

# 采用高效液相色谱法测定猪肉中的呈味核苷酸

温泉, 吴轶

(上海市食品研究所, 上海 200235)

**摘要:** 本文建立了猪肉中呈味核苷酸肌苷酸和鸟苷酸的高效液相色谱检测方法。以甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钠水溶液为流动相, 用 ZOBAX-NH<sub>2</sub> 色谱柱分离, 二极管阵列检测器检测, 检测波长为 260 nm。该方法线性范围为 1.00~100 μg/mL, 变异系数为 0.5%~3%, 加标平均回收率为 85%以上, 方法准确可靠, 精密度较高。

**关键词:** 肌苷酸; 鸟苷酸; 高效液相色谱

**文章编号:** 1673-9078(2010)1-117-3

## Determination of Flavor Nucleotides in Pork by HPLC

WEN Quan, WU Yi

(Shanghai Food Research Institute, Shanghai 200235, China)

**Abstract:** A quantitative assay for the determination of Inosine-5'-monophosphate (5'-IMP) and Guanosine-5-monophosphate (5'-GMP) in pork was established by high performance liquid chromatography (HPLC). The separation was performed on a ZOBAX-NH<sub>2</sub> column using methanol-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.05 mol/L) as mobile phase and using a photo-diode array detector as detector at 260 nm. The linear range of the method was 1.00~100 μg/mL with the RSD and average recovery of 0.5%~3% and 85%, respectively. The method was accuracy, sensitivity and feasibility to analyze the nucleotides in pork.

**Key words:** 5'-IMP; 5'-GMP; HPLC

肉制产品, 不仅要求肉产品有营养, 而且要求色、香、味俱全。近几十年来, 人们对食品的鲜味进行了广泛的研究, 鲜味与甜味、苦味、酸味、咸味一样同属于基本味, 是食品的一种重要风味<sup>[3]</sup>, 对肉类的鲜味贡献最大的化合物主要有两大类: 一类是以游离谷氨酸为代表的氨基酸类化合物, 如 L-谷氨酸钠(MSG, 俗称味精)、L-天门冬氨酸钠(MSA)、L-丙氨酸(L-Ala)、甘氨酸(Gly)<sup>[3]</sup>; 另外一类是以 5'-肌苷酸(Inosine-5'-mono-phosphate, 简称 IMP, 又称 5'-次黄嘌呤核苷酸), 5'-鸟苷酸(Guanosine-5-monophosphate, 简称 GMP, 又称 5'-鸟嘌呤核苷酸)为代表的 5'-核苷酸及其衍生物, 统称为核苷酸类鲜味料<sup>[3]</sup>。该两种物质在肉类食品中含量丰富, 不仅具有显著的增鲜作用, 而且对于肉类食品的各种滋味具一定的增减作用<sup>[2]</sup>。故测定肉类食品中肌苷酸、鸟苷酸含量对研究肉类食品风味及呈味物质之间的相互关系有着重要的意义。

目前, 国内外对不同动物体肉种, 如羊肉<sup>[2]</sup>、鸡肉<sup>[5]</sup>、虾肉<sup>[4]</sup>等核苷酸含量变化进行了大量研究, 而对

猪肉中呈味核苷酸研究相对较少。本论文采用了高效液相色谱法<sup>[1]</sup>对猪肉中肌苷酸和鸟苷酸进行定性和定量分析, 该方法前处理简单方便, 干扰小, 准确度高, 是一个易于推广的快速检测方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要仪器

Agilent 高效液相色谱仪, LC2000 型液相色谱仪, 离心机, 均质机。

#### 1.2 试剂

5%预冷高氯酸, KOH (1+1), 磷酸二氢钠(分析纯), 超纯水, 肌苷酸, 鸟苷酸标准品(SIGMA), 甲醇(色谱纯), 0.45 μm 滤膜。

#### 1.3 一般色谱条件

色谱柱: ZOBAX NH<sub>2</sub> (150 mm × 4.6 mm(i.d.), 10 μm或相当者); 柱温: 30 °C; 流动相: A为甲醇溶液, B为0.05 mol/L磷酸二氢钠溶液; 等度洗脱; 进样量: 10 μL; 检测波长: 260 nm。

#### 1.4 标准溶液的配制及标准曲线

分别配制肌苷酸和鸟苷酸的标准系列溶液(用 1+1 甲醇水溶液溶解定容) 1.00、5.00、10.0、20.0、50.0、100 μg/mL, 分别取 10 μL 进行液相色谱测定,

收稿日期: 2009-09-06

项目名称: 猪肉中呈味核苷酸的检测方法研究

作者简介: 温泉(1982-), 女, 硕士, 工程师, 从事食品质量监督检验研究

根据保留时间,以所测色谱的峰面积或峰高与其相应的肌苷酸,鸟苷酸浓度作图,并绘制标准工作曲线。

### 1.5 样品制备

猪肉活体宰杀,去除内脏、皮、肾,取肉眼,分别在4℃下冷藏0、6 h、12 h、18 h、24 h、30 h、36 h、42 h、48 h。

精确称取上述冷藏肉样5.00 g,置于50 mL塑料离心管中,加入10 mL 5%预冷的高氯酸,用高速均质机充分均质,以4000 r/min离心5 min,取上清液转入100 mL烧杯中,残渣用10 mL 5%高氯酸,振荡5 min,离心,合并上清液,用KOH(1+1)调pH至6.5,过滤至50 mL容量瓶中,用超纯水定容,摇匀,溶液过0.45 μm滤膜过滤,用HPLC进样分析,外标法定容。

### 1.6 结果计算

$$X = \frac{C \times V}{m \times 1000}$$

X-样品中肌苷酸或鸟苷酸的含量, g/kg; C-由工作曲线上查出的样品测定液中相当于肌苷酸或鸟苷酸的浓度, μg/ml; V-样品提取液的体积, ml; m-样品的质量, g。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱柱的确定

本论文选取了ZOBAX-XDB C18和ZOBAX-NH<sub>2</sub>色谱柱进行对比,结果如图1和图2。

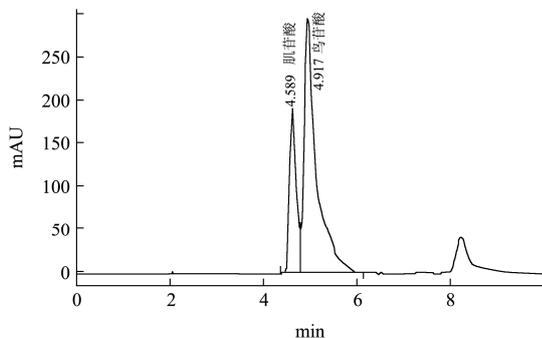


图1 ZOBAX-XDB C18 分析色谱图

Fig.1 chromatogram by ZOBAX-XDB C18

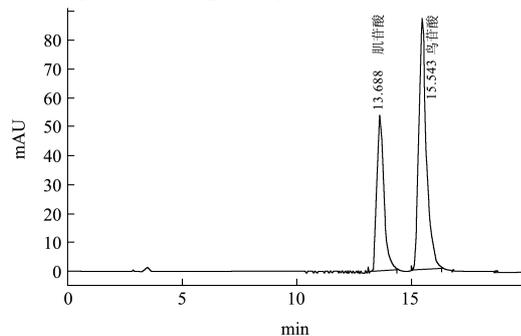


图2 ZOBAX-NH<sub>2</sub>分析色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of the sample by ZOBAX-NH<sub>2</sub>

### column

从图1和图2可知,ZOBAX-XDB C18不能将肌苷酸和鸟苷酸完全分离,且带有拖尾现象,而NH<sub>2</sub>柱不仅能将该两种物质分开,且峰形很好,能满足检测要求,故选用ZOBAX-NH<sub>2</sub>为色谱分析柱。

### 2.2 不同缓冲溶液对肌苷酸、鸟苷酸含量测定的影响

本文分别比较了0.05 mol/L磷酸、0.05 mol/L磷酸二氢钠、0.05 mol/L乙酸铵这三种缓冲溶液对其测定的影响,如图3~图5。

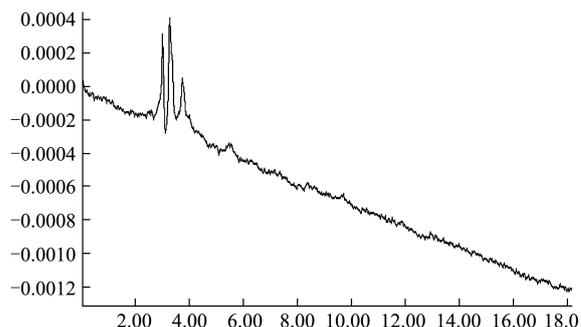


图3 0.05 mol/L 磷酸缓冲液的 ZOBAX-NH<sub>2</sub>分析色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of the sample by ZOBAX-NH<sub>2</sub> column using mobile phase containing 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

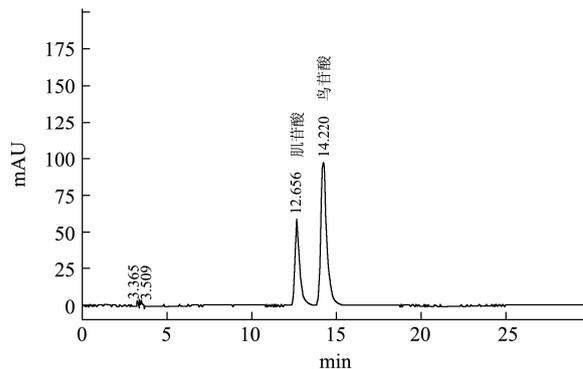


图4 0.05 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液的 ZOBAX-NH<sub>2</sub>分析色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of the sample by ZOBAX-NH<sub>2</sub> column using mobile phase containing 0.05% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

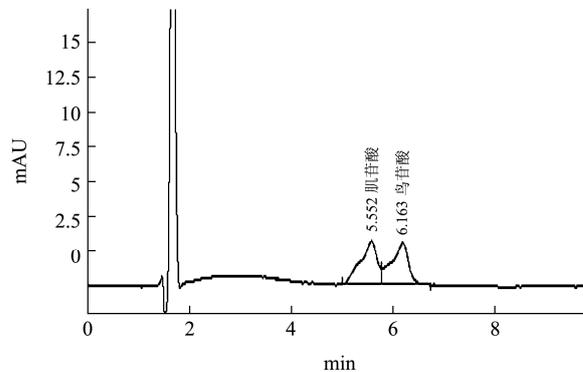


图5 0.05mol/L 乙酸铵缓冲液的 ZOBAX-NH<sub>2</sub>分析色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of the sample by ZOBAX-NH<sub>2</sub>

column using mobile phase containing 0.05% NH<sub>4</sub>CHCOO

从图可知,用磷酸缓冲液并未出峰,乙酸铵缓冲液可分离出目标物质,但分离度差,且峰型不好有拖尾现象,选用 0.05 mol/L 磷酸二氢钠不仅可将目标物完全分离,而且峰型很好。

### 2.3 不同比例的缓冲溶液对肌苷酸鸟苷酸含量测定的影响

试验比较了甲醇与 0.05 mol/L 磷酸二氢钠的比例分别为 5:95、15:85、30:70、40:60 下对肌苷酸和鸟苷酸测定的影响,结果发现,流动相对肌苷酸和鸟苷酸的出峰响应影响不大,只是在出峰时间略有差异,为了考虑试验的方便及防止柱压过高,本实验选择甲醇与 0.05 mol/L 磷酸二氢钠的比例为 5:95。

### 2.4 波长

试验对肌苷酸和鸟苷酸进行了波长扫描,发现肌苷酸和鸟苷酸在 260 nm 处均有较大的吸收峰,故选择检测波长为 260 nm,见光谱图 6 和图 7。在此波长下肌苷酸、鸟苷酸的峰型对称,且各个峰相互分离,没有出现重叠,各个峰达到了完全分离。

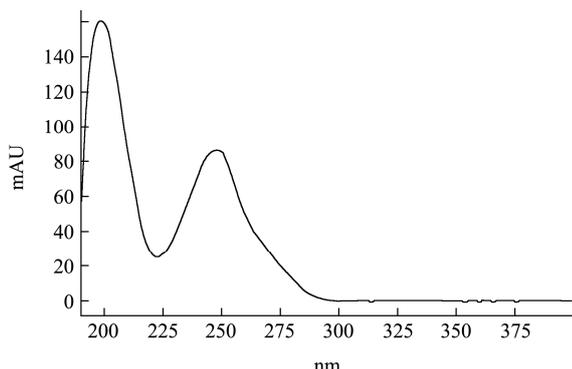


图 6 肌苷酸扫光光谱图

Fig.6 Scanning spectrum of 5'-IMP

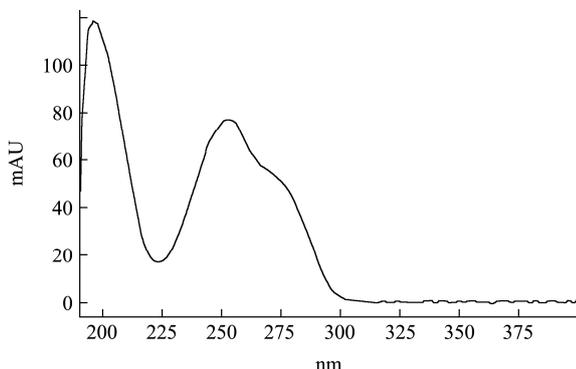


图 7 肌苷酸扫光光谱图

Fig.7 Scanning spectrum of 5'-GMP

## 2.5 方法性能指标

### 2.5.1 精密度

#### 2.5.1.1 仪器精密度

对同一标准样品肌苷酸 (10.7 μg/mL) 和鸟苷酸 (14.5 μg/mL) 分别进行了六次重复试验,结果如表 1。

表 1 精密度

Table 1 The precision of the method

物质	峰高						RSD(%)
	1	2	3	4	5	6	
肌苷酸	5024	5074	5062	5075	5019	5075	0.5
鸟苷酸	8125	8188	8238	8152	8122	8162	0.5

#### 2.5.1.2 样品重复性

表 2 重复性

Table 2 The Repeatability of the method

物质	样品含量 (g/kg)								RSD(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
肌苷酸	1.19	1.19	1.21	1.17	1.23	1.14	1.20	1.17	2.33

#### 2.5.2 线性

表 3 肌苷酸线性回归方程

Table 3 Linear regression of 5'-IMP

进样浓度(μg/mL)	0	5.35	10.7	21.4	53.5	107
峰面积	0	53.0	110	223	566	1150
回归方程	Y=10.85X-5.23, r=0.99996					

表 4 鸟苷酸线性回归方程

Table 4 Linear regression of 5'-GMP

进样浓度(μg/mL)	0	7.25	14.5	29.0	72.5	145
峰面积	0	98.6	206	41	1060	2140
回归方程	Y=14.8X-8.83, r=0.99997					

#### 2.5.3 检出限

用肌苷酸和鸟苷酸配制成相应浓度进样 10 μL,信噪比大于 3,液体试样方法检出限为 1.00 μg/mL,固体试样称样量为 5.00 g,则方法检出限为 0.01 g/kg。

#### 2.5.4 回收率

表 5 肌苷酸和鸟苷酸回收率测定

Table 5 The determination of recovery rate of 5'-IMP and 5'-GMP

样品名称	样品含量 (g/kg)	标准加入量 (μg)	实测标准量 (μg/mL)	实测标准量 (g/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
肌苷酸	1.08	0.0494	122	1.12	101%	101%
	1.08	0.0494	121	1.12	101%	
	1.08	0.196	138	1.26	91.8%	88.8%
	1.08	0.198	135	1.25	85.9%	
鸟苷酸	0.0345	0.0661	10.0	0.0923	87.4%	88.0%
	0.0345	0.0660	10.1	0.0930	88.6%	
	0.0345	0.183	23.1	0.212	97%	93.4%
	0.0345	0.189	22.0	0.204	89.9%	

(下转第 108 页)