

反相高效液相色谱法检测鱼肉中的 ATP 关联物

贾鹏禹¹, 孙蕊², 俞龙浩^{3,*}, 何淑清³, 张盟³, 张宇宁³

(1. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江省农产品加工工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319; 2. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319; 3. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 建立同时测定鱼肉组织中 6 种 ATP 关联物的高效液相色谱方法。采用反相高效液相色谱分离模式, 使用 Sepax Bio-C₁₈(250mm × 4.6mm, 5 μm, 200 Å) 色谱柱, 以 60mmol/L 磷酸二氢钾、60mmol/L 磷酸氢二钾组成的缓冲液(pH6.68)为流动相等比洗脱, 流速 0.6mL/min; 紫外检测波长为 254nm, 带宽为 16nm。6 种组分在 20min 内基线分离, 平均加标回收率在 98.3%~104.1% 之间, 线性范围为 1~400mg/L, 检出限在 15~40 μg/L 之间。该方法简便、准确, 易于移植。

关键词: 高效液相色谱; ATP 关联物; 鱼肉

Determination of ATP-Related Compounds in Fish by RP-HPLC

JIA Peng-yu¹, SUN Rui², YU Long-hao^{3,*}, HE Shu-qing³, ZHANG Meng³, ZHANG Yu-ning³

(1. Agri-Food Processing and Engineering Technology Research Center of Heilongjiang Province, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 3. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: The method for determination of ATP-related compounds in fish was established. The content of ATP-related compounds in fish were determined by RP-HPLC with a Sepax Bio-C₁₈(250mm × 4.6mm ID, 5 μm, 200 Å) column, and UV detector at a wave length of 254 nm (BW 16 nm). Mobile phase was 60 mmol/L KH₂PO₄ and 60 mmol/L K₂HPO₄ (pH=6.68) and flow rate was 0.6mL/min. The separation was achieved in 20 min. All the calibration curves were linear in the mass concentration range of 1 – 400 mg/L. The average recoveries of the standard additions were between 98.3% – 104.1%, and the LOD were between 15 – 40 μg /L for ATP-related compounds. This method proved to be reliable and reproducible.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); ATP-related compounds; fish

中图分类号: O657.72

文献标识码: A

文章编号: 1001-8123(2012)04-0024-04

鱼肉是人类主要的副食品之一, 鱼肉产品在流通过程中, 冰藏是最常见的保鲜方法。冰藏期间鱼类肌肉核苷酸会发生一系列的变化, 肌肉内腺苷三磷酸(ATP)依次降解为腺苷二磷酸(ADP)、腺苷酸(AMP)、肌苷酸(IMP)、肌苷(HxR)和次黄嘌呤(Hx), 其中 HxR、Hx 量之和对 ATP 关联物总量的比值即为 *K* 值, *K* 值作为一项重要鲜度指标被广泛应用于鱼类品质评价^[1-3]。此外, 研究人员正在展开冰藏方法研究以保证鱼肉的品质^[4-6]。因此, 准确检测鱼肉中的 ATP 关联物对鱼产品的品质研究及技术应用意义重大。

目前, 测定 ATP 关联化合物含量的方法主要有毛

细管电泳法和反相液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)。毛细管电泳法分辨率虽高, 但重现性不佳且仪器昂贵; 现有报道反相高效液相色谱法分离的核苷酸种类有限, 多局限于 ATP、ADP 和 AMP, 且较多使用了价格较贵的离子对试剂^[7-11], 随着高效液相色谱分离介质表面修饰技术的进步, 具有更好选择性和生物适应性的色谱柱不断涌现。本实验采用 Bio-C₁₈ 色谱柱及磷酸盐缓冲液为流动相, 对鱼肉中 6 种 ATP 关联化合物进行分离测定, 并对方法进行详细研究, 旨在为鱼类冰藏保鲜技术研究提供一定参考。

收稿日期: 2012-03-26

基金项目: 黑龙江省科技厅留学归国人员科学技术专项(1155h023)

作者简介: 贾鹏禹(1983—), 男, 研究实习员, 硕士, 主要从事仪器分析与样品前处理技术研究。E-mail: jiapengyu@126.com

* 通信作者: 俞龙浩(1962—), 男, 教授, 博士, 主要从事肉品科学与技术研究。E-mail: yu2058@sohu.com

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

活鱼(2.5kg ± 0.1kg) 大庆市购。

ATP 钠盐、ADP 钠盐、AMP 钠盐、IMP、HxR、Hx 标准品 美国 Sigma-Aldrich 公司; 实验用水为超纯水; 其他试剂均为国产色谱纯或分析纯。

1200 高效液相色谱仪(配备 G1310A 四元梯度泵、G1365D 多波长紫外检测器、G1329A 恒温自动进样器、G1322A 在线脱气机、G1316A 柱温控制单元、Chemstation 色谱工作站) 美国 Agilent 公司; Sepax Bio-C₁₈ 色谱柱 美国赛分公司; T6 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器公司; Suprafuge 22 高速冷冻离心机 德国贺利氏公司; ML104 电子分析天平、S40 多功能酸度计 瑞士梅特勒-托利多公司; Milli-Q 水纯化系统 美国密理博公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Sepax Bio-C₁₈(250mm × 4.6mm, 5 μm, 200Å); 流动相: 60mmol/L 磷酸二氢钾-60mmol/L 磷酸氢二钾缓冲液(pH6.68); 流速: 0.6mL/min; 柱温: 30℃; 紫外检测波长: 254nm, 带宽 16nm; 进样量: 10 μL。

1.2.2 样品前处理

参照 Nakatani 等^[12]的研究方法, 并结合实际情况进行处理。将鱼体去鳞去皮, 沿脊椎剖为两半, 取脊背肉, 精确称量的肉样品从液氮中取出, 按每 1g 样品加入 6mL 预冷的 HClO₄ 溶液(0.5mol/L)进行均质, 此溶液均质过程中分次加入以加强效果, 均质于冷库中进行; 均质后上清液在冰水浴中静置 5 min, 然后低温离心(10000r/min, 0℃)5min; 取出上清液, 用 0.5mol/L KOH 溶液调节 pH 值至中性, 定容摇匀; 0.45 μm 滤头过滤后上机检测。

上机样品储存需冷冻, 分析前, 先解冻后静置 15min 并过 0.45 μm 滤膜过滤。

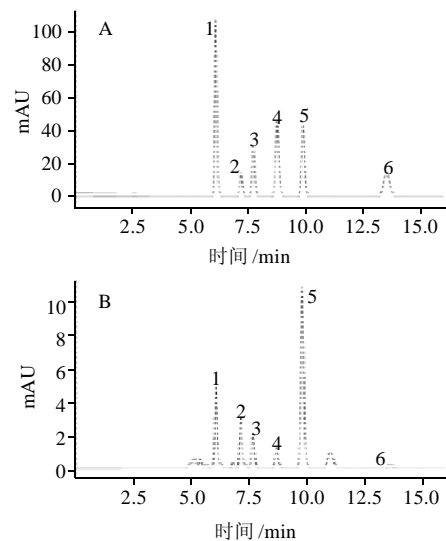
1.2.3 标准曲线的绘制与定量

配制含 ATP、ADP、AMP、IMP、HxR、Hx 均为 1、2、5、10、25、50、200、400mg/L 等不同质量浓度的系列标准溶液(预冷超纯水配制, 冷藏, 有效使用期 72h), 在上述条件下分别进样 10 μL, 以各组分质量浓度对峰面积作回归处理并制作工作曲线。采用外标法定量。

2 结果与分析

2.1 系统适应性

在优化的色谱条件下, 6 种 ATP 关联物在 20min 内全部基线分离, 标准品色谱图见图 1A; 样品分离不受基质干扰, 样品色谱图见图 1B。



1. IMP; 2. Hx; 3. AMP; 4. ADP; 5. ATP; 6. HxR。

图1 标准品(A)与样品(B)的色谱图

Fig.1 Chromatograms of standard and sample

2.2 色谱柱的选择

洪平等^[13]研究较为经典的反相离子对液相色谱检测方法, 所用离子对试剂为四丁基氢氧化铵(TBA), 但此方法较繁琐, 试剂(TBA)较贵, 方法不易移植; 邹玲莉等^[14]亦采用经典 C₁₈ 分离柱以及铵类离子对试剂为基本条件, 此方法溶剂系统复杂, 但其梯度洗脱配合流速、波长程序可变技术值得推崇。实验拟采取更加简单的溶剂系统(磷酸盐缓冲液)进行几种 C₁₈ 色谱柱的分离尝试, 结果发现, 以反相色谱分离极性化合物存在如下问题: 1)极性亲水性化合物在常规高键合密度硅胶 C₁₈ 柱上的保留不足, 高密度 C₁₈ 柱表面呈高度疏水性, 无法与亲水性的极性化合物充分形成保留(相似相容原理); 2)极性亲水性化合物在常规高键合密度硅胶 C₁₈ 柱上的保留不稳定, 需要使用到低溶剂强度的流动相(有机溶剂含量为 0~5%); 3)普通 C₁₈ 柱微孔脱水效应易导致保留时间逐步缩短, 需要长时间进行色谱柱平衡; 4)连续分析多个样品时遭遇困难, 重复性差。经比较发现, Sepax Bio-C₁₈ 色谱柱对于极性亲水化合物在简单的分离模式下具有较好的稳定性, 主要依赖其特殊化学键合技术形成的单层 ODS, 在纯水溶液中不会发生崩解或塌陷, 同时其硅醇基完全封端技术使得分离重现性极佳且峰型良好。

2.3 流动相的选择

ATP 关联化合物均为极性化合物, 在反相 HPLC 中, 与固定相之间的作用力弱, 且对有机溶剂非常敏感, 流动相中加入少量的甲醇或乙腈即得不到理想分离, 故宜利用全水相离子对技术。实验发现, 在 Sepax Bio-C₁₈ 单层键合相封尾的基础上, 对易发生离子化的样



品进行分离时，“离子抑制”(ion suppress)是最为有效的分离模式，即用缓冲液来调节流动相的 pH 值，对组分离子化过程进行抑制。该模式认为流动相中的缓冲液与组分相互作用，使其离子平衡向“中性”形式移动，更易于在反相柱上进行色谱分配。因此，实验利用 Sepax Bio-C₁₈ 可使用全水相的特点，选择以磷酸二氢钾和磷酸氢二钾组成的低浓度缓冲液等比洗脱，避开乙腈等洗脱剂对分离效果的影响。

2.4 流动相溶剂条件的优化

实验考察不同缓冲盐浓度对分离的影响，结果发现，随着离子强度的提高，目标物保留逐渐增强，考虑到磷酸盐对仪器系统的不利影响，故采用以 60mmol/L 磷酸二氢钾-60mmol/L 磷酸氢二钾组成的低浓度缓冲液进行等比洗脱。在考察不同 pH 值时实验发现，流动相的 pH 值对 ATP、ADP 和 AMP 的保留时间影响最大。当 pH 值低于 6.89 时，组分保留时间较长(抑制了离子化)，反之，当 pH 值高于 6.89 时，洗脱加快。因此，采用 pH 值为 6.68 的缓冲盐体系获得了满意的结果，未知物与样品中的各组分均能良好分离。

2.5 检测器光谱参数的设置

实验对 6 种目标组分进行紫外-可见光谱扫描，发现 IMP、Hx 和 HxR 在 248nm 波长处有最大吸收峰，ATP、ADP 和 AMP 在 259nm 附近有最大吸收峰。在分析方法建立过程中，在保证理想的线性范围的前提下，选择合适的谱带宽度至关重要，通常以吸收主峰半峰宽作为带宽参数，另外也可根据样品的浓度范围和运行体系的复杂程度进行谱带宽度的设置，协调检测灵敏度和线性范围之间的矛盾^[15]。实验考察带宽和参比波长的设置对检测的影响发现，随着谱带宽度的增加，入射光的单色性逐渐变差，对吸收峰敏锐度降低；而谱带宽度过窄，光通量较小，线性范围得不到保证；参比波长的设置可配合消除背景干扰。综上选择在检测波长 254nm、带宽 16nm、参比波长 360nm、带宽 100nm 波长下 6 种 ATP 关联化合物具有良好的敏感度，且不受流动相干扰。

2.6 线性关系、检出限、回收率和重现性

配制不同质量浓度的标准溶液，以质量浓度对峰面积做回归曲线，考察线性关系，3 倍信噪比($R_{SN} = 3$)计算检出限，结果见表 1。样品添加已知量标准品，按 1.2.2 节处理后进样，计算平均回收率和相对标准偏差($n = 6$)，结果见表 2。对标准样品中 6 种 ATP 关联化合物重复 6 次进样，每次间隔 2h，记录峰面积和保留时间考察重现性，结果见表 3。

表 1 线性回归方程

Table 1 Linear regression equations

成分	线性方程	线性范围/(mg/L)	相关系数	检出限/($\mu\text{g/L}$)
ATP	$A = 16216C - 13727$	1~400	0.9995	20
ADP	$A = 7536.5C + 4051.4$	1~400	0.9994	20
AMP	$A = 20946C - 6797.3$	1~400	0.9997	30
IMP	$A = 14825C - 970$	1~300	0.9999	15
HxR	$A = 12049C - 1174.8$	1~300	0.9998	20
Hx	$A = 16013C + 6126.8$	1~300	0.9998	40

表 2 回收率及相对标准偏差($n=6$)Table 2 Determination results of recoveries and RSD($n=6$)

成分	样品含量/ ($\mu\text{g/g}$)	添加量/ ($\mu\text{g/g}$)	检测量/ ($\mu\text{g/g}$)	回收 率/%	相对标准 偏差/%
ATP	54.1	20	73.6	99.1	2.1
ADP	4.9	20	25.1	104.1	2.8
AMP	3.1	20	23.2	102.3	3.1
IMP	239.2	20	258.1	99.9	5.4
HxR	10.9	20	30.7	98.3	4.9
Hx	25.6	20	45.3	98.7	5.5

表 3 重现性考察($n=6$)Table 3 Investigation of reproduction quality ($n=6$)

成分	峰面积/ (mAU · s)	峰面积相对标准 偏差/%	保留时 间/min	保留时间相对 标准偏差/%
ATP	412.624 ± 2.15	0.52	9.830 ± 0.01	0.12
ADP	447.607 ± 2.03	0.43	8.708 ± 0.01	0.11
AMP	268.384 ± 0.75	0.28	7.685 ± 0.02	0.19
IMP	735.096 ± 2.86	0.39	6.064 ± 0.02	0.23
HxR	274.012 ± 1.21	0.44	13.516 ± 0.01	0.24
Hx	112.154 ± 0.39	0.35	7.153 ± 0.02	0.12

2.7 所建方法的应用

分别对鲢鱼和鳙鱼在不同冰藏条件下进行目标组分含量测定，并计算 K 值以考察冰藏条件下各品种鱼肉 K 值随冰藏时间的变化。结果表明，鲢鱼的 K 值的上升速率大于鳙鱼，由此可知鲢鱼的耐藏性低于鳙鱼，其变化规律与相似的研究结果相类似。

3 结论

本法实现了鱼肉中 6 种 ATP 关联物同时测定，具有灵敏度高、快速、准确、重现性好等特点。采用 Sepax Bio-C₁₈ 单层键合相封端技术与全水相磷酸盐缓冲体系相结合可达到很好的分离效果，分析过程不会引起柱塌陷，运行 200 次样品后仍保持良好的重现性。通过反相液相色谱方法获得的数据不仅能直观地反映与鱼体品质相关联的各参数的变化，而且能建立简易的表达鱼肉品质方法，通过回归计算可预判鱼类产品的货架期，易于实际工作中推广应用。



参考文献:

- [1] 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): 99-104.
- [2] SAITO T, ARAI K, MATSUGOSHI M. A new method forestimating the freshness of fish[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1959, 24(9): 749-750
- [3] 李学英, 许钟, 郭全友, 等. 大黄鱼冷藏过程中的鲜度变化[J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 442-447.
- [4] 姚燕佳, 张进杰, 顾伟钢, 等. 不同储藏温度对鲢鱼鲜度品质的影响[J]. 浙江大学学报, 2011, 37(2): 212-218.
- [5] 徐小宝, 刘书来, 沈鹰狮, 等. 盐水超冷却处理对冰藏鱼品质的影响研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(1): 264-268.
- [6] 杨文鸽, 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, 23(6): 217-221.
- [7] 周春喜, 郁荣, 吕海燕, 等. 三磷酸腺苷、二磷酸腺苷和一磷酸腺苷的毛细管电泳分析研究[J]. 分析科学学报, 2003, 19(5): 433-437.
- [8] PLVO F M, 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.
- [9] BARAT J M, GIL L, GARCIA-BREIJO E, et al. Freshness monitoring of sea ream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor[J]. Food Chemistry, 2008, 108(16): 681-688.
- [10] SELLEVOLD O, JYNGE P, AARSTAD K. High performance liquid chromatography: a rapid isocratic method for determination of creation compounds and adenine nucleotides in myocardial tissue[J]. Molecular Cell Cardiology, 1986, 18(5): 517-527.
- [11] 陈兰珍, 李桂芬, 薛晓锋, 等. 蜂王浆中磷酸腺苷的提取及超高效液相色谱分析[J]. 色谱, 2008, 26(6): 736-739.
- [12] NAKATANI Y, FUJITA T, SAWA S, et al. Changes in ATP-related compounds of beef and rabbit muscles and a new index of freshness of muscle[J]. Agric Biol Chem, 1986, 50(7): 1751-1756.
- [13] 洪平, 刘虎威, 靳光华, 等. 高效液相色谱法测定骨骼肌 ATP、ADP、AMP、NAD⁺、NADH 含量[J]. 中国运动医学杂志, 2002, 21(1): 57-61.
- [14] 邹玲莉, 李秋莎, 韩国柱, 等. 离子对反相高效液相色谱法同时测定大鼠血浆和红细胞中外源性磷酸肌酸及其代谢产物和相关三磷酸腺苷[J]. 分析化学, 2011, 39(1): 45-50.
- [15] 初红涛, 张庆合, 李彤, 等. 高效液相色谱紫外-可见光检测器参数设置对分析结果的影响[J]. 现代科学仪器, 2005, 21(6): 76-79.