

利用特征氨基酸组分分析与显微观察鉴别掺假鱼粉

徐洁, 钱爱萍, 陈体强, 饶秋华

(福建省农业科学院, 福建 福州 350003)

摘要: 通过显微镜观察, 发现两类掺假鱼粉中分别含有海泥颗粒或羽毛碎片等杂质。氨基酸分析结果表明, 掺假鱼粉的氨基酸总量和蛋氨酸、赖氨酸、苏氨酸、色氨酸等必需氨基酸含量大幅度降低, 造成氨基酸组分不平衡; 掺入海泥的鱼粉中芳香族氨基酸——酪氨酸含量不到合格鱼粉正常值的 1/4, 而掺入羽毛粉的鱼粉, 丝氨酸、胱氨酸、脯氨酸等含量反而比优质鱼粉的正常含量还要高。分析结果还表明, 优质或合格鱼粉中检出丰富的牛磺酸 ($637.4 \sim 746.8 \text{ mg} \cdot \text{hg}^{-1}$), 而掺假鱼粉中牛磺酸含量只有 $33.27 \sim 43.76 \text{ mg} \cdot \text{hg}^{-1}$, 不到正常值的 1/10, 可以作为特征性指标成分进行鱼粉是否掺假的检测分析。采用氨基酸组分分析技术结合显微观察可以准确鉴别掺假鱼粉。

关键词: 鱼粉; 鉴别; 氨基酸组分; 牛磺酸; 显微镜检

中图分类号: S 816.48

文献标识码: A

**Identification on adulterated fishmeals by analysis of characteristic amino acids
and observation by microscope**

XU Jie, QIAN Ai-ping, CHEN Ti-qiang, RAO Qiu-hua

(Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: Sea mud, fragment of feather were found in the two kinds of adulterated fishmeal by microscope. The analysis results showed that total amino acids (TAA) and essential amino acids (EAA) such as methionine (Met), lysine (Lys), threonine (Thr) and tryptophan (Trp) in the adulterated fishmeals decreased significantly and resulted in unbalanced composition of amino acids. The content of Tyrosine (Tyr, aromatic amino acid) in the adulterated fishmeal with sea mud was not more than a quarter of normal; the contents of serine (Ser), cystine (Cys) and proline (Pro) in the adulterated with feather were abnormally higher than high-quality fishmeals. The results also showed that the content of Taurine in high-quality or general grade fishmeal was $637.4 \sim 746.8 \text{ mg} \cdot \text{hg}^{-1}$, that in adulterated one was $33.27 \sim 43.76 \text{ mg} \cdot \text{hg}^{-1}$, it can be used as a characteristic index to analyse whether the fishmeal is adulteration or not. Combining the analysis of constitution of amino acids with observation by microscope could identify adulterated fishmeals exactly.

Key words: Fishmeal; Identification; Constituent of amino acids; Taurine; Test by microscope

鱼粉是饲料中最常用的动物性蛋白质来源, 其品质好坏决定了饲料质量的优劣。近年来, 鱼粉掺假现象日趋严重, 各地抽(送)检样品中均不同程度上掺有各种非鱼粉物质^[1]; 而且鱼粉掺假不仅花样繁多, 手段也日趋隐蔽: 掺假鱼粉与合格鱼粉的外观形态相近, 肉眼不易发觉^[1,2]。一些文献报道的用纯/粗蛋白比值法, 显微镜检测观察, 以及漂浮、碱溶解、沉淀、显色等物理或化学方法来判断鱼粉

品质优劣^[3~6], 只能作为快速鉴别的初步方法, 还不能进行全面、客观的检测分析。

粗蛋白质或氨基酸指标有时不能准确反映出鱼粉的真实质量情况, 如掺入羽毛粉或皮革粉(氨基酸含量高达 79.50% 和 72.32%) 的鱼粉, 其粗蛋白质含量相当高^[7,8]; 而且, 通常在鱼粉中含有的一般氨基酸组分和某些必需氨基酸组分在一些掺假鱼粉中也不同程度地存在, 加之不同种类鱼粉的氨基酸

收稿日期: 2003-09-15

作者简介: 徐洁(1944-), 女, 高级实验师, 从事饲料检测分析工作。

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局资助课题(2003IK010)。

含量不同。因此,全氨基酸测定还不能作为准确鉴别真假鱼粉的方法。通过实验建立掺假鱼粉品质的科学检测方法,就显得十分重要。如果能将显微镜检查与氨基酸分析这两种不同检测方法得到的结果加以对照,可更准确有效地判定鱼粉的蛋白质质量。我们在研究中也发现,掺假鱼粉的某些氨基酸组分变异较大,可以用特征性指标成分——牛磺酸来构建鱼粉质量检测 and 控制的指纹图谱。本文报道采用氨基酸组分分析技术结合显微镜检测观察来评判鱼粉是否掺假及掺假内容。

1 材料与方 法

1.1 供试样品

新鲜一级、二级鱼粉(合格鱼粉,样品编号 030224、030212);掺假鱼粉(样品编号 030170、030195、030174、030225)。

1.2 样品显微观察

用四分法将送检鱼粉缩减后,选取有代表性的样品各少许,置载玻片中央并摊薄;先在低倍镜下观察,直到目标视野中出现合适的标本物像(鱼粉纤维和掺入杂质),并将它移到视野中央,再用高倍细调节旋钮使物像清晰,仔细观察对照并摄像。采用带 Nikon Coolpix 995 数码摄像机(4 倍变焦)的双目体视显微镜(25×0.7~4.5 倍变焦)。

1.3 氨基酸组分分析

1.3.1 氨基酸酸水解前处理 称取样品 80 mg±10 mg,准确至 0.1 mg,置水解管内,加入 6 mol·L⁻¹盐酸 10 ml,冷冻、抽真空封口,于 110℃隔氧水解 24 h 后取出,放冷至室温;水解液过滤、定容,吸取滤液 1 ml,真空干燥后用 1~2 ml 去离子水溶解,反复(赶酸)2~3 次。测定时,用 0.02 mol·L⁻¹柠檬酸缓冲液(pH 2.2)稀释上机。

1.3.2 色氨酸碱水解前处理 称取样品 150 mg±10 mg,准确至 0.1 mg,置聚四氟乙烯管内;加 4 mol·L⁻¹ LiOH 2 ml,使样品均匀湿润;然后把水解管套入相应的玻管中,冷冻、抽气减压至 7 Pa 后封口。置 110℃恒温水解 20 h 后取出,冷却、开口、稀释;用 0.02 mol·L⁻¹盐酸中和,再用 pH 4.3 缓冲液定容至 25 ml,上机分析。

1.3.3 游离牛磺酸的前处理 采用热水提取—磺基水杨酸沉淀法进行样品的前处理:取样品适量用匀浆机粉碎,加入 5%~10%磺基水杨酸置沸水浴中回流提取 4~5 次,收集提取液、过滤,收集液于

容量瓶内加 5%~8%磺基水杨酸至刻度定容,冷冻过夜后高速离心(12 000 r·min⁻¹, 10 min),取上清液上机分析。

1.3.4 分析仪器及条件 采用 HITCHI 835-50 型氨基酸自动分析仪,对供试样品进行高效液相色谱(HPLC)分析。工作条件:柱温 53℃,缓冲液压力 0.025 kg·cm⁻²,流量 0.225 ml·min⁻¹,进样量 50 μl,层析柱:2.6 mm×150 mm,2619[#]树脂;除氨柱:4.0 mm×50 mm,2650[#]树脂;流量:0.225 ml·min⁻¹,衰减幅度 ATT=7。采用标准蛋白水解物分析程序和自设牛磺酸分析短程序。所用化学试剂均为分析纯。

2 结果与分析

2.1 感观与显微镜检可初步鉴别鱼粉掺假

真假鱼粉外观颜色均为黄棕色或黄褐色,极易混淆。但合格鱼粉(样品号 030224、030212)呈肉末状,手感细腻;在显微镜下观察,色泽明亮、均匀,可见大量细长的条状鱼肌纤维(图 1-1, 1-2)。而掺假鱼粉多呈颗粒状,手感比较粗糙、磨手;在显微镜下,掺假鱼粉色泽发暗、不均,有透明的明显异物;样品号 030170 和 030195 中有大量海泥颗粒(图 1-3, 1-4);样品号 030174、030225 中观察到少量羽毛碎片(未完全水解羽片)残存,并有可反光的玻璃样碎块(图 1-5, 1-6)。

2.2 掺假鱼粉的氨基酸总量及必需氨基酸所占比例下降

分析结果(表 1)可知,合格鱼粉(样品号 030224)的氨基酸总量为 63.83 g·hg⁻¹(一级)、53.86 g·hg⁻¹(二级)。已知国产优质鱼粉 18 种氨基酸含量在 60 g·hg⁻¹以上,全氨基酸与必需氨基酸的比例为 1:0.468,检测样品与之相符或相近。

与优质鱼粉相比,掺羽毛粉的鱼粉(样品号 030174、030225)氨基酸总量下降 24.3%~31.7%,其必需氨基酸所占比例只有 43.3%~43.6%,而优质或合格鱼粉的必需氨基酸比例可达 45.6%~46.8%。

与优质鱼粉相比,掺入海泥的鱼粉(样品号 030170、030195)氨基酸总量下降 36.6%~46.7%,必需氨基酸比例在 43%以下,其它各种氨基酸的相对含量均有所减少。

2.3 掺假鱼粉的氨基酸组分差异较大

掺入海泥的鱼粉(样品号 030170、030195)氨

氨基酸组分不平衡, 出现异常; 其苏氨酸、胱氨酸含量只有正常鱼粉的 38.9%~69.7%, 且酪氨酸含量很低 ($0.31\sim 0.62\text{ g}\cdot\text{hg}^{-1}$), 不到正常鱼粉的 1/4 (表 1)。

掺入羽毛粉的鱼粉 (样品号 030174、030225), 氨基酸组分也失调, 丝氨酸、胱氨酸、脯氨酸 3 种非必需氨基酸含量反而比优质、合格鱼粉的正常含量还要高, 其中丝氨酸组分含量明显高于苏氨酸 (已知优质鱼粉丝氨酸含量低于或接近苏氨酸的含量); 而蛋氨酸、赖氨酸等必需氨基酸含量大幅度降低。究其原因, 羽毛主要由角质蛋白构成, 而角质蛋白氨

基酸组分中的丝氨酸含量较鱼肉蛋白的高数倍。据报道, 掺假鱼粉随水解羽毛料添加量的增加, 胱氨酸和丝氨酸含量明显提高^[9]。

2.4 鱼粉中牛磺酸含量

分析结果表明, 优质或合格鱼粉 (一、二级) 中检出丰富的牛磺酸, 含量为 $637.4\sim 746.8\text{ mg}\cdot\text{hg}^{-1}$, 而掺假鱼粉中牛磺酸含量只有 $33.27\sim 43.76\text{ mg}\cdot\text{hg}^{-1}$ (表 1), 不到正常值的 1/10。掺假鱼粉中的牛磺酸含量大幅度下降。研究结果与严罗美的相似^[10]。

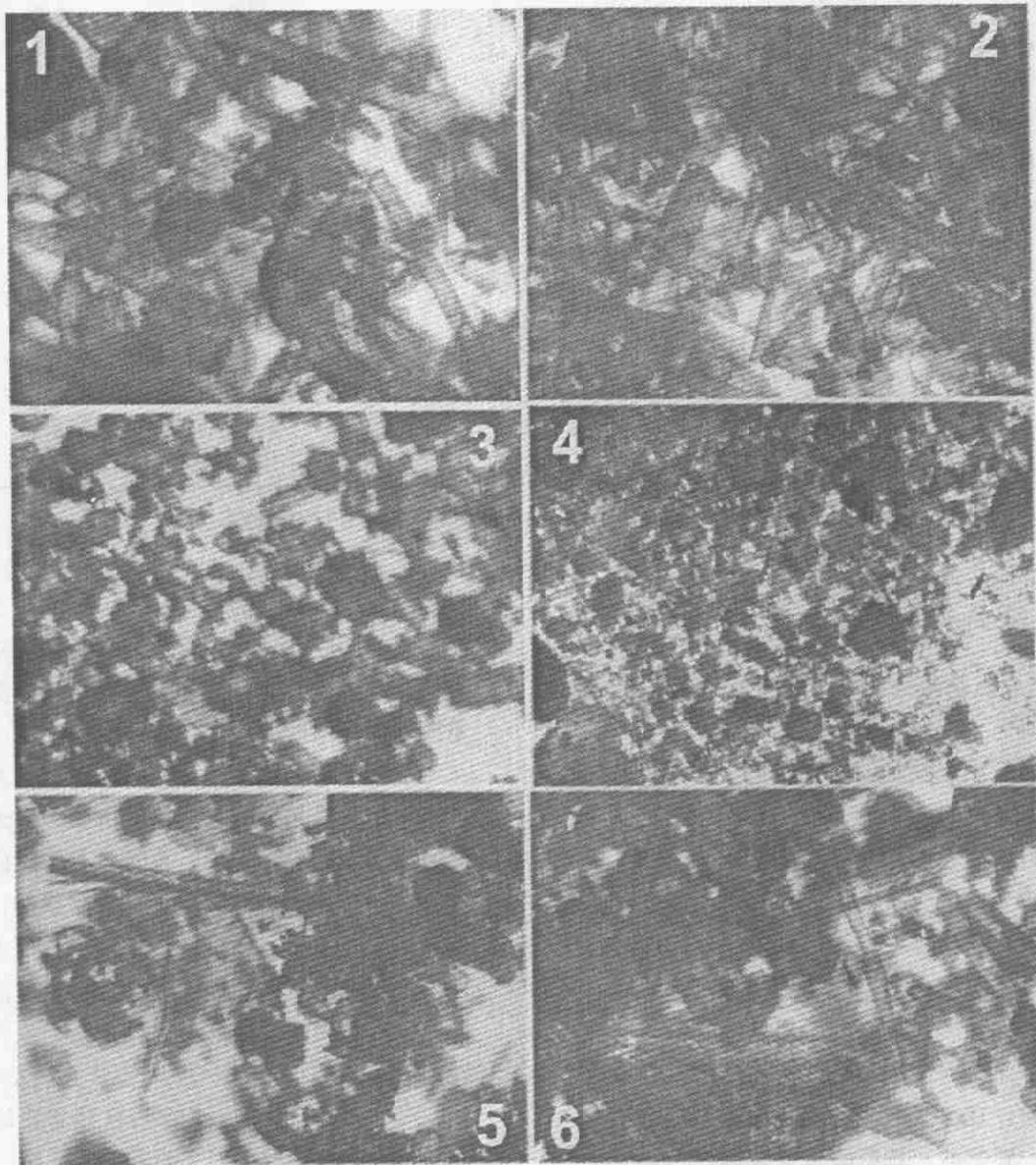


图 1 新鲜鱼粉与掺假鱼粉的显微形态比较

Fig. 1 Comparison of micro-morphology between normal and adulterated fishmeals

表 1 真假鱼粉氨基酸分析结果比较

Table 1 Analysis result of amino acids in the normal and adulterated fishmeals (单位: $\text{g} \cdot \text{hg}^{-1}$)

氨基酸	合格鱼粉		掺海泥鱼粉		掺羽毛粉鱼粉		国产 优质鱼粉
	030224(一级)	030212(二级)	030170	030195	030174	030225	
天门氨酸	6.52	5.20	3.31	4.22	3.90	3.35	6.3
苏氨酸	3.03	2.74	1.55	1.85	2.41	2.10	2.6
丝氨酸	2.48	2.08	1.45	1.67	4.22	4.37	1.6
谷氨酸	10.40	8.22	5.43	7.00	6.53	6.46	9.4
脯氨酸	1.38	1.26	1.09	0.80	2.18	2.09	2.0
甘氨酸	3.67	2.93	4.03	3.10	3.62	2.28	3.7
丙氨酸	4.06	3.57	2.79	2.87	2.57	2.27	4.5
胱氨酸	0.89	0.68	0.27	0.44	1.22	1.97	0.7
缬氨酸	3.65	2.83	1.67	2.19	3.58	3.08	4.0
蛋氨酸	1.92	1.55	0.99	1.60	1.01	0.65	2.0
异亮氨酸	3.19	2.64	1.43	2.00	2.58	2.20	3.3
亮氨酸	4.82	4.21	2.35	3.42	4.08	3.71	5.3
酪氨酸	2.43	1.92	0.62	0.31	1.51	1.30	2.3
苯丙氨酸	3.28	2.29	1.35	1.88	2.43	2.15	3.3
赖氨酸	5.21	5.54	2.25	3.21	1.76	1.22	5.3
色氨酸	0.67	0.57	0.21	0.25	0.24	0.27	0.7
组氨酸	1.96	1.89	0.76	0.48	0.58	0.48	1.9
精氨酸	4.27	3.74	2.44	2.69	3.32	3.16	4.2
必需氨基酸(E)	29.09	24.97	12.69	17.15	20.82	18.65	29.5
氨基酸总量(T)	63.83	53.86	33.99	39.98	47.74	43.11	63.1
E/T	0.456	0.464	0.373	0.429	0.436	0.433	0.468
牛磺酸*($\text{mg} \cdot \text{hg}^{-1}$)	746.8	637.4	35.73	43.76	34.24	33.27	—

注: ① * 为非蛋白氨基酸, 不计总量; ② — 为未测定; ③ 国产优质鱼粉的分析资料来源于文献[1]。

3 小结与讨论

3.1 结合氨基酸分析和显微镜检可以进行掺假鱼粉的鉴别

本研究结果发现, 两种掺假鱼粉的氨基酸组分变化各有其特点。掺入海泥的鱼粉, 其氨基酸组分变化明显, 尤其是酪氨酸大幅度下降。对此问题, 我们进行多年跟踪分析, 发现掺海泥鱼粉由于海泥中卤素元素含量比较高, 而酪氨酸、苯丙氨酸等芳香族氨基酸易产生卤代反应而失去氨基, 导致这两种氨基酸被大量破坏, 有的掺假样品中甚至检测不到酪氨酸。而掺入由角质蛋白构成的毛发、羽毛、骨粉的鱼粉, 在氨基酸总量上接近国产二级鱼粉, 而丝氨酸、脯氨酸、胱氨酸含量偏高。

鱼粉品质的鉴定主要按照形状、结构、颜色、质地、光泽度、透明度、颗粒度等特征进行^[4,11]。优质鱼粉在显微镜下可以观察到大量的肌纤维组织和少

量的鱼骨、鱼刺、鱼鳞、鱼眼等成分^[9]。本研究通过显微镜检测观察, 可以观察到掺假鱼粉中的杂质。

3.2 以牛磺酸 HPLC 分析建立鱼粉品质检测和质控的指纹图谱

鱼粉中的特征氨基酸——牛磺酸含量分析, 可作为鉴定鱼粉是否掺假的检测方法^[10]。通常用来掺假的羽毛粉、牛肉骨粉、皮革粉等常见的动物性掺假物, 经反复分析检测并不含有牛磺酸; 植物性掺假物如米渣粉(谷物糠粉、糖糟粉)更无牛磺酸成分。本研究结果再次表明, 掺假鱼粉中的牛磺酸含量很少, 牛磺酸含量分析是鉴定鱼粉是否掺假的准确方法, 界定指标依据充分, 测定方法实用可靠。此外, 研究还发现上机样液的 pH 值对出峰时间有一定的影响, 但偏差一般不会超过 1 min。

氨基酸自动分析仪工作过程中采用柱后衍生液相色谱层析分析法, 对上机样品要求高, 其前处理方法, 如热水/醇提取—磺基水杨酸沉淀法, 也同样

适用于(碳)柱前衍生高压液相色谱法测定牛磺酸^[12]。还可以考虑以近红外光谱(Near infrared Spectroscopy, NIRS)、气-质联用(GC-MS)等^[13]分析方法,建立鱼粉品质检测标准和质量控制的指纹图谱。

参考文献:

- [1] 李国胜. 我国鱼粉市场亟待整顿[J]. 饲料广角, 2002(7): 14.
- [2] 李军, 兰方. 对国产鱼粉检测结构的初步分析[J]. 巴州科技, 1997(3): 29-32.
- [3] 孟国良, 李凤玲. 鱼粉掺假物的化学快速鉴定法[J]. 中国饲料, 1997(1): 29-30.
- [4] 叶秀娟. 显微镜检测鱼粉掺假技术[J]. 中国饲料, 1997(7): 37.
- [5] 孟国良, 李凤玲. 鱼粉掺假物的显微镜快速鉴定法[J]. 郑州牧专学报, 1997, 17(3): 56-57.
- [6] 玉丽霞, 曹向英, 刘爱武. 掺假鱼粉的鉴别技术[J]. 国外畜牧学饲料分册, 1998(6): 40-41.
- [7] 刘继红. 氨基酸含量异常与鱼粉质量的关系[J]. 饲料博览, 2001(7): 29.
- [8] 张志英. 含非蛋白氮鱼粉纯蛋白含量的测定[J]. 饲料工业, 1998, 19(9): 33.
- [9] 谢宝恩. 鱼粉质量的显微镜镜检与氨基酸分析[J]. 饲料博览, 1999, 11(9): 20-20.
- [10] 严罗美. 应用氨基酸分析技术识别进口鱼粉掺假的方法研究[J]. 上海农业学报, 2000, 16(1): 72-78.
- [11] 崔淑文, 陈必芳. 饲料工业标准汇编(一)[M]. 北京: 中国标准出版社, 1991.
- [12] 徐洁, 钱爱萍, 陈体强, 等. 动植物产品中牛磺酸含量测定的前处理方法[J]. 江西农业大学学报, 2000, 22(3): 431-433.
- [13] 陈必芳. 饲料产品质量检测技术进展[J]. 中国饲料, 1997(5): 15-17.