DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250827001
引用格式: 张艳红, 易倩, 张凤枰, 等. 高效液相色谱法测定水产品中 5 种核苷酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 195–205.
ZHANG YH, YI Q, ZHANG FP, *et al*. Determination of 5 kinds of nucleotides content in aquatic products by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 195–205. (in Chinese with English abstract).

高效液相色谱法测定水产品中 5 种核苷酸含量

张艳红[1], 易　倩[1], 张凤枰[2*], 杨　洁[1], 杨欣怡[1]

(1. 四川威尔检测技术股份有限公司, 成都　610041; 2. 宜宾学院质量管理与检验检测学部, 宜宾　644007)

摘　要: 目的　建立高效液相色谱法测定水产品中 5 种核苷酸的分析方法。**方法**　通过色谱条件优化和前处理条件选择, 样品在 4 ℃条件下, 用 5%高氯酸溶液均质提取 2 次, 以 0.01 mol/L KH_2PO_4(含 1.45 mmol/L 四丁基硫酸氢铵, pH=5.0)-乙腈(95:5, *V*:*V*)为流动相洗脱, 经 C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱分离, 紫外检测器检测, 标准曲线外标法定量。**结果**　5 种核苷酸在 0.1~100.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 检出限和定量限分别为 1.0~2.0 mg/kg 和 3.0~6.0 mg/kg, 方法精密度为 2.00%~6.87%, 加标回收率在 92.3%~105.6%之间, 批内相对标准偏差为 0.63%~7.90%, 批间相对标准偏差为 1.72%~7.34%。**结论**　该方法灵敏度高、重复性好, 可用于水产品中 5 种核苷酸的定性定量分析。

关键词: 高效液相色谱法; 水产品; 核苷酸

Determination of 5 kinds of nucleotides content in aquatic products by high performance liquid chromatography

ZHANG Yan-Hong[1], YI Qian[1], ZHANG Feng-Ping[2*], YANG Jie[1], YANG Xin-Yi[1]

(1. *Sichuan Willtest Technology Co*., *Ltd*., *Chengdu* 610041, *China*;
2. *Facuity of Quality Management and Inspection Quarantine*, *Yibin University*, *Yibin* 644007, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a method for the determination of 5 kinds of nucleotides in aquatic products by high performance liquid chromatography. **Methods**　After optimization of chromatographic conditions and selection of pretreatment conditions, the sample was extracted twice with 5% perchloric acid solution at 4 ℃, and then extracted with 0.01 mol/L KH_2PO_4 (containing 1.45 mmol/L tetrabutyl ammonium bisulfate, pH=5.0)-acetonitrile (95:5, *V*:*V*) was eluted by mobile phase, separated by C_{18} (250 mm×4.6 mm×5 μm) column, detected by ultraviolet detector, and quantified by external standard method with standard curve. **Results**　The 5 kinds of nucleotides had a good linear relationship in the range of 0.1–100.0 μg/mL, and the correlation coefficient was greater than 0.999. The limits of detection and limits of quantitation were 1.0–2.0 mg/kg and 3.0–6.0 mg/kg, respectively, and the precisions were 2.00%–6.87%. The spike recoveries were 92.3%–105.6%, the intra-assay standard deviations were 0.63%–7.90%, and the inter-assay standard deviations were 1.72%–7.34%. **Conclusion**　This method

收稿日期: 2025-08-27
基金项目: 国家标准化管理委员会 2025 年第六批推荐性国家标准计划项目(20251875-T-326)
第一作者: 张艳红(1993—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品和农产品质量安全检测。E-mail: zhangyh@willtest.cn
***通信作者:** 张凤枰(1972—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: fengpingzhang@163.com

has high sensitivity and good repeatability, and can be used for the qualitative and quantitative analysis of 5 kinds of nucleotides in aquatic products.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; aquatic products; nucleotides

0 引 言

我国水产品消费量位居全球首位, 2024 年水产品总产量为 736 万 t, 5 年间增长 12.5%, 其中鱼类、虾蟹类和贝类为主要消费品类[1]。水产品因其肉质鲜美, 富含优质蛋白质、不饱和脂肪酸、维生素和矿物质等营养成分, 深受消费者青睐[2–6]。这种鲜美不仅源于其肉质特性, 还与其独特的滋味密切相关。水产品的滋味主要由游离氨基酸、核苷酸、寡肽、有机碱、有机酸、糖类和无机离子等互相作用产生[7–8]。其中, 核苷酸作为一类非常重要的呈鲜味物质, 是由核苷和磷酸通过酯键连接而成的非蛋白质含氮化合物, 其含量与水产品新鲜度和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)降解反应紧密相关[9–13]。研究发现, 当磷酸酯连接在五碳糖的 5 号位, 碱基为嘌呤基, 嘌呤环 6 号位为羟基, 且磷酸酯的两个羟基处于解离状态时, 才呈现鲜味[14–15]。目前已发现 30 多种呈鲜味的核苷酸及其衍生物, 主要包括腺嘌呤核苷酸(adenosine monophosphate, AMP)、胞嘧啶核苷酸(cytidylic acid, CMP)、鸟嘌呤核苷酸(guanosine monophosphate, GMP)、次黄嘌呤核苷酸(inosinic acid, IMP)、尿嘧啶核苷酸(uridylic acid, UMP)[16–17]。因此, 快速准确地检测水产品中呈味核苷酸组成及其浓度水平, 可为其建立鲜度评价指标和综合品质分级提供关键数据支撑。

目前, 有关呈味核苷酸组分测定方法主要为荧光比色法[18]、毛细管电泳法[19]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)[20–21]、离子色谱法[22–24]和超高效液相色谱-串联质谱法[25–26]等。其中荧光比色法操作步骤烦琐, 特异性差, 目标组分容易受到干扰; 毛细管电泳法基质效应显著, 重现性差; 离子色谱法对流动相条件敏感, 目标化合物分离困难, 灵敏度易受基质干扰; 超高效液相色谱-串联质谱法具有选择性强、灵敏度高、分析速度快等优势, 但基质效应明显, 需增加固相萃取等复杂的前处理步骤, 水产品中核苷酸含量较高, 需多次稀释, 增加结果误差, 且设备价格及运行成本高昂; HPLC 是核苷酸检测最常用的方法, 其目标化合物分离度好, 灵敏度高, 前处理简单, 检测成本较为合理。

SC/T 3048—2014《鱼类鲜度指标 K 值的测定 高效液相色谱法》规定了 ATP 及其降解产物[腺苷二磷酸(adenosine diphosphate, ADP)、AMP、IMP、次黄嘌呤核苷(inosine, HxR)、次黄嘌呤(hypoxanthine, Hx)]的检测方法, 用于计算新鲜度指标 K 值, 但未涵盖对水产品鲜味贡献显著的 CMP、GMP 和 UMP, 且该标准仅适用于鱼类, 对虾、蟹、贝类等水产品的适用性未经验证。尚晓睿等[20]以河豚鱼为测试对象进行核苷酸方法学考察, 魏娜等[27]建立了一种测定海马中核苷和核苷酸的方法, 刘云等[28]对 3 种贝类中核苷酸检测方法进行了优化, 现有文献报道的 HPLC 方法多聚焦于单一样品基质, 色谱条件和样品前处理的系统性考察不足, 忽略了色谱柱温度、提取液温度、提取静置时间、提取方式和提取次数等因素, 方法的适用性和基质抗干扰能力不足。

本研究采用 HPLC, 选取鱼、虾、贝、蟹等 10 余种样品基质, 对检测波长、流动相条件、色谱柱选择、提取溶剂及其温度、提取方式和次数等关键参数进行系统性考察与优化, 旨在建立一种快速准确测定水产品中 5 种呈味核苷酸含量的方法, 以期为水产品新鲜度、风味评价和品质分级提供技术支撑, 推动呈味核苷酸检测方法标准化进程, 对水产品品质控制及消费安全保障具有重要实践价值。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

鲫鱼(*Carassius auratus*)、基围虾(*Metapenaeus ensis*)、花甲(*Paphia undulata*)、中华绒螯蟹*(Eriocheir sinensis*)等在四川省成都白家水产品批发市场购买, 均为健康鲜活个体。

AMP ($C_{10}H_{14}N_5O_7P$, CAS: 61-19-8, 纯度 93.5%)、CMP ($C_9H_{14}N_3O_8P$, CAS: 63-37-6, 纯度 98.6%)、GMP ($C_{10}H_{14}N_5O_8P$, CAS: 85-32-5, 纯度 98.3%)、IMP ($C_{10}H_{13}N_4O_8P$, CAS: 131-99-7, 纯度 68.1%)、UMP ($C_9H_{13}N_2O_9P$, CAS: 58-97-9, 纯度 97.7%)标准物质(北京曼哈格生物科技有限公司); 高氯酸、氢氧化钾、四丁基硫酸氢铵、乙腈(色谱纯, 成都市科隆化学品有限公司); 水为 Milli-Q Gradient 去离子水。

Thermo U3000 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器, Chromeleon 工作站)、Syncronis C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国赛默飞世尔科技公司); CP224S 分析天平(感量 0.1 mg)、MS105DU/A 分析天平(感量 0.01 mg)(德国 Sartorius 公司); SF-TGL-18R 冷冻离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司); T18 均质仪(德国 IKA 公司); 安捷伦 ZORBAX SB-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国安捷伦科技有限公司); 岛津 AQ C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(日本岛津公司); 月旭 DLC AQ-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)[月旭科技(上海)股份有限公司]。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

本研究的材料取可食部分。鱼类去头、去磷, 取背部

和腹部肌肉; 虾去头、去壳、去肠腺后取肉; 贝壳去壳后取肉; 蟹类去壳、去性腺和肝脏后取样, 用均质仪打成肉糜, 置于密封袋中, 并于–18 ℃冰箱中冷冻保存

准确称取样品 2.5 g(精确至 0.000 1 g), 放入 100 mL 烧杯中, 加入 15 mL 5%高氯酸溶液, 混匀, 2~8 ℃冰箱静置 1 h。取出后均质 1 min, 匀浆液以 10000 r/min、4 ℃冷冻离心 5 min, 保留上清液, 下层沉淀重复上述操作, 合并两次上清液作为提取液, 用 3 mol/L 氢氧化钾溶液调节提取液的 pH 至 6.5, 用水定容至 50 mL, 混匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 备用。

1.2.2　标准溶液的配制

核苷酸标准储备溶液(1 mg/mL): 准确称 AMP、CMP、GMP、IMP 和 UMP 标准物质 100 mg, 分别置于 100 mL 容量瓶中, 用水溶解定容, 混匀, 2~8 ℃保存。

核苷酸混合标准中间溶液(100 μg/mL): 准确移取 5 种核苷酸标准储备溶液各 5.0 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用水稀释、定容, 混匀。

核苷酸混合标准系列工作溶液: 准确移取 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10.0 mL 标准中间溶液于 10 mL 容量瓶中, 用水稀释、定容, 配制成质量浓度分别为 1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0 μg/mL 核苷酸混合标准系列工作溶液。准确移取 1.0 mL 1.0 μg/mL 标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 配制成质量浓度为 0.1 μg/mL 标准工作溶液。

1.2.3　仪器工作条件

色谱柱: Syncronis C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μm); 柱温: 30 ℃; 检测波长: 254 nm; 流动相: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾(含 1.45 mmol/L 四丁基硫酸氢铵, pH=5.0)-乙腈(95:5, *V*:*V*); 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL。

1.2.4　标准系列工作溶液和试样溶液测定

按照上述色谱条件和方法, 进行 HPLC 分析, 以核苷酸的质量浓度为横坐标(*X*, μg/mL), 色谱峰面积为纵坐标(*Y*), 绘制标准工作曲线, 在相同的条件下测定样品, 从标准工作曲线上求得样品中 5 种核苷酸的含量。

1.3　数据处理

采用 Chromeleon 7 软件进行数据采集及定性定量分析; 用 Excel 2019 软件进行数据处理分析和图形绘制。

2　结果与分析

2.1　色谱条件的优化

2.1.1　检测波长的选择

采用二极管矩阵检测器在 190~400 nm 波长扫描得到 AMP、CMP、GMP、IMP 和 UMP 色谱峰的光谱图, 见图 1。由图 1 所示, 5 种核苷酸的紫外最大吸收波长分别为: AMP 207 nm 和 262 nm、IMP 198 nm 和 254 nm、GMP 191 nm 和 254 nm、CMP 198 nm 和 274 nm、UMP 206 nm 和 263 nm, 5 种核苷酸在波长 200 nm 和 254 nm 左右均有较大吸收峰, 由于很多干扰组分在 200 nm 有响应, 因此, 确定 5 种核苷酸的检测波长为 254 nm。

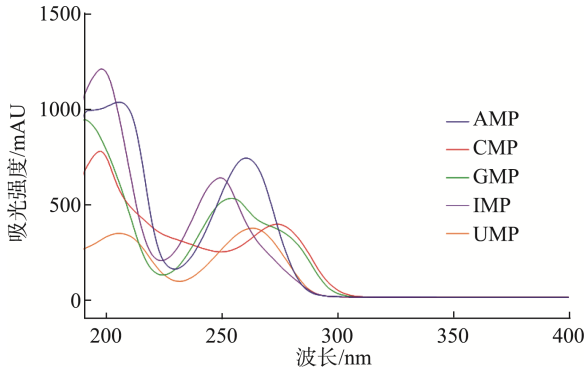

图 1　5 种核苷酸混合标准溶液光谱图

Fig.1　Spectra of the mixed standard solutions of 5 kinds of nucleotides

2.1.2　流动相的优化

(1)流动相组成的选择

核苷酸在色谱柱的分离中, 色谱柱固定相与核苷酸之间产生氢键作用, 易发生拖尾现象。分别考察 4 种流动相对 5 种核苷酸分离和峰形的影响, 具体色谱条件详见表 1, 色谱图见图 2。结果表明, 在乙酸条件下, 目标峰均有拖尾现象。在磷酸条件下, GMP 与 UMP 未达到分离要求。在磷酸-三乙胺条件下, 峰形较好, 但 GMP 与 IMP 未完全分离。使用磷酸二氢钾-四丁基硫酸氢铵流动相时, 5 种核苷酸达到基线分离的效果, 峰形对称, 无拖尾, 且分离良好, 故选择磷酸二氢钾-四丁基硫酸氢铵作为流动相。

表 1　流动相考察条件

Table 1　Investigation conditions of mobile phase

色谱条件	流动相组成	流动相体积比(*V*:*V*)	流速/(mL/min)
流动相 1	乙腈:0.1%乙酸水溶液	5:95	1.0
流动相 2	乙腈:0.1%磷酸水溶液	5:95	1.0
流动相 3	乙腈:0.01 mol/L 磷酸二氢钾+1.45 mmol 四丁基硫酸氢铵水溶液	5:95	1.0
流动相 4	乙腈:0.35%磷酸+0.72%三乙胺水溶液	5:95	1.0

(2)流动相 pH 的选择

由于磷酸根与离子对试剂在适合的 pH 下有较强的作用, 可以使分析物得到较好的分离, 使用四丁基硫酸氢铵, 5 种核苷酸能完全分离。核苷酸属于酸性离子型化合物, 在酸性条件下稳定, 流动相的酸碱度决定了被分析物的解离状态, 从而影响其与离子对的结合程度。因此, 改变流动相的 pH 是改善分离度的有效方法。考察流动相 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 时分离情况, 色谱图见图 3。结果表明, pH 越大, 目标峰分离效果越好, 出峰时间越靠后, 当 pH 为 5.0 时, 分离效果好, 在 30 min 左右完成目标化合物的分离。因此, 选择流动相的 pH 为 5.0。

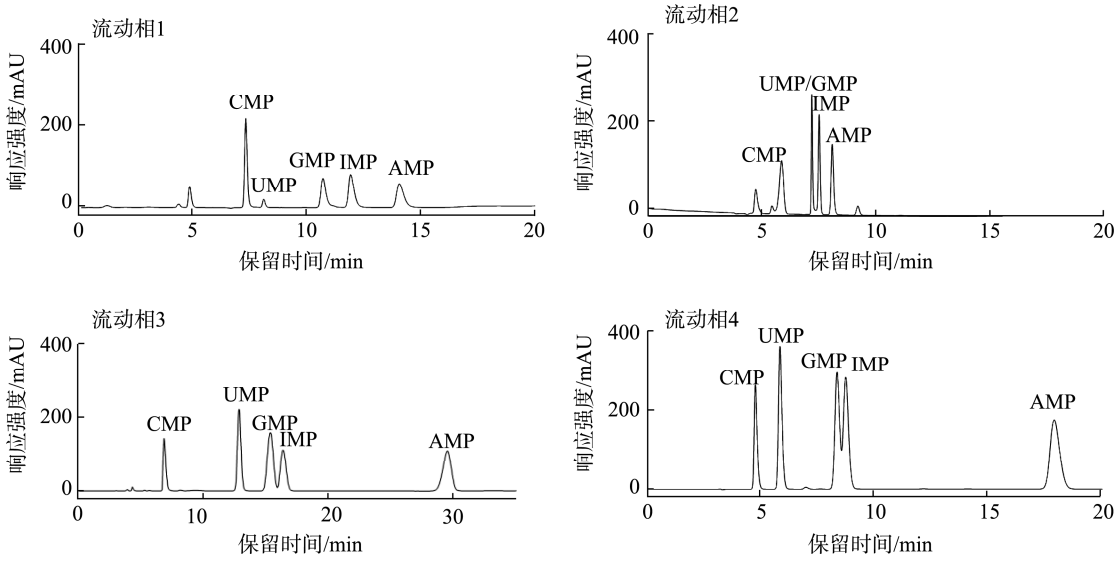

图 2 5 种核苷酸标准溶液在不同流动相条件下的色谱图

Fig.2 Chromatograms of 5 kinds of nucleotide standard solutions under different mobile phase conditions

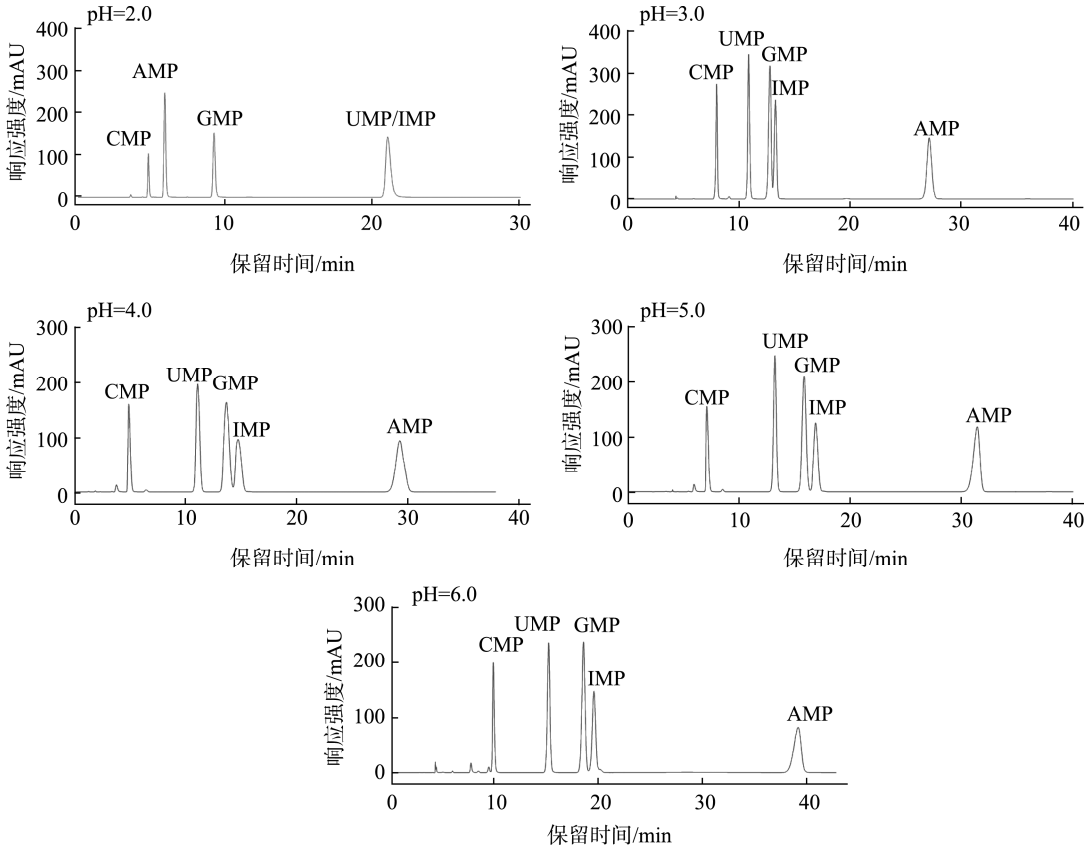

图 3 5 种核苷酸标准溶液在不同 pH 流动相条件下的色谱图

Fig.3 Chromatograms of 5 kinds of nucleotide standard solutions under different pH mobile phase conditions

2.1.3 色谱柱温度的选择

色谱柱温度对溶剂的溶解能力、色谱柱的性能、流动相的黏度都有一定的影响。本研究分别考察了色谱柱温度为 25、30、35 和 40 ℃时 5 种核苷酸的峰形和分离情况，色谱图见图 4。由图 4 可知，随着色谱柱温度的升高，目标化合物保留时间缩短，分离度变大，分离效果变好，在以上条件中，均峰形对称，满足实验要求。平衡分离度和分析时长，选择色谱柱温度确定为 30 ℃。

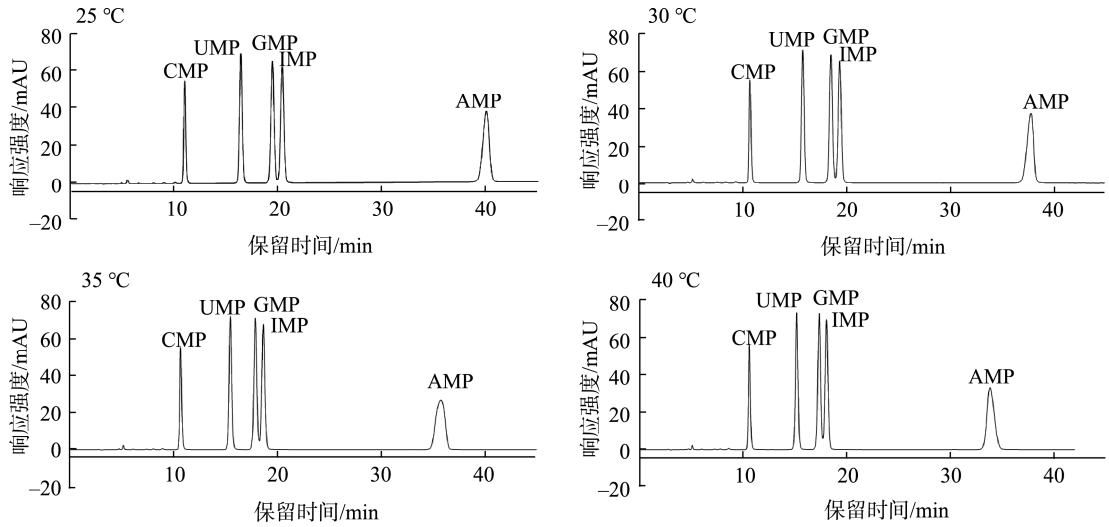

图 4　5 种核苷酸标准溶液在不同色谱柱温度条件下的色谱图

Fig.4　Chromatograms of 5 kinds of nucleotide standard solutions under different column temperature conditions

2.1.4　色谱柱的选择

根据相似相溶原理, 选择 C_{18} 柱分离 5 种核苷酸。按上述确认的色谱条件, 分别考察赛默飞 Syncronis C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、安捷伦 ZORBAX SB-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、岛津 AQ C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和月旭 DLC AQ-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)对 5 种核苷酸的保留情况, 分离效果见图 5。如图 5 所示, 4 个厂家 C_{18} 色谱柱得到的 5 种核苷酸色谱峰均峰形对称, 分离良好, 满足实验要求, 说明该条件具有较好的通用性和稳健性。

2.2　样品前处理条件的优化

2.2.1　提取溶剂的选择

由于水产品中含有高含量的蛋白质, 在核苷酸提取过程中, 为了减少蛋白质的干扰, 选择高氯酸水溶液作为提取溶剂。本研究选择鲫鱼、刀额新对虾、花甲和中华绒螯蟹作为样品基质, 分别选择质量浓度为 3%、5%、7%和 10%的高氯酸水溶液作为提取溶剂, 均质提取后, 按照上述色谱条件进行液相色谱分析, 结果见图 6。结果表明, 3%的高氯酸水溶液的结果低于 5%高氯酸水溶液, 5%、7%和 10%高氯酸水溶液结果基本一致, 可能是 3%的高氯酸水溶液未将样品中的蛋白质沉淀完全, 导致结果偏低。因此, 选择 5%的高氯酸水溶液作为提取溶剂。

2.2.2　提取温度的选择

由于水产品死后肌肉组织中的 ATP 易进行不可逆降解, 即 ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx, 因此要控制实验温度, 尽量减少核苷酸的降解[29–30]。本研究选择鲫鱼、刀额新对虾、花甲和中华绒螯蟹作为样品基质, 将 5%高氯酸水溶液恒温至 4、20、30 和 40 ℃作为提取试剂, 实验结果见图 7。结果表明, 在 4 ℃检测结果均高于 20、30 和 40 ℃, 因此选择样品提取温度为 4 ℃。

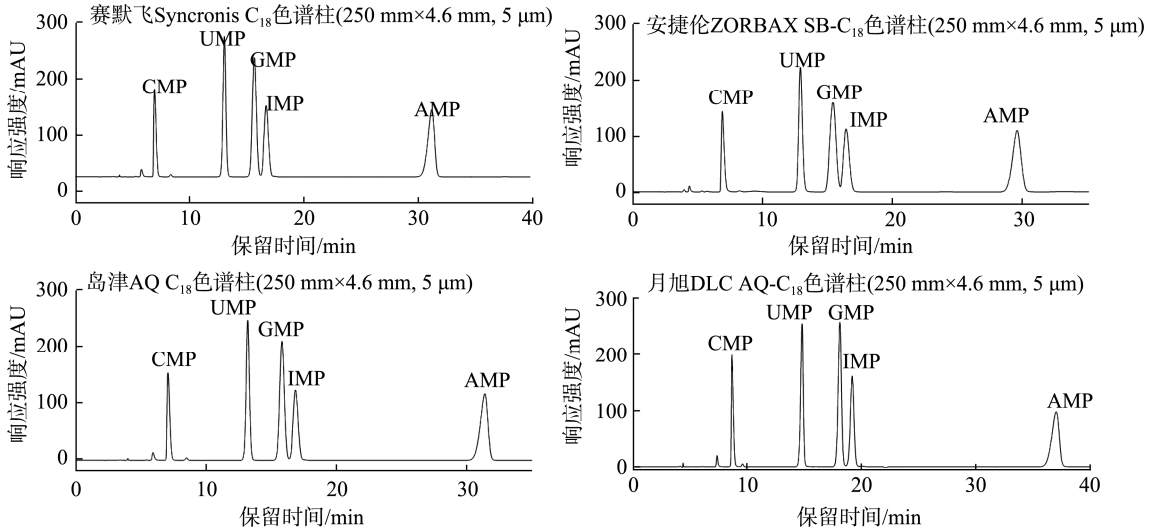

图 5　不同厂家色谱柱分离 5 种核苷酸标准溶液的色谱图

Fig.5　Chromatograms of 5 kinds of nucleotide standard solutions separated by chromatographic columns from different manufacturers

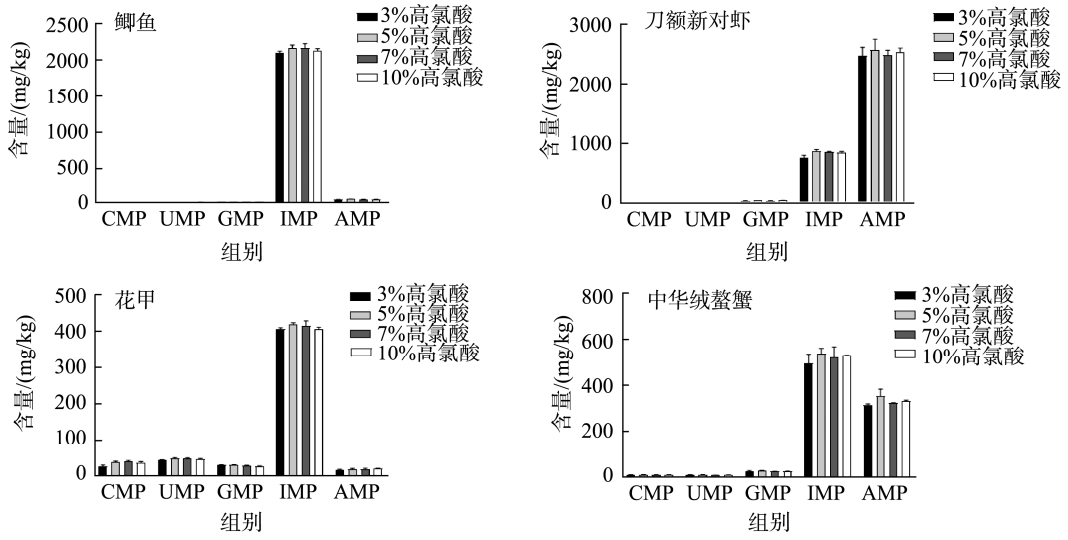

图 6 不同提取溶剂的考察结果(n=6)

Fig.6 Investigation results of different extraction solvents (n=6)

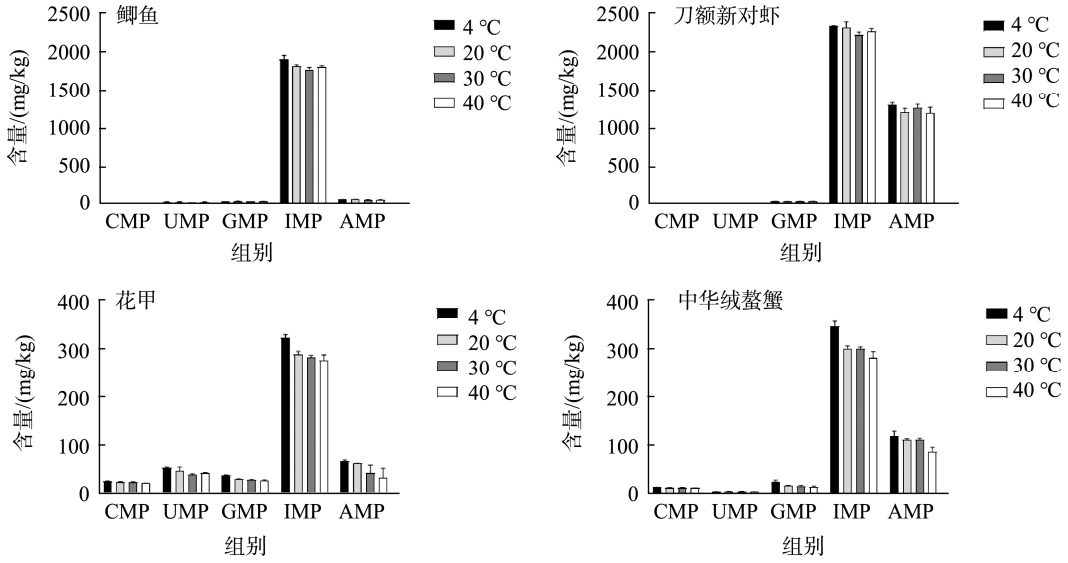

图 7 不同提取温度的考察结果(n=6)

Fig.7 Investigation results of different extraction temperatures (n=6)

2.2.3 4 ℃冰箱静置时间的选择

加入 5%的高氯酸水溶液进行 4 ℃冰箱静置，放置时间越长，样液温度越低，直至 4 ℃。本研究选择鲫鱼、刀额新对虾、花甲和中华绒螯蟹作为样品基质，在 4 ℃冰箱静置 0.5、1.0、1.5 和 2.0 h，放置结束后分别量取样液温度并按照上述色谱条件进行 HPLC 分析，结果见图 8。结果表明，放置 0.5 h 的样液温度未达到 4 ℃，且检测结果偏低；放置 1.0、1.5 和 2.0 h 的样液温度均为 4 ℃，且检测结果基本一致，因此，样液 4 ℃冰箱静置时间为 1.0 h。

2.2.4 提取方式的选择

本研究选择鲫鱼、刀额新对虾、花甲和中华绒螯蟹作为样品基质，分别考察均质 1 min、超声 30 min 和振荡 30 min 的提取效果并按照上述色谱条件进行 HPLC 分析，结果见图 9。结果表明，不同样品基质中均质 1 min 的结果高于超声 30 min 和振荡 30 min，且均质提取用时最短，因此选择均质 1 min 作为水产品中核苷酸的提取方式。

2.2.5 提取次数的选择

本研究选择鲫鱼、刀额新对虾、花甲和中华绒螯蟹作为样品基质，分别考察提取 1 次、2 次和 3 次的提取效果，结果见图 10。结果表明，不同样品基质中提取 2 次结果高于提取 1 次，且提取 2 次与 3 次结果基本一致，因此确定水产品中核苷酸检测提取次数为 2 次。

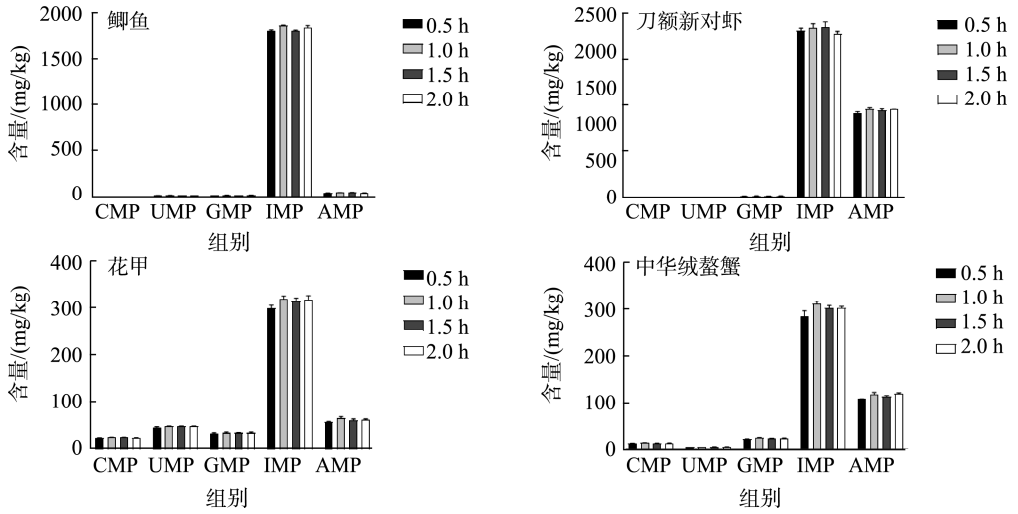

图 8　4 ℃冰箱静置时间的考察结果(n=6)

Fig.8　Investigation results of the static time of the refrigerator at 4 ℃ (n=6)

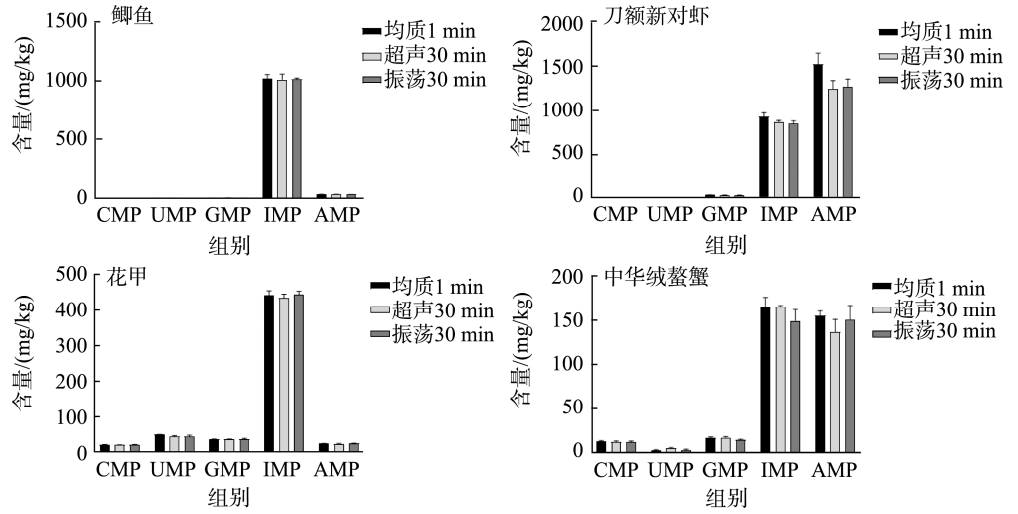

图 9　不同提取方式的考察结果(n=6)

Fig.9　Investigation results of different extraction methods (n=6)

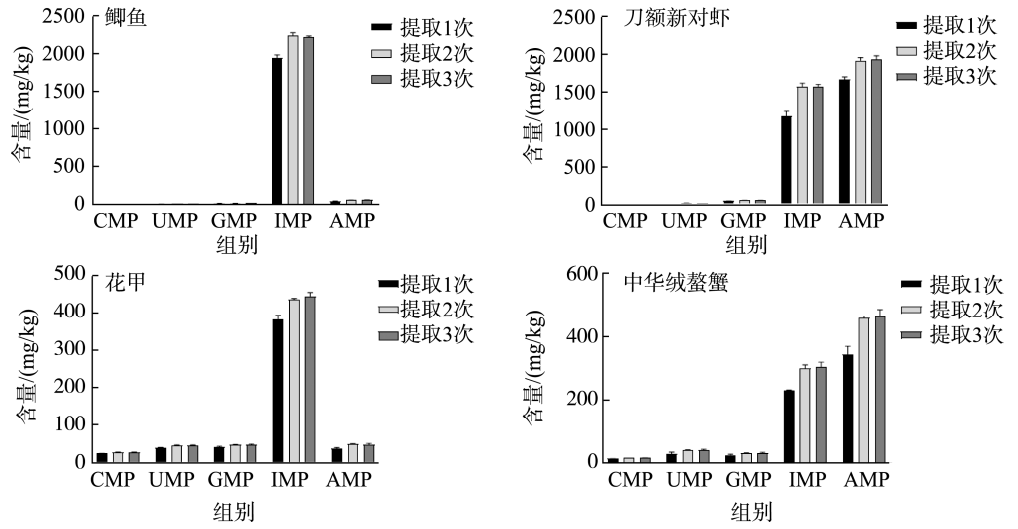

图 10　不同提取次数的考察结果(n=6)

Fig.10　Investigation results of different extraction times (n=6)

2.3 线性范围、检出限和定量限

按照仪器工作条件，对 5 种核苷酸混合标准系列工作溶液进样测定，以核苷酸的质量浓度为横坐标(X, μg/mL)，色谱峰面积为纵坐标(Y)，绘制标准工作曲线，5 种核苷酸在 0.1~100.0 μg/mL 范围内线性良好，相关系数均大于 0.999。将标准溶液连续稀释添加于空白样品中，测定目标化合物信号与噪音的比值，以 3 倍信噪比(S/N)作为检出限，以 10 倍信噪比(S/N)作为定量限，检出限和定量限分别为 1.0~2.0 mg/kg 和 3.0~6.0 mg/kg，结果见表 2。

2.4 精密度实验

对鲫鱼、刀额新对虾、花甲和中华绒螯蟹 4 个实际样品进行精密度实验，结果见表 3。由表 3 可知，4 种水产品样品中 5 种核苷酸测定结果 RSDs 为 2.00%~6.87%，均小于 10%，说明该方法重现性好，精密度高。

2.5 回收率

对鲫鱼、刀额新对虾、花甲和中华绒螯蟹进行加标回收实验，添加水平为本底值的 0.5 倍、1.0 倍、2.0 倍，测定批内(n=6)和批间(n=3)加标回收率和 RSDs，结果如表 4 所示。在上述确定的试样前处理和液相色谱条件下，水产品中 5 种核苷酸的平均回收率为 92.3%~105.6%，批内 RSDs 为 0.63%~7.90%，批间 RSDs 为 1.72%~7.34%。说明该方法针对不同类型、不同含量的水产品，在不同时间测定时，均有较好的精密度和准确度。

2.6 实际样品检测

为考察方法适用性，采集代表性水产品共 14 个，按照上述确定的条件和方法测定核苷酸的含量，结果见表 5，鲫鱼、刀额新对虾、花甲和中华绒螯蟹实际样品检测液相色谱图见图 11。结果显示，在确定的色谱条件下，不同水产品样品基线平稳，目标峰分离良好，无干扰峰，均检出不同含量的核苷酸组分。因此，所建立的标准方法适用于水产品中 5 种核苷酸含量的测定。

表 2 5 种核苷酸线性范围、回归方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantitation of 5 kinds of nucleotides

组分	线性范围/(μg/mL)	回归方程	相关系数(r^2)	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
CMP	0.1~100.0	Y=0.2484X–0.1788	0.9996	1.0	3.0
UMP	0.1~100.0	Y=0.5553X–0.4048	0.9997	1.0	3.0
GMP	0.1~100.0	Y=0.876X–0.5565	0.9994	1.0	3.0
IMP	0.1~100.0	Y=0.5441X–0.3638	0.9994	2.0	6.0
AMP	0.1~100.0	Y=0.7338X–0.5013	0.9995	2.0	6.0

表 3 方法精密度实验结果(n=6)

Table 3 Precision experimental results of the method (n=6)

样品	组分	平均值/(mg/kg)	RSDs/%	样品	组分	平均值/(mg/kg)	RSDs/%
鲫鱼	CMP	—	—	花甲	CMP	16.0	2.97
	UMP	10.2	3.59		UMP	41.8	3.87
	GMP	22.3	2.05		GMP	44.6	3.94
	IMP	1045	2.00		IMP	296	3.09
	AMP	45.2	4.06		AMP	41.9	5.00
刀额新对虾	CMP	—	—	中华绒螯蟹	CMP	8.00	2.94
	UMP	2.97	3.24		UMP	29.6	6.87
	GMP	39.2	2.21		GMP	14.5	3.55
	IMP	1023	3.40		IMP	93.2	3.33
	AMP	1690	2.95		AMP	318	4.95

注：相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)；—表示未检出，表 5 同。

表 4　加标回收实验结果

Table 4　Results of spiked recovery test

样品	组分	加标量/(mg/kg)	回收率/%	批内 RSDs/%	批间 RSDs/%
鲫鱼	CMP	6, 12, 24	103.3, 99.1, 102.1	7.35, 4.77, 1.97	5.65, 4.25, 4.23
	UMP	6, 12, 24	96.9, 95.2, 94.5	4.50, 3.38, 2.45	5.28, 3.23, 2.16
	GMP	10, 20, 40	99.1, 96.8, 92.3	5.68, 2.61, 1.42	5.15, 3.45, 1.72
	IMP	500, 1000, 2000	94.9, 98.8, 99.8	2.65, 4.32, 4.60	3.08, 5.22, 4.02
	AMP	20, 40, 80	98.8, 97.5, 97.4	4.39, 4.90, 4.68	4.69, 5.01, 4.60
刀额新对虾	CMP	6, 12, 24	96.0, 96.4, 96.8	4.78, 3.27, 3.63	4.14, 4.33, 7.34
	UMP	6, 12, 24	96.0, 98.6, 96.6	7.00, 5.23, 5.68	5.82, 4.96, 5.58
	GMP	20, 40, 80	98.5, 102.3, 97.6	0.89, 1.55, 0.84	2.58, 5.06, 2.37
	IMP	500, 1000, 2000	101.7, 99.7, 97.6	6.85, 2.63, 1.42	5.75, 6.53, 5.51
	AMP	800, 1600, 3200	96.2, 95.6, 95.7	3.71, 2.75, 2.89	4.32, 3.98, 4.07
花甲	CMP	40, 80, 160	95.9, 98.3, 97.3	1.19, 1.24, 1.52	3.16, 4.79, 3.88
	UMP	20, 40, 80	96.4, 95.4, 94.2	5.71, 1.83, 0.63	4.68, 3.17, 3.09
	GMP	20, 40, 80	97.0, 97.3, 96.5	2.72, 2.74, 1.18	4.95, 5.14, 4.88
	IMP	150, 300, 450	104.1, 98.8, 97.6	2.61, 1.49, 0.86	5.11, 4.24, 2.94
	AMP	20, 40, 80	95.7, 100.8, 103.0	5.95, 7.90, 6.01	4.39, 6.47, 5.73
中华绒螯蟹	CMP	400, 800, 1600	95.0, 98.6, 97.4	4.08, 6.02, 2.55	3.04, 6.10, 5.70
	UMP	15, 30, 60	93.2, 93.2, 92.5	1.53, 1.57, 3.79	2.01, 3.19, 2.68
	GMP	10, 20, 40	99.3, 101.3, 96.9	4.02, 5.09, 6.83	5.79, 6.42, 5.33
	IMP	50, 100, 200	103.7, 102.9, 105.6	3.32, 5.79, 1.94	4.23, 5.57, 2.07
	AMP	150, 300, 450	95.3, 95.0, 95.1	6.44, 3.64, 1.71	4.06, 3.71, 3.49

表 5　实际样品测定结果(mg/kg, *n*=6)

Table 5　Determination results of actual sample (mg/kg, *n*=6)

序号	样品	CMP	UMP	GMP	IMP	AMP
1	牛蛙(*Lithobates catesbeiana*)	22.50	—	8.81	7.47	28.40
2	花鲈(*Lateolabrax japonicus*)	—	7.10	12.20	2646.00	134.00
3	普通章鱼(*Octopus vulgaris*)	—	—	17.70	169.00	29.00
4	扇贝(*Pectinidae*)	—	5.71	15.70	103.00	344.00
5	牡蛎(*Ostreidae*)	—	11.60	28.00	427.00	100.00
6	克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)	—	—	17.80	1006.00	2691.00
7	鲍属(*Haliotis Genus*)	—	—	30.30	60.20	1014.00
8	虾蛄(*Mantis shrimp*)	—	—	54.10	201.00	90.40
9	斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)	—	—	99.40	168.00	60.70
10	花甲(*Paphia undulata*)	9.16	31.3	39.40	323.00	23.30
11	刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)	—	2.42	42.80	1267.00	2002.00
12	鲫鱼(*Carassius auratus*)	—	4.99	11.30	1070.00	51.30
13	青蟹(*Scylla*)	—	—	7.76	72.00	133.00
14	中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)	8.33	28.30	24.10	227.00	342.00

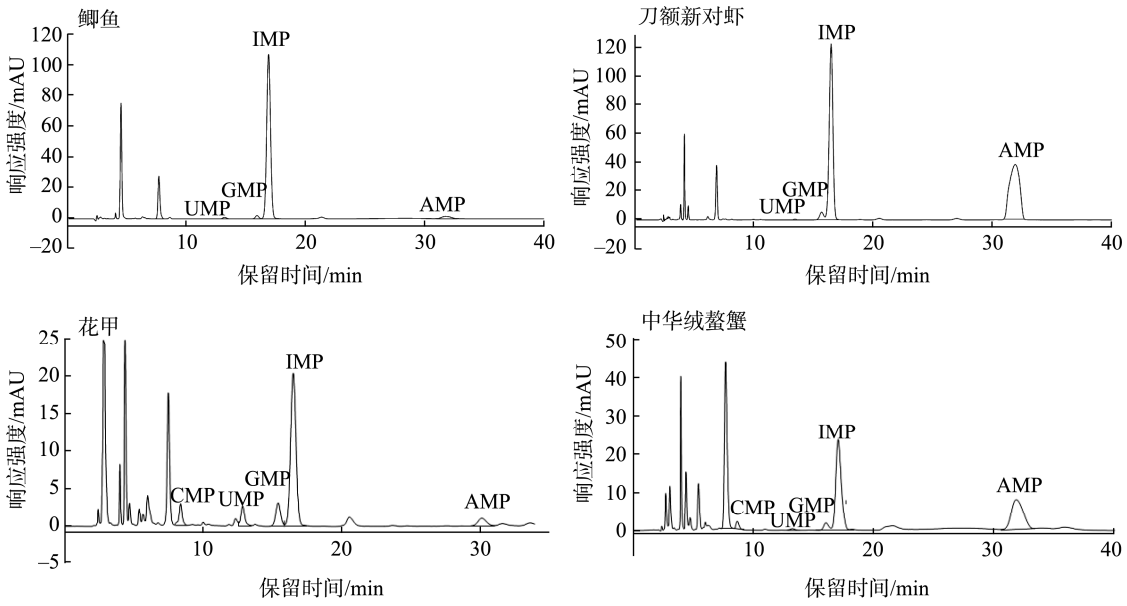

图 11 实际样品测定图谱

Fig.11 Determination chromatograms of actual sample

3 结 论

本研究建立了水产品中 5 种核苷酸的 HPLC 定性定量分析方法。通过系统性优化检测波长、流动相组成、色谱柱选择、提取溶剂、提取温度、提取方式和次数等关键参数, 方法在 0.1~100.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 检出限和定量限分别为 1.0~2.0 mg/kg 和 3.0~6.0 mg/kg, 3 个加标水平下回收率为 92.3%~105.6%, 批内批间 RSDs 均小于 10%。对 14 种代表性水产品的检测表明, 该方法具有高灵敏度、高精密度和抗基质干扰能力。本研究为水产品新鲜度评价、风味品质分级及质量控制提供了科学的方法基础, 为保障水产品安全、保鲜技术研发及营养学研究提供技术支持, 助力水产品产业健康发展。然而, 研究仍存在一定局限性, 样品基质覆盖不全, 后续研究将验证该方法在藻类及深海鱼类等的适用性, 扩充样本规模并建立水产品中核苷酸多组分含量数据库。

参考文献

[1] 国家统计局. 中国统计年鉴-2024[Z]. https://www.stats.gov.cn/sj/ndsj/
The National Bureau of Statistics. Statistical yearbook, China-2024 [Z]. https://www.stats.gov.cn/sj/ndsj/

[2] 穆迎春, 郭亚男, 何雅静, 等. 几种水产品营养与活性因子及品质评价研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2019, 9(6): 71–76.
MU YC, GUO YN, HE YJ, *et al*. Research progress on nutritional and active factors and quality evaluation of several aquatic products [J]. Fishery Quality and Standards in China, 2019, 9(6): 71–76.

[3] 李晖, 吴西梅, 邵义娟. 广东省代表性水产品氨基酸成分分析与营养价值评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(11): 254–261.
LI H, WU XM, SHAO YJ. Analysis of amino acid composition and nutritional value evaluation of representative aquatic products in Guangdong Province [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(11): 254–261.

[4] 张钦, 冉瑞玲, 易良键, 等. 水产品食用品质特征研究进展[J]. 食品安全导刊, 2024, 7: 136–139.
ZHANG Q, RAN RL, YI LJ, *et al*. Research progress on edible quality characteristics of aquatic products [J]. China Food Safety Magazine, 2024, 7: 136–139.

[5] 李桢桢, 尹明雨, 王红丽, 等. 水产品肌肉组织微观结构变化及其检测方法研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 278–286.
LI ZZ, YIN MY, WANG HL, *et al.* Microstructural change of muscle tissues of aquatic products and methods for its detection: A review [J]. Food Science, 2023, 44(9): 278–286.

[6] 黄鸾玉, 吴祥庆, 庞燕飞, 等. 主成分分析法综合评价水产品营养价值[J]. 食品科技, 2018, 43(2): 175–179.
HUANG LY, WU XQ, PANG YF, *et al*. Principal component analysis was used to comprehensively evaluate the nutritional value of aquatic products [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(2): 175–179.

[7] 刘源, 崔智勇, 周雪珂, 等. 水产品滋味研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(1): 22–29.
LIU Y, CUI ZY, ZHOU XK, *et al.* Research progress on taste of aquatic products [J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(1): 22–29.

[8] LI H, YAN F, QIAO JT, *et al*. Current progress in umami peptides from blue foods: Preparation, screening, evaluation, synergistic effects, and taste mechanism [J]. Trends in Food Science & Technology, 2024, 149: 104567.

[9] 辛然. 水产品中重要呈滋味物质同时定量方法的建立及其应用研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2022.
XIN R. Establishment and application of simultaneous quantitative method for important taste substances in aquatic products [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2022.

[10] HAJEB P, JINAP S. Umami taste components and their sources in Asian

foods [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(6) :778–791.

[11] MARUJI Y, SHIMIZU M, MURATA M, *et al*. Multiple taste functions of the umami substances in muscle extracts of yellowtail and bastard halibut [J]. Fisheries Science, 2010, 76: 521–528.

[12] 林怡秦, 陈秉彦, 王榕, 等. 鱼贝类水产鲜味肽的呈味特性、制备、筛选及加工过程呈味变化的研究进展[J]. 食品工业科技, 2025, 46(21): 464–474.
LIN YQ, CHEN BY, WANG R, *et al*. Research progress on flavor characteristics, preparation, screening and flavor changes during processing of umami-taste peptides from fish and shellfish [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(21): 464–474.

[13] LORD RC, JR GJT. Raman spectral studies of nucleic acids and related molecules—I ribonucleic acid derivatives [J]. Spectrochimica Acta Part A Molecular Spectroscopy, 1967, 23(9): 2551–2591.

[14] FUKE S, KONOSU S. Taste-active components in some foods: A review of Japanese research [J]. Physiology & Behavior, 1991, 49(5): 863–868.

[15] 郇思琪, 刘登勇, 王笑丹, 等. 食品中呈鲜味物质研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(21): 333–339.
XUN SQ, LIU DY, WANG XD, *et al*. Research progress on umami substances in food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(21): 333–339.

[16] YAMAGUCHI S. Measurement of the relative taste intensity of some *L*-*α*-amino acids and 5'-mudeotides [J]. Food Science, 1971(36): 846.

[17] ZHENG JY, TAO NP, GONG J, *et al*. Comparison of non-volatile taste-active compounds between the cooked meats of pre- and post-spawning Yangtze Coilia ectenes [J]. Fisheries Science, 2015, 81(3): 559–568.

[18] 张月, 喻雪莲, 田月月, 等. 紫外分光光度法与荧光光谱法探究呈味核苷酸与 EGCG 及其蛋白络合物的相互作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(23): 73–80.
ZHANG Y, YU XL, TIAN YY, *et al*. Ultraviolet spectrophotometry and fluorescence spectroscopy were used to explore the interaction of taste nucleotides with EGCG and its protein complex [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(23): 73–80.

[19] 丁晓静, 赵新颖, 陈亮. 毛细管电泳技术在乳制品营养与安全分析中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(17): 5820–5831.
DING XJ, ZHAO XX, CHEN L. Application of capillary electrophoresis in nutritional and safety analysis of dairy products [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(17): 5820–5831.

[20] 尚晓睿, 陈柔含, 邓波, 等. 高效液相色谱-紫外检测法同时测定水产品中 9 种呈味核苷酸[J]. 分析试验室, 2024, 43(12): 1763–1770.
SHANG XR, CHEN RH, DENG B, *et al*. Simultaneous determination of 9 odorant nucleotides in aquatic products by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection [J]. Analytical Laboratory, 2024, 43(12): 1763–1770.

[21] 陈柔含, 张维谊, 马颖清, 等. 高效液相色谱法同时测定畜禽产品中 9 种呈味核苷酸方法的建立和应用[J]. 农产品质量与安全, 2024, 3: 41–48.
CHEN RH, ZHANG WY, MA YQ, *et al*. Establishment and application of high performance liquid chromatography for simultaneous determination of nine flavor nucleotides in livestock and poultry products [J]. Agricultural Quality and Safety, 2024, 3: 41–48.

[22] 山广志, 宗艳平, 王晓, 等. 离子色谱法测定三磷酸腺苷二钠制剂中主成分及有关物质的含量[J]. 色谱, 2014, 32(11): 1275–1279.
SHAN GZ, ZONG YP, WANG X, *et al*. Determination of the content of principal components and related substances in the preparation of adenosine disodium triphosphate by ion chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2014, 32(11): 1275–1279.

[23] 薛彦伦, 王柏辉, 梁栋明, 等. 亲水/离子交换混合模式色谱法快速检测婴幼儿食品和乳品中核苷酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(2): 91–98.
XUE YL, WANG BH, LIANG DM, *et al.* Rapid determination of nucleotides content in infant formula and dairy product by mixed-mode hydrophilic interaction/ion exchange chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(2): 91–98.

[24] YE ML, PAN GW, HU ZY, *et al*. Determination of nucleotides in infant formula milk powder by ion chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28(9): 898–901.

[25] 安迈瑞, 刘阳, 梅英杰, 等. 超高效液相色谱-串联质谱优化特殊医学用途配方奶粉中 5 种核苷酸含量的测定方法[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(6):137–144.
AN MR, LIU Y, MEI YJ, *et al*. To optimize the determination of five nucleotides in formula milk powder for special medical use by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Research and Development, 2025, 46(6): 137–144.

[26] 陈旭晋, 陆宇阳, 曹佳, 等. 超高效液相色谱串联质谱测定大闸蟹中五种核苷酸[J]. 农业与技术, 2022, 42(8): 103–105.
CHEN XJ, LU YY, CAO J, *et al*. Determination of five nucleotides in hairy crabs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Agriculture and Technology, 2022, 42(8): 103–105.

[27] 魏娜, 徐汪伟, 魏晴, 等. HPLC 测定海马中核苷和核苷酸的含量[J]. 广州化工, 2015, 43(4): 128–130, 178.
WEI N, XU WW, WEI Q, *et al*. Determination of nucleosides and nucleotides in seahorse by HPLC [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2015, 43(4): 128–130, 178.

[28] 刘云, 宫向红, 徐英江, 等. 烟台近海 3 种贝类中呈味核苷酸和氨基酸的测定及比较分析[J]. 中国水产科学, 2014, 21(2): 351–360.
LIU Y, GONG XH, XU YJ, *et al*. Determination and comparative analysis of flavor nucleotides and amino acids in three shellfish species from coastal Yantai [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(2): 351–360.

[29] 谷文静, 金银哲, 金英善, 等. 水产品加工贮藏中 ATP 及其关联产物的变化概述[J]. 食品工业, 2020, 41(12): 252–257.
GU WJ, JIN YZ, JIN YS, *et al*. Overview of changes in ATP and its associated products during processing and storage of aquatic products [J]. Journal of Food Industry, 2020, 41(12): 252–25.

[30] 邱伟强, 杨雨微, 谢晶, 等. 超高压处理对凡纳滨对虾冷藏期间 ATP 降解途径及其关联产物蓄积的影响[J]. 水产学报, 2021, 45(7): 1162–1171.
QIU WQ, YANG YW, XIE J, *et al*. Effect of ultra-high pressure treatment on ATP degradation pathway and accumulation of associated products in *Litopenaeus vannamei* during cold storage [J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(7): 1162–1171.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)