

高效液相色谱-质谱联用检测水产品中氧化三甲胺

付雪媛¹, 刘丰海², 姜城子¹, 薛长湖¹, 王玉明^{1*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003; 2. 青岛市市立医院检验科, 青岛 266071)

摘要: **目的** 建立水产品中氧化三甲胺(trimethylamine-N-oxide, TMAO)的高效液相色谱法-质谱联用(HPLC-MS/MS)分析方法, 并对2种常见水产品的TMAO含量进行测定。**方法** 待测物通过色谱柱分离, 以10 mmol/L 甲酸铵为流动相A, 含5 mmol/L 甲酸铵、25%甲醇、0.1%甲酸溶液为流动相B进行梯度洗脱, 流速为0.8 mL/min, 采用多反应监测(MRM)检测不同撞击电压下母离子碎裂情况, 并选择合适电压下的离子对定量; 利用所建立方法测定阿根廷鱿鱼和凡纳滨对虾中TMAO含量。**结果** 当撞击电压均设定为20 eV, 确定定量离子对为 m/z 76→58.2时, 5~1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好; 4种水产品TMAO回收率在83.15%~90.23%之间。**结论** 所建HPLC-MS/MS测定TMAO的方法, 特异性好, 灵敏度高, 快速准确, 可用于水产品中TMAO含量的分析测定。

关键词: 氧化三甲胺; 高效液相色谱-质谱联用法; 水产品

Determination of trimethylamine-N-oxide in aquatic product using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

FU Xue-Yuan¹, LIU Feng-Hai², JIANG Cheng-Zi¹, XUE Chang-HU¹, WANG Yu-Ming^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Qingdao Municipal Hospital Inspection Department, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for measurement of trimethylamine-N-oxide (TMAO) in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), and detect the TMAO content in 2 kinds of familiar aquatic products. **Methods** The analytes were separated on a chromatographic column at a flow rate of 0.8 ml/min using 10 mmol/L ammonium as mobile phase A and the solution contained 5 mmol/L ammonium formate, 25% methanol, 0.1% formic as mobile phase B. Multiple-reaction monitoring (MRM) was used to determine the transition of precursor ion to product ion at a series collision energy and one ion pair at the appropriate collision energy was selected to quantification. The TMAO content in *Illex argentinuscastellanos* and *Litopenaeus vannamei* was determined using the developed method. **Results** The method had a good linear relationship ranged 5~1000 $\mu\text{g/L}$ when the collision energy was set to 20 eV and m/z 76→58.2 was selected as quantitative ion pair as well. The recovery rates of 4 kinds of aquatic products were 83.15%~90.23%. **Conclusion** The established HPLC-MS/MS method for TMAO showed good specificity, sensitivity, and simplicity, which was applicable for monitoring TMAO in aquatic products.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371757)、新世纪优秀人才支持计划(NCET-13-0534)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371757) & Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-13-0534)

*通讯作者: 王玉明, 博士, 教授, 主要研究方向为水产食品营养学。E-mail: wangyuming@ouc.edu.cn

*Corresponding author: WANG Yu-Ming, PhD, Professor, College of Food Science and engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China. E-mail: wangyuming@ouc.edu.cn

KEY WORDS: trimethylamine-N-oxide; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; aquatic product

1 引言

氧化三甲胺(trimethylamine-N-oxide, TMAO)是一种甲胺类化合物,广泛存在于自然界水产品中,且在海产品中的含量高于淡水水产品,在水产品中可起到调节体内渗透压、稳定蛋白质结构、诱食和促生长等作用^[1]。TMAO 具有特殊的鲜味,使得水产品滋味鲜美。研究表明, TMAO 主要通过两种途径分解,非酶降解,包括热分解和还原性物质作用下的降解;酶解,即在氧化三甲胺酶(TMAOase)作用下分解为二甲胺(dimethylamine, DMA)和甲醛^[2]。除此以外,在微生物作用下,其含有的氧化三甲胺还原酶(trimethylamine-N-oxide reductase, TMAO reductase)可将 TMAO 还原为三甲胺(TMA)^[3],二甲胺和三甲胺具有腐败气味,可用来判别水产品新鲜程度。

人体内的 TMAO 水平除受直接摄食含 TMAO 食物影响外,还可通过摄食胆碱在体内代谢产生。正常人摄取富含胆碱的食物后,大部分在肠道微生物作用下转化为 TMA, TMA 随循环系统进入肝脏,在肝黄素单氧化酶 3(FMO3)作用下催化生成 TMAO,以尿液形式排出体外^[4]。近年来,有研究表明人体内过高的 TMAO 会产生不利影响。直接摄食 TMAO 会促进 ApoE 缺失小鼠动脉粥样硬化,增大粥样硬化斑块面积^[5];富含胆碱、肉碱的饮食能显著引起小鼠动脉粥样硬化斑块面积增大,同时血液中 TMAO 含量升高^[6]。人群实验中,有心血管病史的人,当血液胆碱水平升高时,发生中风、心梗的风险升高 1.9 倍^[7]。还有报道称 TMAO 水平与糖耐受损、代谢综合征之间存在联系。高脂饮食诱导恒河猴代谢综合征会伴随血液 TMAO 水平升高^[8];以 C57BL/6J 小鼠为研究对象的实验表明,向高脂饲料中添加 TMAO 会加剧小鼠糖耐受损并引发炎症反应^[9]。除此以外,鱿鱼中的甲醛超标可能与高 TMAO 含量有关。因此,建立水产品 TMAO 的检测方法具有重要意义。

目前 TMAO 的检测方法主要有比色法、液相色谱法、气相色谱法、气相色谱-质谱联用方法、离子色谱法、毛细管电泳法等。Bennett 等^[10]采用液相-二级质谱联用来测定血液中 TMAO 和 TMA 水平,采

用同位素标记法追踪化合物,并用多反应监测模式进行扫描和定量,具有检测时间短、定量限低、检测精度高的优点。本实验在前人研究基础上建立了高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定水产品中 TMAO 的分析方法,采用 TCA 样品前处理方法,对质谱条件进行优化,并测定了 2 种常见水产品中 TMAO 含量。本方法的建立为水产品中 TMAO 含量检测提供了方法和依据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

阿根廷鱿鱼(*Illex argentinuscastellanos*)胴体,由青岛海通集团有限公司提供。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*),带鱼(*Trichiurus lepturus*)购自青岛市南山水产品批发市场。样品自购买后立即保存于冰箱冷冻室直到进行检测。

二水合氧化三甲胺(纯度>99%,北京中生瑞泰科技有限公司);甲醇(色谱纯,Merck KGaA 默克股份两合公司);甲酸铵、98%甲酸(分析纯,国药全国化学试剂有限公司);其余试剂均为国产分析纯。

2.2 仪器与设备

CP224C 型电子天平(奥豪斯上海有限公司);Agilent 6410 型质谱仪、Agilent 1260 型快速高分离液相色谱、Agilent ZORBAX SB-Phenyl (4.6 mm×250 mm)柱(美国 Agilent 公司);G1-20G-II 超速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);超纯水系统(美国 Millipure 公司);0.45 μm 水系针筒式微孔滤膜(德国 Membrana 公司)。

2.3 标准溶液配制

TMAO 贮备液:精确称取 0.370 g 二水合氧化三甲胺,用超纯水定容至 500 mL,即得 500 mg/L TMAO 标准溶液,置于 4 °C 备用。

TMAO 标准溶液配制:取上述贮藏液 1 mL 于 500 mL 容量瓶,用超纯水定容,过 0.45 μm 水膜,得 1 mg/L TMAO 标准溶液 A;取一定体积标准溶液 A 用超纯水稀释可得不同浓度的标准溶液。

2.4 液相色谱和质谱条件

2.4.1 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-Phenyl 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 进样体积 5 μL; 流动相 A 为 10 mmol/L 甲酸铵, 流动相 B 含 5 mmol/L 甲酸铵、25% 甲醇、0.1% 甲酸; 梯度洗脱: 0~0.5 min, 流动相 A 为 100%; 0.5~3.5 min, 由流动相 A 100% 线性变化到流动相 B 100%; 3.5~11.5 min, 流动相 B 100%; 11.5~14.5 min, 由流动相 B 100% 回到流动相 A 100%; 流速 0.8 mL/min(分流比 5:3)。梯度洗脱条件如表 1 所示:

表 1 液相色谱洗脱条件
Table 1 Liquid chromatogram elution gradient

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0.0	100	0
0.5	100	0
3.5	0	100
11.5	0	100
14.5	100	0

2.4.2 质谱条件

参考 Wang 等^[5]方法, 质谱基本参数设定如表 2 所示。撞击电压依次设定为 10、15、20 eV, 对撞击电压和定量离子对的质谱条件进行优化。

表 2 质谱条件
Table 2 Mass spectrometry conditions

参数	设定值
离子源	电喷雾电离源(ESI)
分流比	5:3
正/负离子模式	正离子模式
扫描模式	多反应监控(MRM)
干燥气流流速	10 L/min
雾化气压力	50 psi
干燥器温度	350 °C
毛细管电压	3500 V

2.5 样品前处理与检测

三氯乙酸(TCA)法。水产品经解冻、剪碎后, 称

取 3 份样品, 每份样品质量约 1 g, 置于 10 mL 离心管内。每管加入 2 mL 7.5% TCA, 冰浴匀浆 1 min。匀浆液在 4 °C 下 10000 r/min 离心 10 min。重复提取, 合并上清液, 经 0.45 μm 水性滤膜过滤后, 贮于 4 °C 待测。配制一系列浓度梯度的 TMAO 标准溶液, 分别为 4、20、50、100、200 μg/L, 标准品和样品的测定参数如 2.4 所述。以进样浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。将样品所测得的峰面积代入标准曲线计算 TMAO 浓度。

2.6 加标回收率

取阿根廷鱿鱼胴体、凡纳滨对虾虾肉、三疣梭子蟹蟹肉、带鱼肉分别加入相当于本身 TMAO 含量 1 倍、1.5 倍和 2 倍的 TMAO 标准品, 按 2.5 条件进行前处理并按照 2.4 条件进行 HPLC-MS/MS 检测。加标回收率为加标样品测得的 TMAO 含量减去未加标样品 TMAO 含量, 其差值(回收值)同加入标准物质的理论值之比。

3 结果与分析

3.1 不同撞击电压下 TMAO 的二级质谱图

不同撞击的电压下, 母离子碎裂情况不同。撞击电压低, 母离子打碎不彻底, 表现为母离子残留峰高, 而子离子峰值低。而撞击电压太高则质谱运行负荷大, 因此选择适合的撞击电压十分重要。图 1A, B, C 分别表示当撞击电压为 10, 15, 20 eV 时, TMAO 母离子碎裂表现情况。选择 20 eV 为分析定量的撞击电压, 用于后续研究。

3.2 定量离子对选择

多反应监测(multi-reaction monitoring, MRM)通过特定扫描母离子和撞击产生的碎片离子, 实现对目标化合物的准确定位。根据 20 eV 撞击电压下 TMAO 分裂的子离子情况, 选择峰值较高的子离子和对应母离子作为定量的离子对。因此选择 m/z 76→58.2 离子对对 TMAO 进行定量。

在 5~1000 μg/L 的浓度范围的 TMAO 混合标准品对离子对定量的线性进行测试。以 MRM 离子流峰面积(Y)为纵坐标、浓度(X)为横坐标, 做线性回归方程并比较 γ 值。结果见表 3, 可以看出本方法具有较宽的线性范围, 线性较好。

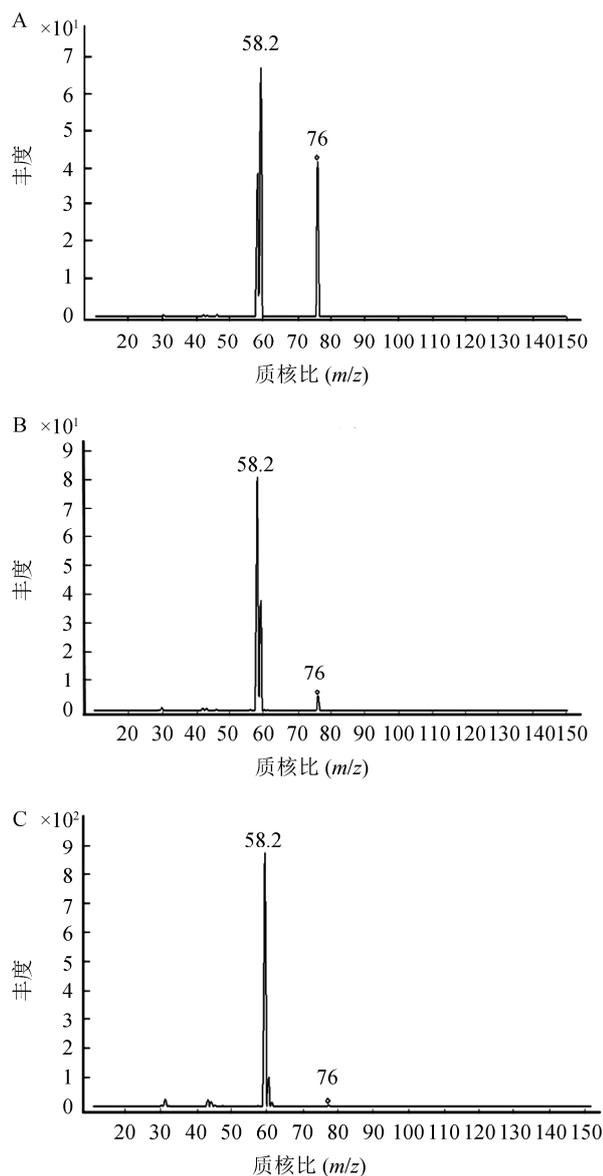


图1 不同撞击电压下 TMAO 的二级质谱图

Fig. 1 MS/MS chromatography of TMAO at different collision energy

A: 10 eV; B: 15 eV; C: 20 eV

A: 10 eV; B: 15 eV; C: 20 eV

表3 离子对定量线性

Table 3 Quantitative linearity of the ion pair

定量离子对	线性回归方程	r 值	线性范围($\mu\text{g/L}$)
m/z 76 \rightarrow 58.2	$Y=254.3X+1754$	0.999	5~1000

3.3 2 种水产品中 TMAO 的测定

阿根廷鱿鱼和凡纳滨对虾样品前处理如 2.5 所述,

标准溶液连同样品采用 HPLC-MS/MS 法检测, 质谱和色谱条件设定如 2.4 所述, 撞击电压设定为 20 eV, 定量离子对为 m/z 76 \rightarrow 58.2。

标准曲线线性回归方程为 $Y = 351.5X + 9092.8$, r 值为 0.999, 线性较好(图 2)。阿根廷鱿鱼和凡纳滨对虾中 TMAO 含量如表 5 所示, TMAO 质谱图如图 3 所示, 峰面积见表 4。

表4 不同浓度 TMAO 所对应峰面积

Table 4 Peak area of different concentrations of TMAO

组别	浓度 $\mu\text{g/L}$	峰面积(mm^2)
S0	4	9913
S1	20	15650
S2	50	27398
S3	100	45148
S4	200	78818

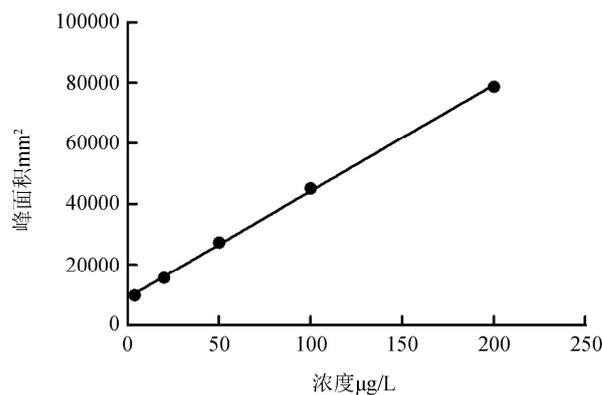


图2 TMAO 标准曲线

Fig. 2 Standard curve of TMAO

表5 2 种水产品中 TMAO 含量($n=3$)Table 5 TMAO contents in two aquatic products ($n=3$)

品种	TMAO 含量(mg/g)
阿根廷鱿鱼	22.88 \pm 2.22
凡纳滨对虾	9.53 \pm 1.63

3.4 加标回收率

按 2.6 所述方法, TCA 前处理法下鱿鱼、凡纳滨对虾、三疣梭子蟹、带鱼 1 倍、1.5 倍、2 倍加标回收率如表 6 所示, 本方法有较好的适用性和可行性。

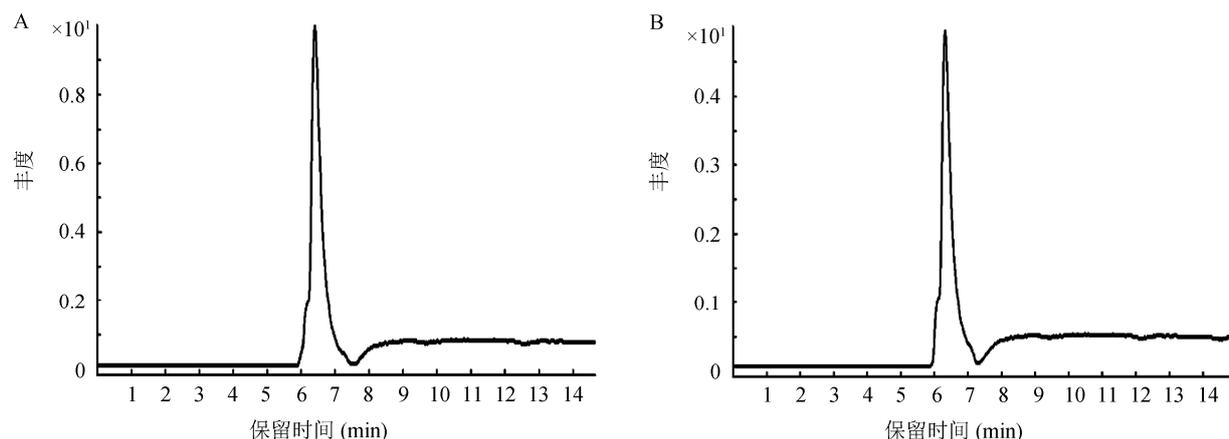


图 3 TMAO HPLC-MS/MS 色谱图

Fig 3 HPLC-MS/MS chromatogram of TMAO

A: 阿根廷鱿鱼; B: 凡纳滨对虾

A: *Illex argentinus castellanos*; B: *Litopenaeus vannamei*

表 6 4 种水产品加标回收率

Table 6 Results of recovery rate of four aquatic products

品种	加标倍数	加标量 (mg/g)	回收值(mg/g)	回收率(%)
阿根廷鱿鱼	1	23.06	20.46	88.73
	1.5	33.25	29.14	87.65
	2	45.80	40.72	88.91
凡纳滨对虾	1	9.82	8.86	90.23
	1.5	14.48	12.50	86.34
	2	19.35	16.09	83.15
三疣梭子蟹	1	3.30	2.95	89.39
	1.5	4.96	4.27	86.10
	2	6.45	5.82	90.23
带鱼	1	0.62	0.55	88.70
	1.5	0.95	0.84	88.42
	2	1.26	1.05	83.33

4 讨论与结论

摄食 TMAO 含量高的食物可能对人体产生不利影响, 而水产品尤其是海洋水产品中具有较高含量的 TMAO, 水产品中的甲醛含量也是备受关注的课题, 因而有必要探索出检测水产品中 TMAO 简单有效的方法。

目前, 水产品 TMAO 检测有多种不同方法。分光光度法是 TMAO 测定的经典方法^[11], TMAO 经

TiCl_3 还原为 TMA, 再用苦味酸比色法换算测定, 但该方法测得了能与苦味酸结合的有机胺总和, 结果偏高^[12]。气相色谱法灵敏度高, 分析速度快, 但低级脂肪胺类极性大, 易吸附在极性固定相上, 造成拖尾峰, 重复性差^[13]。孙永等^[14]利用非抑制型离子液相色谱法测定水产品中 TMAO 含量, 检测速度快、分离度好。Dacosta 等^[15]对三甲胺衍生, 衍生物再用毛细管气相色谱-质谱联用技术定量分析, 此法缺点是耗时长, 但稳定性好, 灵敏度高。

液相质谱联用应用到胺类物质的检测中,具有特异性强、灵敏度高、快速准确等特点。本文所建立的 HPLC-MS/MS 定量 TMAO 方法在 Wang 等^[7]所建方法的基础上进一步改进,探索在不同撞击电压下母离子碎裂情况,发现当撞击电压为 20 eV 时母离子打碎得较为彻底,因此选择 20 eV 为 TMAO 的撞击电压,且此时 m/z 58.2 的丰度值较高。因此多反应监测中,选择 m/z 76→58.2 离子对对 TMAO 进行定量,线性较好。

为了验证所建方法的可行性,测定了阿根廷鱿鱼和凡纳滨对虾中 TMAO 含量。2 种水产品均采用 TCA 前处理方法,研究证明该前处理法对 TMAO 有较高提取率^[16]。阿根廷鱿鱼属于头足类,凡纳滨对虾属于甲壳类,文献报道甲壳类和头足类动物 TMAO 含量占组织干物质重量的 7%^[1],本实验室前期利用非抑制型离子色谱法在 TCA 前处理条件下测定的阿根廷鱿鱼和凡纳滨对虾 TMAO 含量分别为 8.79 mg/g 和 1.71 mg/g^[16],相比之下本方法测得结果偏高,原因可能是受不同批次、产地和季节影响,也可能因养殖环境的差异,研究表明 TMAO 可调节水产动物保持渗透压平衡^[15],不同养殖环境水体因渗透压不同可能导致水产品体内 TMAO 含量的差异,而贮藏时间的长短也直接影响到水产品体内 TMAO 含量^[17]。本方法回收率在 83.15%~90.23%之间,特异性强,符合一般检测要求。

综上所述,本研究建立了水产品中 TMAO 的 HPLC-MS/MS 检测方法,样本前处理无需衍生,快速准确,该方法适用于水产品中 TMAO 的检测。

参考文献

- [1] 徐春兰,胡晓蕾,汪以真,等. 氧化三甲胺对水产动物作用的研究 [J]. 中国动物保健, 2004, 7: 39-41.
Xu CL, Hu XL, Wang YZ. The effect of trimethylamine N-oxide on aquatic animals [J]. China Anim Health, 2004, 7: 39-41.
- [2] 辛学倩. 秘鲁鱿鱼丝甲醛含量控制及工艺研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
Xin XQ. Study on the control of formaldehyde and improvement of process in dried-seasoned *Dosidicus gigas* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [3] 宋丹阳,周德庆,杜永芳,等. 氧化三甲胺酶研究进展 [J]. 食品科学, 2007, 28(01): 350-353.
Song DY, Zhou DQ, Du YF, et al. Research progress on trimethylamine N-oxide demethylase [J]. Food Sci, 2007, 28(01): 350-353.
- [4] Hiroshi Y, Masaki F, Masahiro T, et al. Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients [J]. Life Sci, 2004, 74(22): 2739-2747.
- [5] Wang ZN, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease [J]. Nature, 2011, 472: 57-65.
- [6] Koeth RA, Wang ZN, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis [J]. Nat med, 2013, 4: 1-12.
- [7] Wang ZN, Wilson Tang WH, Buffa JA, et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide [J]. Eur Heart J, 2014, 35(14): 904-910.
- [8] 赵月萍. 中国人中糖皮质激素受体基因多态性与代谢综合征关系的研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
Zhao YP. The study of association between glucocorticoid receptor gene polymorphism and metabolic syndrome in Chinese [D]. Chengdu: Sichuan University, 2006.
- [9] Gao X, Liu XF, Xu J, et al. Fish oil ameliorates trimethylamine N-oxide-exacerbated glucose intolerance in high-fat diet-fed mice [J]. Food Funct, 2015, 6(4): 1117-1125.
- [10] Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang ZN, et al. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation [J]. Cell Metab, 2013, 17: 49-60.
- [11] Gokoglu N, Topuz OK, Yerlikaya P. Effects of pomegranate sauce on quality of marinated anchovy during refrigerated storage [J]. LWT - Food Sci Technol, 2009, 42: 113-118.
- [12] 李丰. 水产品中氧化三甲胺、三甲胺、二甲胺检测方法及其鱿鱼丝中甲醛控制研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
Li F. Studies on the Analysis of trimethylamine-n-oxide, trimethylamin and dimethylamine and control of formaldehyde in shredded squid [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2010.
- [13] 陈锦文,崔燕芒,赵燕. 三甲胺二甲胺及氧化三甲胺含量测定方法的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2015, 2(30): 216-219.
Chen JW, Cui YM, Zhao Y. Research progress of content determination of trimethylamine, dimethylamine and trimethylamine-N-oxide [J]. Northwest Pharm J, 2015, 2(30): 216-219.
- [14] 孙永,周德庆,柳淑芳,等. 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 [J]. 渔业科学进展, 2012, 6(33): 118-122.
Sun Y, Zhou DQ, Liu SF, et al. Determination of trimethylamine-N-oxide and its decomposition in fishery

- products by non-suppressed ion chromatography [J]. *Prog Fish Sci*, 2012, 6(33): 118–122.
- [15] Da-Costa KA, Vrbanac JJ, Zeisel SH, *et al.* The measurement of dimethylamine, trimethylamine, and trimethylamine N-oxide using capillary gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 1990, 187(2): 234–239.
- [16] 姜城子, 崔洁, 周苗苗, 等. 青岛地区部分水产品中氧化三甲胺含量的测定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 1(5): 41–46.
Jiang CZ, Cui J, Zhou MM, *et al.* Determination of trimethylamine-N-oxide content in common aquatic products in Qingdao [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 1(5): 41–46.
- [17] 胡金鑫, 李军生, 闫柳娟, 等. 通过三甲胺/氧化三甲胺摩尔比值评价南美白对虾的新鲜程度 [J]. *现代食品科技*, 2013, 10(29): 2492–2497.
Hu JX, Li JS, Yan LJ, *et al.* Freshness of *litopenaeus vannamei*

based on mole ratio of TMA and TMAO [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2013, 10(29): 2492–2497.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



付雪媛, 硕士, 主要研究方向为水产食品营养学。

E-mail: fuxueyuanouc@sina.com



王玉明, 博士, 教授, 主要研究方向为水产食品营养学。

E-mail: wangyuming@ouc.edu.cn