

Table 7 교정곡선과 r2값의 농도 범위

Compound	Conc. range (µmol/L)	r ²	Compound	Conc. range (µmol/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 Glutamine	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 β-Alanine	0.25-50	0.99991	31 Proline	1-25	0.99953
16 Arginine	0.25-50	0.99994			

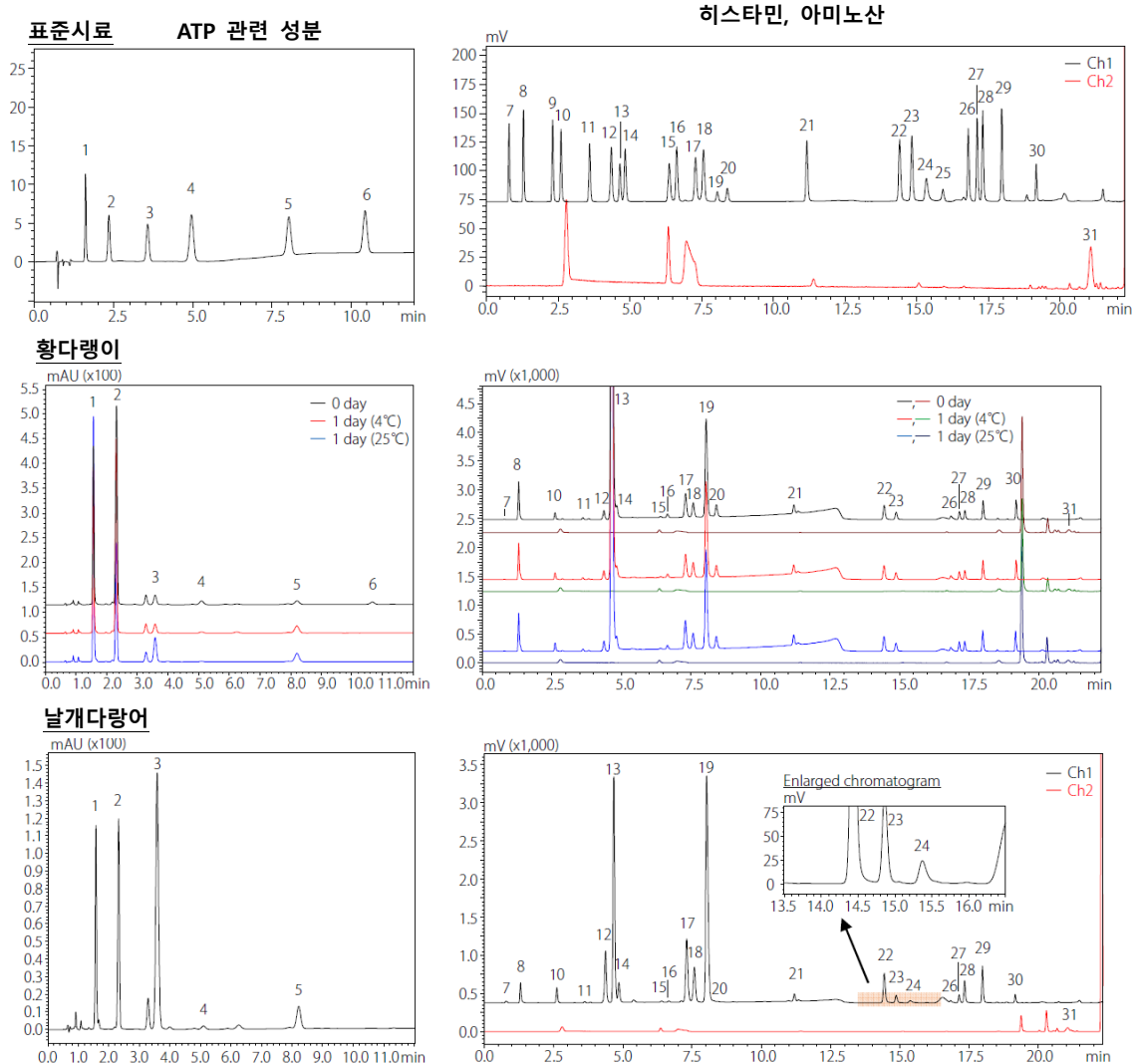


Fig. 5 표준용액과 참치 샘플 용액의 크로마토그램, 피크 i.d는 표 1의 리스트와 같음

Table 9 황다랭이 중, ATP 관련 성분과 아미노산의 농도

		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 괄호 안의 값이 정량범위를 벗어났음.

■ 요약

Nexera Dual injection system을 사용하여 K 값과 히스타민 농도의 동시 측정을 실시했습니다. ATP 관련 화합물과 히스타민은 동일한 검체 준비로 추출할 수 있었습니다.

결과로 보아, 보관일수 및 온도에 따라 K값이 변경되는 것으로 나타났습니다. K값이 큰 불량 시료에서도 히스타민이 검출되었습니다. 히스타민은 어육에 풍부하게 함유된 많은 아미노산으로부터 분리될 수 있었습니다.

Nexera Dual injection system은 ATP 관련 화합물과 히스타민/아미노산이 함유된 불량 시료에 대해 식품위생 검사 시 상당한 이익을 제공하였습니다.

[Reference]

1) Usui Kazushige, Watanabe Etsuo, "Comparison of changes in freshness in fresh and frozen black marlin using the K-value," Bulletin No. 5 of the Kanagawa Prefectural Fisheries Technology Center, 11-14 (2012)