

离子对反相高效液相色谱法同时检测 水产品中6种ATP关联化合物

邱伟强, 陈刚, 陈舜胜*, 谢晶

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要:建立了水产品中6种ATP关联化合物的离子对反相高效液相色谱(IP-RPLC)检测方法,确定了缓冲液的最佳pH、流速和浓度,并对方法的准确度、精确度和检测限进行了测定。采用10%的高氯酸分离提取样品,用KOH溶液中和后进行HPLC分析。采用Waters 2695色谱系统,Thermo ODS-2 Hypersil(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,柱温为25℃;以10%甲醇,90% 0.05 mol/L磷酸盐溶液为流动相,磷酸盐溶液含9 mmol/L四丁基氢氧化铵(TBA),并用1 mol/L的磷酸调pH至6.5,采用等度洗脱,流速为0.9 mL/min;检测波长为254 nm。结果表明:6种ATP关联化合物在13 min内完全分离;在2~400 μg/mL范围内线性关系良好,相关系数在0.999 4~1.000 0之间;方法最低检测限(信噪比S/N=3)在0.1~0.4 μg/mL之间;加标平均回收率为82.2%~110.0%,相对标准偏差为4.2%~9.5%。本方法可用于水产品中ATP、ADP、AMP、IMP、Hx和HxR等6种ATP关联化合物的同时测定和分析。

关键词:水产品;离子对反相高效液相色谱;ATP关联化合物

中图分类号: TS 254.7

文献标志码: A

ATP关联化合物(ATP related compounds)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,如肌苷酸(inosinic acid, IMP)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、腺苷酸(adenosine monophosphate, AMP)、次黄嘌呤核苷(inosine, HxR)和次黄嘌呤(hypoxanthine, Hx)等。它们是水产动物肌肉核苷酸的主要成分,与水产原料的风味和新鲜度紧密相关^[1]。在风味方面,如AMP有着压抑苦味的特性,能使食物产生理想的甜味和咸味,是水产食品中良好的风味增强剂。而与AMP所产生的鲜味相反,ATP降解的一种产物——次黄嘌呤会产生苦味^[2]。肌苷酸(IMP)是主要的呈味核苷酸,作为新型的食品添加剂,已逐渐广泛应用于食品调味中^[3]。IMP增加食品鲜味的能力比谷氨酸钠强40倍,它与味精合用具有协同作用,含2%~8%肌苷酸的

味精通常称为强力味精^[4]。在鲜度方面,一般认为鱼死后鱼肉内ATP依次降解为ADP、AMP、IMP、Hx和HxR,其中HxR、Hx量之和对ATP关联化合物总量的比值即为K值^[5-6]。K值的大小,能反映鱼体在僵硬至自溶阶段的不同鲜度,国外学者^[7-9]对冰藏期间竹筴鱼(*Trachurus japonicus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)等研究表明K值能作为评价鱼肉鲜度的一个重要化学指标,如今K值作为一个重要鲜度指标已经被广泛应用于鱼类品质评价^[10-11],因此,快速准确检测出鱼体中的ATP关联化合物对水产原料的风味和新鲜度有很重要的意义。

目前国内外测定ATP关联化合物含量的方法主要有离子交换液相色谱法^[12]、毛细管电泳法^[13]和反相液相色谱法^[14-16]等。高效毛细管电泳法对各种呈味核苷酸的分辨率较高,但仪器昂

收稿日期:2011-04-19

修回日期:2011-09-01

资助项目:上海市教育委员会重点学科建设项目(J50704);上海海洋大学青年科研基金(A250110011503)

通讯作者:陈舜胜, E-mail: sschen@shou.edu.cn

贵;离子交换色谱法对核苷酸等兼性离子化合物能很好地分离,但其需要对分离柱进行平衡(再生),且分析时间较长;反相高效液相色谱法具有快速、操作简便的优点,是目前生物、食品等研究领域主要使用的方法^[17-19],但以往的反相高效液相色谱法分离的核苷酸有的种类有限,有的分析时间过长^[20-23]。特别是水产品中6种ATP关联化合物分离测定,一直没有一种快速稳定可靠的高效液相色谱检测方法。本实验采用离子对反相液相色谱仪对水产品中6种ATP关联化合物进行快速分离测定,并对方法进行了验证。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和材料

Waters 2695 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 Empower 色谱管理软件;美国 Thermo ODS-2 HYPERSIL(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱;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)。

实验用的鲜活水产品均购置于上海市芦潮港菜市场,处理后于-20℃冰箱冻藏。

1.2 试剂

标准品 ATP,ADP,AMP,IMP,HxR 和 Hx 均购自 Sigma 公司;甲醇为 HPLC 级;实验用水为超纯水;磷酸二氢钾,磷酸二氢钾,高氯酸(PCA),氢氧化钾,四丁基氢氧化氨(TBA),磷酸,均为分析纯。

1.3 一般色谱条件

色谱柱:美国 Thermo ODS-2 HYPERSIL(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱;流动相:A 为甲醇溶液,B 为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾和磷酸氢二钾(1:1)溶液,含 9 mmol/L 四丁基氢氧化氨(TBA),用磷酸调 pH 至 6.5;等度洗脱;流速:0.9 mL/min;柱温:25℃;进样量:10 μL;检测波长:254 nm。

1.4 标准溶液的配制及标准曲线

用超纯水配制 6 种 ATP 关联化合物标准系列溶液 2,10,25,50,100,400 μg/mL,分别取 10 μL 进行液相色谱测定,根据保留时间,以所测色

谱的峰面积或峰高与其相应的核苷酸浓度作图,并绘制标准工作曲线。

1.5 样品制备

ATP 及其降解产物的提取主要参考 YOLOYAMA 等^[24],并略作修改,取解冻好的样品 5.0 g,加入预冷 10 mL 的 10% 的高氯酸(PCA)溶液打浆 2 min,用玻璃棒搅拌均匀,在 4℃下 5 000 r/min 离心 10 min,取上层清液过滤至密封瓶,得到的沉淀物用加入预冷的 5% PCA 溶液再进行浸提、离心等操作两次,合并上清液。然后用 KOH 溶液将其中和至 pH 6.5。中和时,先用 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 6.5)将其定容到 50 mL 容量瓶中,过滤除去高氯酸钾结晶,再通过孔径为 0.45 μm 滤膜过滤,用 HPLC 进样分析。剩余样品于-20℃保存,测定时,先将样品溶解,上机进样分析。

1.6 数据处理

$$X = \frac{C \cdot V}{1\ 000m}$$

式中, X 为样品中 6 种 ATP 关联化合物的含量(g/kg); C 为由工作曲线上查出的样品测定液中相当于 6 种 ATP 关联化合物的浓度(μg/mL); V 为样品提取液的体积(mL); m 为样品的质量(g)。

2 结果

2.1 提取方法

预备实验采用盐酸、甲醇、正丁醇、丙酮、三氯乙酸、高氯酸等溶剂作为提取溶剂进行试验,发现 10% 的高氯酸溶液提取效果较好,回收率达到 70% 以上,可以满足检测要求。

2.2 波长选择

实验对 6 种 ATP 关联化合物用流动相稀释后,进行了波长扫描,发现有 3 种物质在 248 nm 附近有最大吸收峰,另外 3 种物质在 259 nm 附近有最大吸收峰,而在 254 nm 处 6 种 ATP 关联化合物均有较大的吸收峰(图 1)。通过实验发现,在波长 254 nm 下 6 种 ATP 关联化合物的峰型对称,各个峰相互达到了完全分离,而且不受流动相干扰。在 HPLC 分析过程中,各个峰相互分离情况主要受不同缓冲溶液、TBA 浓度、甲醇浓度和 pH 的影响。

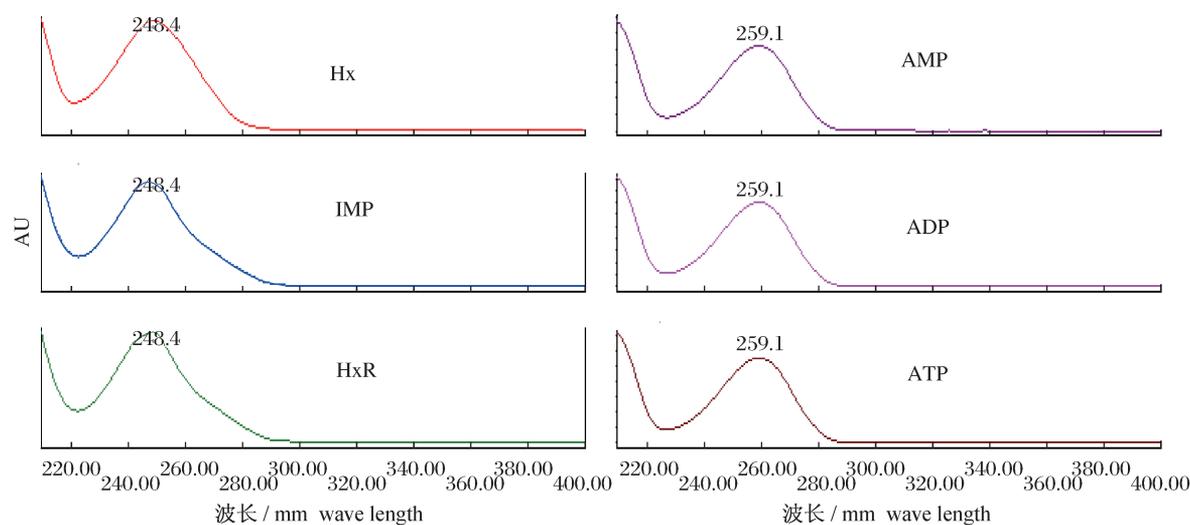


图1 6种ATP 关联化合物的扫光谱图

Fig. 1 Scanning spectrum of 6 ATP related compounds

2.3 不同缓冲溶液对6种ATP 关联化合物含量测定的影响

用反相色谱分离酸性或碱性组分要求流动相为酸性或碱性,或者加入缓冲液。本研究分别比较了0.05 mol/L KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 (1:1) 和0.05 mol/L 乙酸铵两种缓冲溶液对测定的影响,通过实验发现,乙酸铵缓冲液只可分离出部分物质,有几种物质未分离出来,且峰型不好(图2);选用0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液可将目标物完全分离。实验过程中,分别配制0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mol/L 的 KH_2PO_4 - K_2HPO_4 缓冲液,考察在不同磷酸盐浓度情况下的洗脱情况。流动相浓度在0.01~0.03 mol/L 时,出峰时间相对较长,峰形较差,有的峰还有拖尾现象;随着浓度的提高,在0.04~0.06 mol/L 时,6种标准物可以得到较好的分离,峰型很好,出峰时间稳定,保留时间变短(图3)。这可能由于随磷酸盐浓度的增加,较高浓度的流动相掩蔽C18反相色谱柱硅羟基的二次作用而减少了拖尾,由于较高的磷酸盐缓冲液浓度对色谱柱有较大的伤害,因此选用0.05 mol/L 的缓冲液浓度作为流动相浓度。

2.4 TBA 浓度对6种ATP 关联化合物含量测定的影响

现代离子对反相HPLC理论认为,TBA与被测物质形成离子对结合物,其作用是增加被测物

质与固定相的亲合力,结合TBA越多的物质,被洗脱物质出峰就越慢。低浓度的TBA与被测物结合后与固定相亲和作用小,易极早随流动相出柱,分离效果差,TBA过量形成的离子对结合物在固定相滞留时间长,使洗脱时间过长。本研究通过实验比较发现,在流动相中加入一系列浓度的TBA,当流动相中TBA浓度为6 mmol/L 时,6种物质分离不完全,相互有干扰(图4);当TBA浓度为12 mmol/L 时,有峰出现重叠,且洗脱时间延长,在20 min 内不能完全出峰(图5);当TBA浓度为9 mmol/L 时,6种物质达最佳分离(图3)。

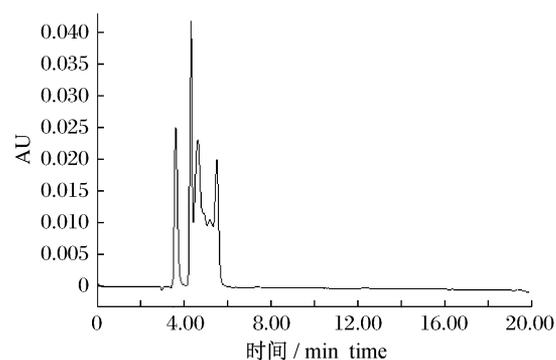


图2 0.05 mol/L 乙酸铵缓冲溶液色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of the sample using mobile phase containing 0.05 mol/L ammonium acetate buffer

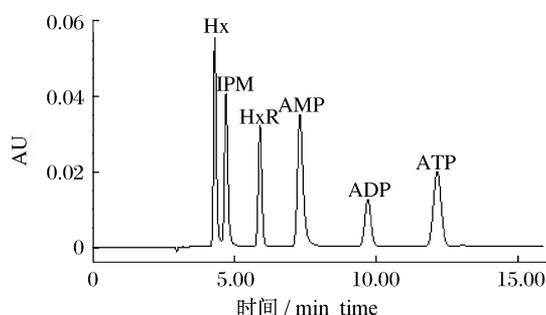


图3 9 mmol/L TBA 和 0.05 mol/L 磷酸盐溶液色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of the sample using mobile phase containing 9 mmol/L TBA and 0.05 mol/L sodium phosphate buffer

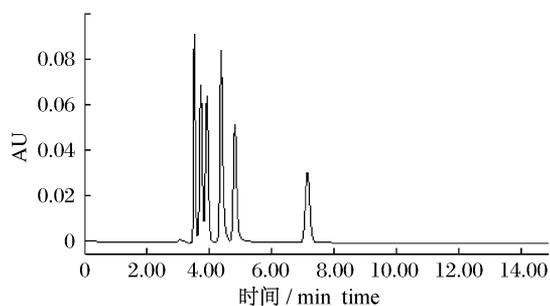


图4 6 mmol/L TBA 和 0.05 mol/L 磷酸盐溶液色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of the sample using mobile phase containing 6 mmol/L TBA and 0.05 mol/L sodium phosphate buffer

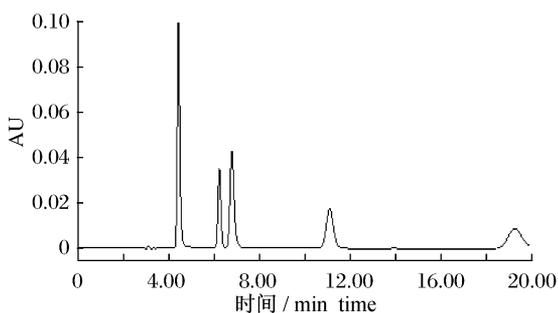


图5 12 mmol/L TBA 和 0.05 mol/L 磷酸盐溶液色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of the sample using mobile phase containing 12 mmol/L TBA and 0.05 mol/L sodium phosphate buffer

2.5 甲醇浓度的影响

腺苷酸在 254 nm 时保留时间过长,国外文献报道多用乙腈来缩短^[25],但其价格昂贵且毒性大,本实验用甲醇代之。结果表明,适当浓度的甲醇完全能取代乙腈得到理想的结果。试验比较了甲醇与 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液的比例分别为 5:95、10:90、15:85、20:80 下对 6 种 ATP 关联化合物测定的影响,结果发现,各种比例的甲醇和磷酸盐缓冲液对 6 种 ATP 关联产物的出峰响应影响不大,只是在出峰时间略有差异,考虑实验的效率及防止柱压过高,本实验选择甲醇与 0.05 mol/L 磷酸二氢钠的比例为 5:95,出峰时间较早,峰型也很好。

2.6 pH 的影响

为了考察 pH 对各物质洗脱速率的影响,实验中逐渐增加流动相(10% 甲醇, 9 mmol/L TBA)的 pH。结果显示,在一定范围内随着 pH 的升高,各物质的洗脱速度也逐渐加快。这是由于 pH 升高,TBA 的离子化程度降低,样品离子在流动相中与离子对作用降低,从而使得样品离子在非极性柱的保留值降低。在所选择的离子对浓度和甲醇浓度条件下,pH 6.5~6.8 范围内各物质都可以得到很好的分离。

2.7 方法性能指标

线性范围与检测限 将浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 6 种 ATP 关联化合物标准品,用超纯水稀释成 2, 10, 25, 50, 100, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的梯度溶液,按“一般色谱条件”中色谱条件检测,以峰面积 Y 与浓度 X 做标准曲线。经回归分析,6 种 ATP 关联化合物在 2~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内有良好的线性关系,其线性相关系数 (R^2) 均大于 0.999 3。根据信噪比,当色谱峰的峰高为噪音 3 倍时 ($S/N=3$),确定最低检测限;当色谱峰的峰高为噪音 10 倍时 ($S/N=10$),确定定量限(表 1)。

重复性实验 对同一标准样品中 6 种 ATP 关联化合物(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别进行了 6 次重复实验,得峰面积和保留时间(表 1)。由表 2 可知,进样 6 次所测得峰面积的 RSD 为 0.41%~0.61%,保留时间的 RSD 为 0.15%~0.46%,表明该方法重复性良好。

表1 线性相关系数、检测限和定量限

Tab. 1 Correlation coefficients, limit of detection and limit of quantitation

项目 item	回归方程 regression equations	线性相关系数 correlation coefficient	检测限/($\mu\text{g}/\text{mL}$) limit of detection	定量/($\mu\text{g}/\text{mL}$) limit of quantitation
Hx	$y = 16\ 013x + 6\ 126.8$	$R^2 = 0.999\ 8$	0.1	0.3
IMP	$y = 14\ 825x - 1\ 970$	$R^2 = 0.999\ 9$	0.2	0.6
HxR	$y = 12\ 049x - 1\ 174.8$	$R^2 = 0.999\ 8$	0.2	0.6
AMP	$y = 20\ 946x - 6\ 797.3$	$R^2 = 0.999\ 7$	0.2	0.6
ADP	$y = 7\ 536.5x + 4\ 051.4$	$R^2 = 0.999\ 4$	0.4	1.2
ATP	$y = 16\ 216x - 13\ 727$	$R^2 = 0.999\ 5$	0.4	1.2

表2 重复性试验

Tab. 2 Reproduction quality of the method

 $\bar{x} \pm \text{SE}, n = 6$

项目 item	峰面积 peak area	相对标准偏差/% RSD	保留时间/min retention time	相对标准偏差/% RSD
Hx	805 519 \pm 962	0.52	4.30 \pm 0.01	0.15
IMP	739 778 \pm 908	0.47	4.70 \pm 0.01	0.16
HxR	601 608 \pm 700	0.51	5.88 \pm 0.02	0.30
AMP	1 040 937 \pm 996	0.41	7.29 \pm 0.02	0.30
ADP	379 688 \pm 235	0.49	9.67 \pm 0.04	0.40
ATP	796 157 \pm 648	0.61	12.09 \pm 0.05	0.46

回收率和精密度实验 本实验以中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)作为样本。取适量标准品加入到5.0 g样品中,使添加量相当于25,100和400 $\mu\text{g}/\text{g}$,按“样品制备”中所述步骤进行样品处理,每个添加水平做6个平行,用外标法计算其实际含量和加标平均回收率(表3)。由表3可知,

Hx、IMP、HxR、AMP、ADP、ATP加标样后分析检测的平均回收率为82.2%~110.0%,相对标准偏差(RSD)为4.2%~9.5%,表明该方法回收率和精密度都符合检测要求,可用于水产品中6种ATP关联物的分析检测。

表3 回收率试验

Tab. 3 Recovery of the method

 $\bar{x} \pm \text{SE}, n = 6$

项目 item	加标量/($\mu\text{g}/\text{g}$) spiked standard	实际测出量/($\mu\text{g}/\text{g}$) found	平均回收率/% mean recovery	相对标准偏差/% RSD
Hx	25.0	27.0 \pm 1.8	108.0	5.7
	100.0	88.6 \pm 2.9	88.6	8.6
	400.0	376.8 \pm 1.4	94.2	5.4
IMP	25.0	27.5 \pm 0.5	110.0	8.5
	100.0	94.9 \pm 2.5	94.9	6.3
	400.0	416.2 \pm 1.3	104.1	5.9
HxR	25.0	24.5 \pm 0.9	98.0	5.3
	100.0	82.2 \pm 1.5	82.2	7.5
	400.0	380.1 \pm 0.7	95.1	8.0
AMP	25.0	24.7 \pm 1.2	98.8	9.5
	100.0	85.1 \pm 1.9	85.1	7.2
	400.0	356.8 \pm 0.6	89.2	6.9
ADP	25.0	25.5 \pm 1.7	102.0	7.2
	100.0	86.2 \pm 2.2	86.2	6.4
	400.0	340.8 \pm 1.8	85.2	5.4
ATP	25.0	25.2 \pm 2.0	100.8	6.5
	100.0	93.4 \pm 0.9	93.4	4.2
	400.0	359.5 \pm 1.5	89.9	7.3

2.8 应用

将本方法应用于中华绒螯蟹中 ATP 关联化合物含量的测定,取解冻好的中华绒螯蟹样品 5.0 g,做 3 个平行,按“样品制备”中所述步骤进行样品处理,然后经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,按色谱条件进样 10 μL 得色谱图(图 6),图 7 为添加标准品后的中华绒螯蟹 HPLC 色谱图。以标准曲线计算中华绒螯蟹中 6 种 ATP 关联化合物的含量。结果显示,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏 4 d 的中华绒螯蟹中 ATP 含量为 $(0.41 \pm 0.29)\ \mu\text{mol/g}$,ADP 含量为 $(1.30 \pm 0.28)\ \mu\text{mol/g}$,AMP 含量为 $(2.48 \pm 0.50)\ \mu\text{mol/g}$,IMP 含量为 $(3.58 \pm 0.92)\ \mu\text{mol/g}$,HxR 含量为 $(1.06 \pm 0.47)\ \mu\text{mol/g}$,Hx 含量为 $(0.67 \pm 0.73)\ \mu\text{mol/g}$ 。结果与 OCANO-HIGUERA 等^[26]报道的水产品中 ATP 关联化合物含量相吻合。

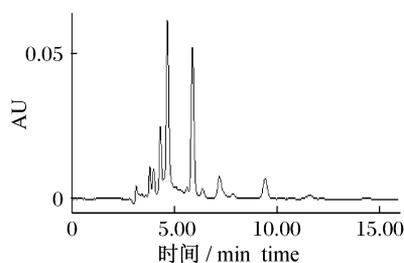


图 6 实际样品(中华绒螯蟹)液相色谱图
Fig. 6 HPLC chromatogram of Chinese mitten crab sample

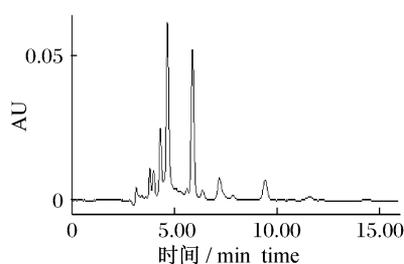


图 7 标准添加液相色谱图
Fig. 7 HPLC chromatogram of sample added standard

鲜度质量指标 K 值是反映水产品初期鲜度变化以及与品质风味有关的生化质量指标。一般采用 K 值小于 20% 作为优良鲜度指标(日本用于生食鱼肉的质量标准), K 值小于 60% 作为加工原料的鲜度标准,60% ~ 80% 为初期腐败鱼^[1,27]。测定其最终分解产物(次黄嘌呤核苷和次黄嘌呤)所占总的 ATP 关联化合物的百分数即为鲜度

指标 K 值,可用下式表示:

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

K 值越小表示鲜度越好, K 值越大则鲜度越差。通过计算,得出在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏 4 d 的中华绒螯蟹中的 K 值为 16.4。小于 20%,说明在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏 4 d 的中华绒螯蟹处于新鲜阶段。

3 讨论

采用甲醇-磷酸盐缓冲液作流动相,以四丁基氢氧化铵为离子对试剂,用磷酸调 pH 至 6.5,采用 Thermo ODS-2 HYPERSIL 色谱柱,在 254 nm 处可同时将 6 种 ATP 关联化合物很好的分离出来,峰型很好无拖尾现象。由于离子对试剂中的阳离子可与核苷酸中的负电荷相互作用,而烷基基团又可吸附于色谱柱固定相的十八烷基,造成一定的保留时间,加大有机修饰因子的量可以减弱这种疏水相互作用,核苷酸的洗脱顺序按其所含电荷的多少排列,依次是次黄嘌呤、腺苷酸、次黄嘌呤核苷、一磷酸核苷、二磷酸核苷、三磷酸核苷;同时本研究也分别比较了磷酸盐缓冲液和乙酸铵两种缓冲溶液对测定的影响,通过实验发现,磷酸盐缓冲液不仅可将目标物完全分离,而且峰型很好。

保留时间是定性依据,峰高或峰面积是定量计算的参数,本研究 6 种 ATP 关联化合物保留时间的 RSD% 均小于 3%,峰面积的 RSD% 均小于 3%,在 2 ~ 400 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内线性关系良好,对水产品中 6 种 ATP 关联化合物作了加标回收率测定,回收率为 82.2% ~ 110.0%,表明此法重现性好,定性可靠,定量准确。本研究在 13 min 内分离测定了上述 6 种物质,获得满意结果,该方法是一种简便快速、可靠的方法,并且实用性强。

参考文献:

- [1] 沈月新,章超桦,薛长湖,等. 水产食品学[M]. 北京:中国农业出版社,2001:159-194.
- [2] BREMNER H A, OLLEY J, STATHAM J A, *et al.* Nucleotide catabolism; influence on the storage life of tropical species of fish from the North West Shelf of Australia[J]. *Journal of Food Science*, 1988, 53(1): 6-11.
- [3] 崔桂友. 呈味核苷酸及其在食品调味中的应用

- [J]. 中国烹饪研究,1999(2):1-6.
- [4] 于信令. 味精工业手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1995:556-558.
- [5] 董彩文. 鱼肉鲜度测定方法研究进展[J]. 食品与发酵工业,2004,30(4):99-103.
- [6] SAITO T, ARAI K, MATSUGOSHI M. A new method for estimating the freshness of fish [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries,1959,24:749-750.
- [7] LOSADA V, PIÑEIRO C, BARROS-VELÁZQUEZ J, *et al.* Inhibition of chemical changes related to freshness loss during storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in slurry ice [J]. Food Chemistry,2005,93(4):629-625.
- [8] SANTIAGO P A, CARMEN P, JOSE M G, *et al.* Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta maxima*) [J]. Food Chemistry,2005,90:445-452.
- [9] NEJIB G, MOZA A, ISMAIL M A, *et al.* The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) [J]. Food Research International, 2005, 38: 215-222.
- [10] MENDES R, QUINTA R, NUNES M L. Changes in baseline levels of nucleotides during ice storage of fish and crustaceans from the portuguese coast [J]. European Food Research and Technology,2001,212(2):141-146.
- [11] TAKASHI K, MAYA F, HIDEYUKI G, *et al.* Effects of freshness on ATP-related compounds in retorted chub mackerel *Scomber japonicas* [J]. Food Science and Technology,2007,40(7):1186-1190.
- [12] 张婉燕,鲁红军,王津生. 高效液相色谱法测定食品中呈味核苷酸的含量[J]. 食品科学,1994,15(7):62-64.
- [13] VECIANA-NOGUES M T, IZQUIERDO-PULIDO M, VIDAL-CAROU M C. Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC [J]. Food Chemistry,1997,59(3):467-472.
- [14] WANG Q, XUE C H, LI Z J. Changes in the contents of ATP and its related breakdown compounds in various tissues of oyster during frozen storage [J]. Journal of Ocean University of China: English Edition,2007,6(4):407-412.
- [15] TSODA T. Separation of nucleotides by high-voltage capillary electrophoresis [J]. Journal of Applied Biochemistry,1983,5:330-336.
- [16] HORVATH C, MELANDER W, MOLLNAR I. Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary with nonpolar [J]. Analytical Chemistry,1977,49(1):142.
- [17] FERREIRA I M P L V O, MENDES E, GOMES A M P, *et al.* The determination and distribution of nucleotides in dairy products using HPLC and diode array detection [J]. Food Chemistry,2001,74(2):239-244.
- [18] BARAT J M, GIL L, BREIJO E G, *et al.* Freshness monitoring of sea ream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor [J]. Food Chemistry,2008,108(16):681-688.
- [19] SELLEVOLD O, JYNGE P, AARSTAD K. High performance liquid chromatography: a rapid isocratic method for determination of creatine compounds and adenine nucleotides in myocardial tissue [J]. Molecular Cell Cardiology,1986,18(5):517-527.
- [20] 杨文鹤,薛长湖,徐大伦,等. 大黄鱼冰藏期间 ATP 关联物含量变化及其鲜度评价 [J]. 农业工程学报,2007(6):217-222.
- [21] 吴钰珩,汤丽芬,谭炳炎,等. 用反相高效液相色谱法测定小鼠心肌、骨骼肌中 ATP、ADP、AMP 的含量 [J]. 分析测试学报,1999,18(4):54-57.
- [22] 孟宪清,李群伟,朱大岭,等. 高效液相色谱测定组织中 ATP、ADP、AMP 含量的方法 [J]. 哈尔滨医科大学学报,1995,29(6):490-495.
- [23] 李治洪,刘克江. 高效液相色谱法测定 ATP 制剂含量 [J]. 药物分析杂志,1997,17(4):245-248.
- [24] YOKOYAMA Y, SAKAGUCHI M, KAWAI F, *et al.* Changes in concentration of ATP-related compounds in various tissues of oyster during ice storage [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58(11):2125-2136.
- [25] RYDER J M. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Agriculture Food Chemistry,1985,33(4):678-680.
- [26] OCANO-HIGUERA V M, MARQUEZ-RIOS E, CANIZALES D, *et al.* Postmortem changes in Cazon fish muscle stored on ice [J]. Food Chemistry,2009,116(4):933-938.
- [27] 关志苗. K 值—判定鱼品鲜度的新指标 [J]. 水产科学,1995,1(14):33-35.

Simultaneous determination of six ATP-related compounds in aquatic product using IP-RPLC

QIU Wei-qiang, CHEN Gang, CHEN Shun-sheng*, XIE Jing

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, the IP-RPLC method for the determination of six ATP-related compounds (ATP, ADP, AMP, IMP, HxR, Hx) in aquatic product was established. The optimal conditions such as pH, flow rate and concentration of mobile phase were confirmed. The accuracy, precision and limit of quantitation were surveyed and evaluated. The method is based on an extraction of nucleotides from aquatic product with a solution of 10% perchloric acid followed by neutralization by the addition of KOH just prior to HPLC analysis. Chromatographic separations were performed using a Thermo ODS-2 Hypersil (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, the column temperature was 25 °C. The mobile phase consisted of 90% 0.05 mol/L sodium phosphate buffer, 10% methanol and 9.5 mmol/L tetrabutylammonium hydroxide, and was adjusted to pH 6.5 with phosphoric acid, the mobile phase was delivered at a flow rate of 0.9 mL/min with equivalent elution, and the detection wave length was 254 nm. The six ATP-related compounds were separated in 13 min. The standard curves of six ATP-related compounds were linear within a range of 2–400 μg/mL, and the correlation coefficient deviations range from 0.999 4 to 1.000 0. The limits of detection (S/N = 3) were between 0.1 μg/mL and 0.4 μg/mL. The average recovery of spiked sample deviations range from 82.2% to 110.0%, and the relative standard deviations (RSD) were between 4.2% and 9.5%. In conclusion, the method proved to be simple, rapid, reliable and with high accuracy and precision. The method has practical value for detecting six ATP-related compounds in aquatic product.

Key words: aquatic product; IP-RPLC; ATP-related compounds

Corresponding author: CHEN Shun-sheng. E-mail: sschen@shou.edu.cn