

# 高效液相色谱法测定水产品中 ATP 关联化合物

汤水粉 钱卓真 罗方方 吴成业\*

(福建省水产研究所, 厦门 361013)

**摘要** 建立了水产品中三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、腺苷酸(AMP)、肌苷酸(IMP)、次黄嘌呤核苷(HxR)和次黄嘌呤(Hx) 6种 ATP 关联化合物的高效液相色谱检测方法。样品中的 ATP 关联物经高氯酸提取并用氢氧化钠调节 pH 值至 6.0-6.4 后,以 AQ-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱为分析柱, 0.02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.02 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (V/V = 1/1) 的缓冲液为流动相进行洗脱, 在 254 nm 波长下用高效液相色谱进行检测, 外标法定量。研究表明, ATP、ADP、AMP、IMP 和 HxR 线性范围为 0.2-40.0 μg/ml, Hx 线性范围为 0.1-20.0 μg/ml, 相关系数均大于 0.999 0; ATP、ADP、AMP、IMP 和 HxR 检出限为 5.00 mg/kg, Hx 检出限为 2.5 mg/kg (S/N = 3); 对真鲷、鲈鱼、鲑鱼、凡纳滨对虾和梭子蟹 5 种水产品进行 3 个浓度水平的加标实验, 回收率在 85.5% - 105% 之间, 相对标准偏差(RSD) 小于 12.9%。实验结果表明, 该方法简便、准确, 适合于水产品中 ATP 关联物的测定。

**关键词** ATP 关联物; 水产品; 高效液相色谱

中图分类号 S984.1; S984.2; S984.3 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)02-0110-07

## Determination of ATP-related compounds in aquatic products by high performance liquid chromatography

TANG Shui-fen QIAN Zhuo-zhen LUO Fang-fang WU Cheng-ye\*

(Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013)

**ABSTRACT** A high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of adenosine triphosphate (ATP) and its breakdown products, adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), inosinic acid (IMP), inosine (HxR) and hypoxanthine (Hx) was studied. The samples were extracted with perchloric acid, and pH value was adjusted to 6.0-6.4 with sodium hydroxide. The six ATP-related compounds were then separated on an AQ-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with 0.02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.02 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (V/V = 1/1) buffer as the mobile phase. At wavelength of 254 nm, ATP-related compounds were detected and quantified by external standard method. The calibration curves were linear in the range of 0.2 - 40.0 μg/ml for ATP, ADP, AMP, IMP and HxR, and 0.1 - 20.0 μg/ml for Hx, with all correlation coefficients above 0.999. The detection limit for ATP, ADP, AMP, IMP, and HxR was 5.00 mg/kg, and was 2.50 mg/kg for Hx, with S/N = 3. The average recoveries of ATP compounds in *Pagrosomus major*, *Seriola quinqueradiata*, *Oncorhynchus keta*, *Litopenaeus vannamei* and *Portunus trituberculatus* samples at three spiked lev-

农业行业标准制定和修订项目资金(2011-175)资助

\* 通讯作者。E-mail: wcy@fjcs.ac.cn

收稿日期: 2013-07-07; 接受日期: 2013-10-24

作者简介: 汤水粉(1985-), 女, 工程师, 主要从事水产品质量安全检测研究。E-mail: powder2005@126.com

els varied from 85.5% to 105%, and the relative standard deviation (RSD) was less than 12.9%. The results indicated that this method is rapid and reliable, and it is suitable for simultaneous determination of the six ATP-related compounds in aquatic products.

**KEY WORDS** ATP-related compounds; Aquatic products; High performance liquid chromatography

ATP 关联物包含三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)、二磷酸腺苷(Adenosine diphosphate, ADP)、腺苷酸(Adenosine monophosphate, AMP)、肌苷酸(Inosinic acid, IMP)、次黄嘌呤核苷(Inosine, HxR)和次黄嘌呤(Hypoxanthine, Hx)等,是水产动物肌肉核苷酸的主要成分。其中 IMP 是鲜味的主要成分,它的产生可提高鱼贝类的鲜味(杨文鸽 2007);Hx 则相反,会使肉呈苦味。因此,水产品的风味和新鲜度与其肌肉中 ATP 关联物的含量密切相关(邱伟强等 2011)。一般认为,鱼类、虾类死后,其肌肉内 ATP 在三磷酸腺苷酶的作用下,会降解为 ADP、AMP、IMP、HxR,最后转化成 Hx。其中 HxR 和 Hx 含量之和与 ATP 关联化合物总量的比值即为  $K$  值(励建荣等 2010;杨文鸽等 2007a,b)。 $K$  值越小表示鲜度越好, $K$  值越大则鲜度越差。早在 1959 年,国外研究者 Saito 等(1959)就提出,可以根据 ATP、ADP、AMP、IMP、HxR、Hx 降解过程,评定鱼类的鲜度。如今  $K$  值已经被广泛应用于鱼类品质评价,是一个重要的鲜度指标。可见,通过水产品中 ATP 关联物含量的检测,可了解鱼体死后 ATP 的降解程度,对其新鲜度进行评价,有利于获得高品质的保鲜水产品,提高人们的生活品质。

水产品中 ATP 关联物的测定方法主要包括高效液相色谱法(HPLC)(Vazquez-Ortiz *et al.* 1997; Veciana-Nogues *et al.* 1997; Mora *et al.* 2010)、超高效液相色谱法(Zhou *et al.* 2012)、酶电极传感器法(Ghosh *et al.* 1998)、柱层析简易测定法(刘勤生等 2009)等。其中高效液相色谱法(HPLC)设备简单,灵敏度高,选择性和特异性好,能够对低浓度的样品进行很好的定性和定量测定,已在食品、环境、医疗卫生等方面有广泛应用(吴海燕等 2012;杨帆等 2013;王新星等 2013;周明莹等 2011)。高效液相色谱法适合于水产品中 ATP 关联物检测。

目前,对鱼类贮藏期间的 ATP 关联物含量变化的研究较多(李辉等 2011;万汝明 1982),但对虾、蟹类的此类变化研究较少。本研究通过对检测条件的优化,建立了一种测定鱼、虾、蟹等水产品中 ATP 关联物的高效液相色谱法。该方法测定简单,适合于水产品中 ATP 关联物含量的测定,能够广泛地推广与运用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和设备

ATP 关联物标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer),纯度 $\geq 98\%$ ;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钠、高氯酸(国药集团化学试剂有限公司),分析纯;实验用水为 Millipore Academic 制备的超纯水。

鲜活的虾、梭子蟹、真鲷购自当地生鲜超市;鲷鱼、鲑鱼等生鱼片购买于日本料理店。

Waters 2695 液相色谱仪、Waters 2487 紫外检测器、Empower 工作站软件(Waters 公司);漩涡振荡器(德国 IKA);冷冻离心机:8000 r/min,4℃(上海安亭科学仪器厂);pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司):精确至 0.01。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品制备

鱼:去头、去鳞、去皮、去内脏,沿脊背取肌肉部分;虾:去头、去壳、去肠腺,取肌肉部分;蟹:去壳,取肌肉部分。将鱼、虾、蟹取得的肌肉部分分别匀质混匀。制备的样品如不能及时检测,于 $-18^{\circ}\text{C}$ 以下贮存备用。

### 1.2.2 样品提取方法

称取均质后的样品( $2.00 \pm 0.05$ )g放入50 ml离心管内,加入10%的高氯酸溶液20 ml,涡旋振荡1 min,在4℃下8000 r/min离心10 min,取出上清液。再用5%的高氯酸溶液20 ml重新提取1次,合并上清液。用10 mol/L的NaOH溶液调节提取液pH值至接近6.0,然后再用1 mol/L的NaOH溶液继续调节pH至6.0-6.4。将已中和到pH=6.0-6.4的溶液用超纯水定容至50 ml。在4℃下8000 r/min离心10 min,0.22 μm的微孔滤膜过滤,滤液于4℃下保存,待测。

### 1.2.3 色谱条件

色谱柱:AQ-C<sub>18</sub>柱,250 mm×4.6 mm(i. d.),粒径5 μm;流动相:0.02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.02 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(V/V=1/1)的缓冲液;流速:1.0 ml/min;柱温:35℃;检测波长:254 nm;进样量:20 μl。

### 1.2.4 标准曲线绘制

准确称取适量的ATP关联物,用超纯水配制成混合标准储备液,ATP、ADP、AMP、IMP、HxR浓度均为1.0 mg/ml;Hx浓度为0.5 mg/ml。各标准储备液置于4℃冰箱中冷藏保存,保存期不超过15 d。根据每种ATP关联物的灵敏度和线性范围,用流动相稀释成一系列浓度梯度的混合标准工作溶液,吸取20 μl进样分析,根据各组分的响应峰面积与相应的质量浓度进行线性回归,绘制标准曲线。

## 2 结果

### 2.1 检测条件的确定

#### 2.1.1 色谱柱的选择

实验比较了Waters symmetry C<sub>18</sub>柱和AQ-C<sub>18</sub>柱两种色谱柱,结果表明,当用Waters symmetry C<sub>18</sub>柱时,不能完全分离6种ATP关联物,用水性柱AQ-C<sub>18</sub>柱作为色谱分离柱,能使6种ATP关联物得到有效的分离,且基线平稳,稳定性好。

#### 2.1.2 流动相的选择

根据相关文献报道,ATP、ADP、AMP、IMP、HxR、Hx可以用酸性的柠檬酸-三乙胺-冰乙酸缓冲液(Veciana-Nogues *et al.* 1997)或KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>缓冲液(万汝明 1982)进行分离。尝试了不同流动相对分离效果的影响,当采用酸性的柠檬酸-三乙胺-冰乙酸缓冲液作为流动相时,6种ATP关联物不能完全分离,而且基线稳定性较差;而以0.02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.02 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(V/V=1/1)的缓冲液作为流动相时,分离效果较好。

#### 2.1.3 流动相pH的确定

由于pH值对分析物质保留时间和分离效果影响很大,实验比较了流动相不同pH值对ATP关联物分离度的影响。当pH=6.40-6.80时,ATP、IMP和ADP分离效果差;随着pH值的降低,分离度越来越好,当pH=6.0时,基线稳定,各物质峰型对称,峰宽较窄,分离效果好,出峰时间稳定;当pH=5.4时,ADP和IMP无法分离;因此,实验采用0.02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.02 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(V/V=1/1),pH=6.0的缓冲液作为流动相进行分析。

### 2.2 线性关系与检出限

在上述优化的色谱条件下,测得标准溶液色谱图(图1)。各种ATP关联物在该色谱条件下得到了很好的分离,且未发现杂质色谱峰的干扰。同时对系列浓度的标准溶液进行测定,以峰面积(y)对ATP关联物的质量浓度(c)作线性回归,表1为测得的标准曲线。试验结果表明,ATP、ADP、AMP、IMP、HxR线性范围是0.2-40.0 μg/ml,Hx的线性范围0.1-20.0 μg/ml,线性相关系数均大于0.999,说明该方法适用于ATP关联物的定量分析。

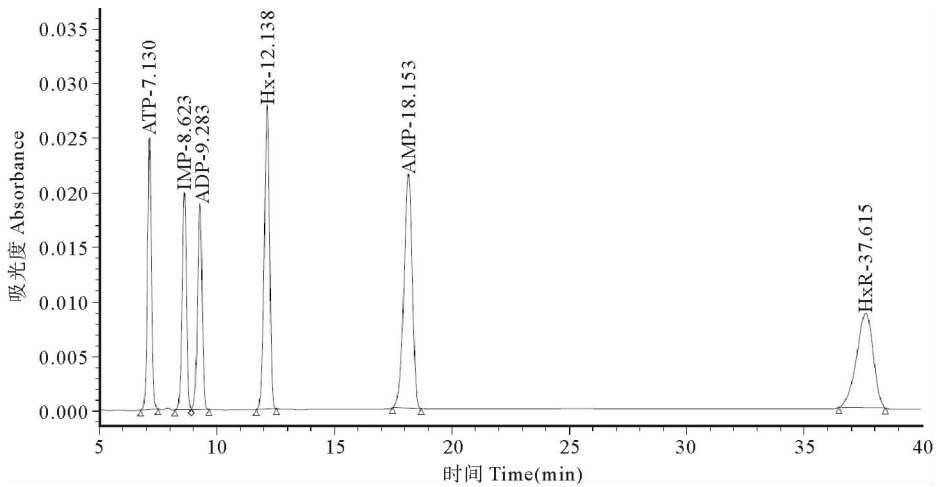


图1 6种ATP关联物的标准溶液色谱

Fig. 1 Chromatogram of mixture of six ATP-related compounds

表1 ATP关联物的回归方程及相关系数

Table 1 Regression equations and correlation coefficients of ATP-related compounds

ATP 关联物	线性范围	回归方程	相关系数	
ATP-related compound	Linear range ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Regression equation	Correlation coefficients $R$	
三磷酸腺苷	Adenosine triphosphate, ATP	0.2 - 40.0	$y = 26961.14c - 21.917$	0.9999
肌苷酸	Inosinic acid, IMP	0.2 - 40.0	$y = 22934.75c + 1548.831$	0.9999
二磷酸腺苷	Adenosine diphosphate, ADP	0.2 - 40.0	$y = 19666.90c + 869.723$	0.9999
次黄嘌呤	Hypoxanthine, Hx	0.1 - 20.0	$y = 82968.25c + 4747.431$	0.9999
腺苷酸	Adenosine monophosphate, AMP	0.2 - 40.0	$y = 49140.96c + 2043.910$	0.9999
次黄嘌呤核苷	Inosine, HxR	0.2 - 40.0	$y = 45141.15c - 956.924$	0.9998

以3倍信噪比( $S/N$ )计算,ATP、ADP、AMP、IMP、HxR检出限为5.00 mg/kg;Hx检出限为2.50 mg/kg。

### 2.3 方法回收率与精密度

以鱼、虾、蟹为测试对象,根据ATP关联物的灵敏度,分别添加3个不同浓度的ATP关联物混合标准溶液,进行加标回收率和精密度实验。ATP、ADP、AMP、IMP、H<sub>x</sub>R的添加量均为200、400、800 mg/kg;H<sub>x</sub>添加量为100、200、400 mg/kg,每种浓度的加标样品平行操作3份,以考察方法的准确度和精密度。图2为真鲷样品及加标样品的液相色谱图,实验结果见表2、表3。从表2可知,不同水产品中ATP、ADP、AMP、IMP加标总浓度为800、1600、3200 mg/kg时,平均回收率在93.4% - 105%之间。H<sub>x</sub>R、H<sub>x</sub>加标浓度之和为300、600、1200 mg/kg时,平均回收率在85.5% - 104%范围内;相对标准偏差小于12.9%(表3)。该方法具有较高的准确度和精密度,可以满足水产品中ATP关联物含量检测的要求。

### 2.4 实际样品检测

将本方法应用于鲮鱼(生鱼片)、中国对虾、梭子蟹样品中6种ATP关联化合物的检测。取(2.00 ± 0.05)g样品,按照上述样品前处理方法及色谱条件进行分析测定。通过标准曲线计算6种ATP关联化合物的含量,结果见表4。从实验结果可看出,该鲮鱼样品中ATP含量很少,这是由于高活性的三磷酸腺苷酶的作用使ATP迅速转化为IMP,使IMP含量急剧升高;即杀的梭子蟹样品中主要的ATP关联物是ATP;中国对虾样品中ATP、IMP、ADP和AMP含量都比较高。3种样品中HxR和Hx总含量均很少。

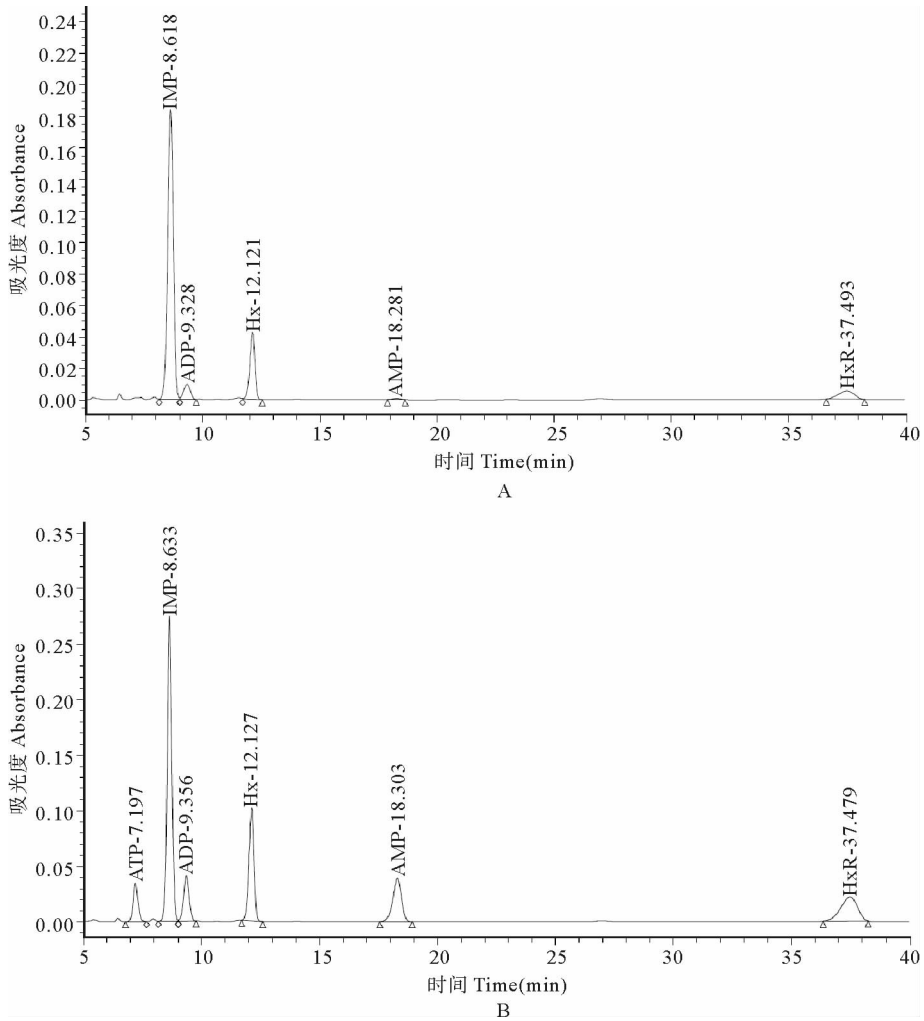


图2 真鲷样品(A)及加标样(B)色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of *P. major* sample (A) and spiked *P. major* sample (B)

表2 加标样的平均回收率和相对标准偏差—ATP + ADP + AMP + IMP

Table 2 Recovery and RSD for spiked samples with ATP, ADP, AMP and IMP

样品 Sample	加标量 Spiked concentration (mg/kg)				总加标量 Total spiked concentration (mg/kg)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
	ATP	ADP	AMP	IMP			
真鲷 <i>P. major</i>	200	200	200	200	800	98.1	5.85
	400	400	400	400	1600	101.0	4.95
	800	800	800	800	3200	97.7	2.04
鲷鱼 <i>S. quinquerediata</i>	200	200	200	200	800	88.0	4.36
	400	400	400	400	1600	96.0	6.78
	800	800	800	800	3200	94.4	4.76
鲑鱼 <i>O. keta</i>	200	200	200	200	800	94.5	9.51
	400	400	400	400	1600	94.6	5.82
	800	800	800	800	3200	96.3	8.34
凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	200	200	200	200	800	93.4	7.29

续表 2

样品 Sample	加标量 Spiked concentration (mg/kg)				总加标量 Total spiked concentration (mg/kg)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
	ATP	ADP	AMP	IMP			
梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	400	400	400	400	1600	96.3	4.97
	800	800	800	800	3200	97.2	3.97
	200	200	200	200	800	101.0	6.62
	400	400	400	400	1600	105.0	4.24
	800	800	800	800	3200	105.0	3.81

表 3 加标样的平均回收率和相对标准偏差— $H_xR + H_x$

Table 3 Recovery and RSD for spiked samples with  $H_xR$  and  $H_x$

样品 Sample	加标量 Spiked concentration (mg/kg)		总加标量 Total spiked concentration (mg/kg)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
	$H_x$	$H_xR$			
真鲷 <i>P. major</i>	100	200	300	95.8	2.94
	200	400	600	96.6	1.55
	400	800	1200	92.2	2.24
鲷鱼 <i>S. quinquerediata</i>	100	200	300	104.0	1.66
	200	400	600	100.0	2.79
	400	800	1200	91.4	4.16
鲑鱼 <i>O. keta</i>	100	200	300	95.0	7.27
	200	400	600	92.7	11.90
	400	800	1200	95.5	12.90
凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	100	200	300	99.5	8.79
	200	400	600	92.6	5.49
	400	800	1200	89.5	6.20
梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	100	200	300	85.5	9.48
	200	400	600	92.2	6.87
	400	800	1200	97.8	1.69

表 4 不同样品中 ATP 关联物含量

Table 4 Content of ATP-related compounds in different samples

ATP 关联物含量 Content of ATP-related compounds ( $\mu\text{mol/g}$ )		ATP	IMP	ADP	AMP	$H_xR$	$H_x$
鲷鱼	<i>S. quinquerediata</i>	0.004	6.75	0.592	0.090	0.752	0.081
中国对虾	<i>F. chinensis</i>	2.08	4.13	3.10	2.23	0.219	0
梭子蟹	<i>P. trituberculatus</i>	4.70	0	0.978	0.311	0	0.203

$K$  值是反映水产品从僵硬阶段到自溶阶段的鲜度指标。其计算公式表示为:

$$K \text{ 值} = \frac{M_{H_xR} + M_{H_x}}{M_{ATP} + M_{ADP} + M_{AMP} + M_{IMP} + M_{H_xR} + M_{H_x}} \times 100\%$$

式中, $K$  值越小,鲜度越好。一般认为即杀鱼的  $K$  值在 10% 以下,推荐作为生鱼片的新鲜鱼  $K$  值大约在 20% 以下,20%–40% 为二级鲜度,60%–80% 为初期腐败鱼(邱伟强等 2011)。通过计算,鲷鱼(生鱼片)的  $K$  值为 10.1%,符合生鱼片的鲜度要求,可作为生鱼片食用;即杀的明虾、梭子蟹样品的  $K$  值分别是 1.86% 和 3.28%。

### 3 结论

本研究以鱼、虾、蟹为研究对象,建立了水产品中6种ATP关联化合物的高效液相色谱检测方法。在优化条件下,6种ATP关联物得到有效的分离,基线平稳,稳定性好;对样品进行不同浓度加标实验,回收率高,精密度好。最后将该方法应用于实际样品中ATP关联化合物的测定及鲜度指标K值分析。实验结果表明,该方法简便、可靠、实用性强,适合于水产品中ATP关联物含量的测定。

### 参 考 文 献

- 万汝明. 1982. 鱼类肌肉中核苷酸的降解与鱼的鲜度测定. 湛江水产学院学报, 3(1): 98-106
- 王新星, 于朝磊, 马静, 常青. 2013. 高效液相色谱法测定卤虫无节幼体中精胺含量. 渔业科学进展, 36(4): 108-112
- 刘勤生, 陈庆森, 柴春祥, 阎亚丽. 2009. 冷藏虾姑的鲜度评价研究. 食品科技, 34(10): 141-144
- 李辉, 刘莲凤, 杨博峰, 韩芳, 许加超, 高昕. 2011. 冰温保鲜条件下牙鲆的鲜度及质构变化. 渔业科学进展, 32(3): 64-68
- 励建荣, 李婷婷, 李学鹏. 2010. 水产品鲜度品质评价方法研究进展. 北京工商大学学报, 28(6): 1-8
- 杨文鸽. 2007. 几种海水养殖鱼贝类低温贮藏生化特性的变化及其鲜度评价. 见: 中国海洋大学博士研究生学位论文
- 杨文鸽, 薛长湖, 徐大伦, 竺巧玲, 楼乔明. 2007. 大黄鱼冰藏期间ATP关联物含量变化及其鲜度评价. 农业工程学报, 23(6): 217-222
- 杨帆, 翟毓秀, 任丹丹, 郭萌萌, 吴海燕, 谭志军. 2013. 高效液相色谱-荧光/紫外串联测定海洋沉积物中16种多环芳烃. 渔业科学进展, 34(5): 98-104
- 吴海燕, 郭萌萌, 李兆新, 谭志军, 乔玉玲. 2012. 高效液相色谱-荧光法测定水产品中多种四环素残留. 渔业科学进展, 33(5): 102-108
- 邱伟强, 陈刚, 陈舜胜, 谢晶. 2011. 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. 水产学报, 35(11): 1745-1752
- 周明莹, 马健, 高湘萍, 陈碧鹃, 乔向英, 谭志军, 郭萌萌. 2011. 高效液相色谱法检测海水中磺胺类药物残留. 渔业科学进展, 32(2): 102-105
- Ghosh S, Sarker D, Misra TN. 1998. Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for fish freshness detection. Sens Actuator B-Chem 53(1-2): 58-62
- Garcia-Mayor MA, Garcinuno RM, Fernandez-Hernando P and 1 other. 2006. Liquid chromatography-UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. J Chromatogr A 1122(1-2): 76-83
- Mora L, Hemández-Cázares AS, Aristoy MC and 1 other. 2010. Hydrophilic interaction chromatographic determination of adenosine triphosphate and its metabolites. Food Chem 123(4): 1282-1288
- Saito T, Arai K, Matsugoshi M. 1959. A new method for estimating the freshness of fish. Bull Jpn Soc Sci Fish 24(9): 749-750
- Vazquez-Ortiz FA, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sanchez ME and 1 other. 1997. Application of the freshness quality index (K value) for fresh fish to canned sardines from northwestern Mexico. J Food Comp Anal 10(2): 158-165
- Veciana-Nogues MT, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. 1997. Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC. Food Chem 59(3): 467-472
- Zhou L, Xue XF, Zhou JH and 3 others. 2012. Fast determination of adenosine 5'-triphosphate (ATP) and its catabolites in royal jelly using ultraperformance liquid chromatography. J Agric Food Chem 60(36): 8994-8999