

# 高效液相色谱法测定肌肉中肌苷酸的含量

吴莹莹, 李文英, 谢 明  
(中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094)

**摘 要:** 本试验改进了肌肉中肌苷酸测定的高效液相色谱法。采用 Waters Atlantis™ dC<sub>18</sub> 色谱柱 (5μm, Φ 4.6mm × 150mm), 以 50mmol/L pH6.5 甲酸铵缓冲液 (含 5% 甲醇) 为流动相, 流速 1ml/min; 柱温: 25℃; 紫外检测波长为 254nm。结果表明, 肌肉中肌苷酸含量测定结果的相对标准偏差为 1.11%, 回收率为 100.33%~101.67%。该方法可更准确的应用于生鲜肉类食品的肌苷酸含量的检测分析。

**关键词:** 高效液相色谱; 肌苷酸; 肌肉

## Determination of Inosinic Acid in Animal Muscles by HPLC

WU Ying-ying, LI Wen-ying, XIE Ming  
(Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The HPLC assay of inosinic acid in animal muscles was improved in this experiment. The separation was carried out with Waters Atlantis™ dC<sub>18</sub> analytical column (5μm, Φ 4.6mm × 150mm). The mobile phase consisted of 50mmol/L pH6.5 ammonium formate buffer and methanol (95:5, V/V). The flow rate was 1ml/min and UV detection was monitored at 254nm. The HPLC was performed at 25℃. The results showed that the relative standard deviation of inosinic acid in muscle was 1.11% and its recovery was 100.33%~101.67%. This method could be applied to assay inosinic acid content in raw meat food more accurately.

**Key words:** HPLC; inosinic acid; muscle

中图分类号: TS207.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2005)12-0191-03

肌苷酸(Inosinic acid, IMP), 即次黄嘌呤核苷酸, 是动物组织中重要的风味物质, 其与畜禽肉类食品鲜味的产生密切相关<sup>[1,2]</sup>。目前, 肌肉组织中肌苷酸含量被作为肉质评定的重要指标, 已广泛应用于各种动物肉类产品的品质评定, 其含量的高低可间接反映出肉类食品风味的优劣<sup>[3,4]</sup>。为此, 肌肉组织中肌苷酸含量测定方法的研究已显得尤为重要。目前测定肌肉组织中肌苷酸含量的方法有薄层层析法<sup>[5,6]</sup>、紫外分光光度法<sup>[7]</sup>和高效液相色谱法等。其中, 以磷酸一三乙胺缓冲溶液为流动相的反相液相色谱法已成为当前肌肉组织中肌苷酸含量测定的常用方法。然而, 该测定方法的相对标准偏差和回收率在已报道的试验研究中差异较大, 反映出该方法可能存在一定的缺陷<sup>[8~10]</sup>。因此, 本文在总结前人研究的基础上, 通过对流动相的改进, 旨在探讨肌肉组织中肌苷酸含量测定的精确度和准确性更高的反相液相色谱法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

取一定量新鲜肉鸡胸肌样品于 -20℃ 保存待用。

### 1.2 试剂

肌苷酸标准品 Sigma 公司, 含量 65.32%; 甲醇, 色谱纯 Fisher 公司; 甲酸铵, 分析纯 北京市西中化工厂; 高氯酸, 优级纯, 含量 70%~72% 北京南尚乐化工厂; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.3 主要仪器

Waters 2695 Alliance™ 高效液相色谱仪; Waters 2487 紫外检测器; 高速离心机; 高速组织匀浆机; 绞肉机。

### 1.4 主要溶液的配制

1.4.1 50mmol/L pH6.5 的甲酸铵缓冲溶液(流动相)的配制: 称 3.15g 甲酸铵于一大烧杯加 500ml 去离子水, 用 0.5mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH6.5, 定容至 1000ml。临用前用 0.45μm 滤膜过滤, 置超声水浴脱气 20min。

收稿日期: 2004-12-27

作者简介: 吴莹莹(1980-), 女, 研究实习员, 研究方向为色谱分析与应用。

1.4.2 1mg/ml 肌苷酸标准储备液: 准确称取 15.31mg 肌苷酸标准品(Sigma 公司, 含量 65.32%), 用 5% 甲醇水溶液定容至 10ml, 摇匀。

1.4.3 0.1mg/ml 肌苷酸标准工作液: 取上述储备液 1ml, 用 5% 甲醇水溶液定容至 10ml, 摇匀。临用前配制。

### 1.5 样品前处理

肌肉样品用绞肉机绞碎后称取 5g, 准确至 0.0001g, 置于 50ml 塑料离心管中, 分次加入共 20ml 6% 高氯酸, 用高速组织匀浆机匀浆。匀浆液以 8000r/min 离心 13min, 过滤于 100ml 三角瓶中。将沉淀物用 15ml 6% 高氯酸再次匀浆、离心, 合并两次上清液, 用 5.0mol/L 和 0.5mol/L NaOH 调 pH 至 6.5, 转移至 100ml 容量瓶中, 定容摇匀。测定前用 0.45μm 滤膜过滤后用于 HPLC 分析。

### 1.6 色谱条件

色谱柱: Waters Atlantis™ dC<sub>18</sub> 柱(5μm, Φ 4.6mm × 150mm); 流动相: 50mmol/L pH6.5 甲酸铵缓冲溶液(含 5% 甲醇); 流速: 1ml/min; 柱温: 25℃; 进样量: 5μl; 紫外检测波长: 254nm; 运行时间: 标准工作液运行 4min, 样品提取液运行 11min。标准溶液和样品提取液色谱图分别见图 1、2。

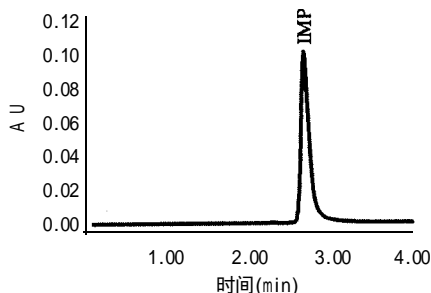


图1 标准溶液色谱图

Fig. 1 Standard chromatogram

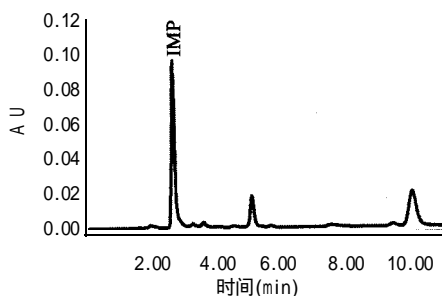


图2 样品提取液色谱图

Fig.2 Sample chromatogram

## 2 结果与分析

### 2.1 结果计算

样品提取液和肌苷酸标准工作液分别按 1.6 设定的

色谱条件进行分析, 根据两种溶液峰面积响应值计算样品中肌苷酸的含量(mg/g), 公式如下:

$$C_i = \frac{C_s A_i V}{A_s m}$$

式中:  $C_i$  - 样品中肌苷酸的含量(mg/g);

$C_s$  - 标准工作液中肌苷酸的浓度(mg/ml);

$A_i$  - 样品中肌苷酸所对应的峰面积响应值;

$A_s$  - 标准工作液中肌苷酸所对应的峰面积响应值;

$V$  - 样品提取液总体积(ml);

$m$  - 样品质量(g)。

### 2.2 标准曲线及线性范围

将 1mg/ml 肌苷酸标准储备液分别配制成 0.02、0.04、0.08、0.10、0.12、0.16mg/ml 的肌苷酸标准工作液, 按 1.6 设定色谱条件进行色谱分析, 以肌苷酸浓度为自变量(X), 相应的色谱峰面积响应值为依变量(Y), 建立标准曲线方程。结果表明: 在 0.02~0.16mg/ml 浓度范围内, 肌苷酸浓度与峰面积响应值之间具有良好的线性关系。回归方程为:  $Y = 7.78 \times 10^6 X - 1.90 \times 10^4$ , 相关系数  $R = 0.9998$ 。

### 2.3 精密度试验

一个肌肉组织样品取 5 份, 分别按 1.5 方法进行样品前处理和按 1.6 设定条件进行液相色谱分析。对肌苷酸的保留时间及含量的重现性进行分析。结果如表 1 所示。

表1 肌苷酸精密度试验 (n=5)

Table 1 Result of IMP precision

组分名称	平均值		相对标准偏差(%)	
	含量(mg/g)	保留时间(min)	含量	保留时间
肌苷酸	1.808	2.666	1.11	0.02

### 2.4 回收率试验

按 1.5 方法处理制备样品提取液, 从同一样品提取液中分别取两份, 各 5ml。其中一份用 5% 甲醇水溶液定容至 10ml, 另一份加入 2.5ml 0.24mg/ml 的肌苷酸标准溶液, 同样定容至 10ml。按 1.6 设定条件对加标前后溶液进行液相色谱分析。依据加标前后溶液肌苷酸浓度变化与加标量的百分比计算肌苷酸的回收率, 平行测定 6 次。结果见表 2。

表2 肌苷酸回收率实验 (n=6)

Table 2 Recovery of IMP

样品组号	加标前浓度 (mg/ml)	加标后浓度 (mg/ml)	加标量 (mg/ml)	回收率 (%)
1	0.0471	0.1078	0.06	101.17
2	0.0490	0.1092	0.06	100.33
3	0.0459	0.1068	0.06	101.50
4	0.0479	0.1085	0.06	101.00
5	0.0450	0.1057	0.06	101.17
6	0.0456	0.1066	0.06	101.67

# 混合胶束协同增敏光度法测奶粉中微量锌

杜娟

(襄樊学院化学与生物科学系, 湖北 襄樊 441053)

**摘 要:** 研究了混合表面活性剂 SDS-OP 对二甲酚橙(XO)光度法测锌(II)的增敏作用。在醋酸-醋酸钠缓冲体系中, 锌-二甲酚橙(XO)-SDS-OP 络合物呈紫红色, 络合物最大吸收波长为 580nm, 比不加表面活性剂时红移了 20nm。摩尔吸光系数达  $1.15 \times 10^5 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$ 。锌含量在  $0.0 \sim 28.0 \mu\text{g/ml}$  范围内符合比耳定律, 线性回归方程为:  $A = 0.295C + 0.001$ 。该法用于奶粉中锌含量的测定, 结果令人满意。

**关键词:** 混合表面活性剂; 二甲酚橙; 光度法; 锌离子

## Mixed Surfactants to Enhance Sensitizing Effect in Spectrophotometric Determination of Trace Zinc in Milk Powder

DU Juan

(Department of Chemistry and Biological Science, Xiangfan College, Xiangfan 441003, China)

**Abstract:** The sensitizing action of mixed surfactants (SDS-OP) in the in grain reaction of zinc and xylenol orange development

收稿日期: 2004-12-03

作者简介: 杜娟(1955-), 女, 副教授, 研究方向为光谱分析。

### 3 讨 论

与以往试验研究不同<sup>[8~10]</sup>, 本试验采用甲酸铵缓冲液作为流动相测定了肌肉中肌苷酸的含量。图 1、2 表明, 肌肉组织样品提取液的肌苷酸色谱峰峰形优异, 且与其它组分的色谱峰之间达到了良好的分离, 保留时间与标准溶液中的基本一致。由表 1、2 可知: 肌肉组织样品中肌苷酸保留时间和肌苷酸含量的相对标准偏差分别为 0.02%、1.11%, 回收率为 100.33%~101.67%, 表明该方法具有较好的精密度和较高的准确性, 达到甚至优于以往报道<sup>[8~10]</sup>。同时, 与以往试验研究采用的流动相相比, 本方法流动相中采用的甲酸铵为水溶性弱酸盐, 其化学特性可能更有利于延长色谱柱的使用寿命, 从而使本方法更适用于大量样品的测定。

### 4 结 论

本文采用甲酸铵缓冲液作为流动相进行反相液相色谱分析, 优化了色谱条件, 提高了肌肉组织样品中肌苷酸含量测定的精密度和准确性, 达到了准确、快速测定肌苷酸含量的目的, 可应用于生鲜肉类食品中肌苷酸含量的检测分析。

### 参考文献:

- [1] 李慧芳, 陈国宏, 吴信生, 等. 动物肌肉肌苷酸研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 1999, 16(4): 6-7.
- [2] 罗桂芬, 孙世铎, 陈继兰, 等. 肉类风味物质: 肌苷酸[J]. 中国家禽, 2004, 26(3): 41-43.
- [3] 苏一军, 李慧芳, 沈晓鹏, 等. 不同类型鸡肌肉肌苷酸含量分析和比较[J]. 中国家禽, 2002, 24(23): 9-10.
- [4] 李燕, 周培根, 戚晓玉. 肌苷酸和肌苷作为评价虾鲜度质量指标的研究[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(3): 264-267.
- [5] 刘望夷, 竺来发, 翁志发, 等. 肉用鸡肌肉中肌苷酸含量的比较[J]. 中国农业科学, 1980, (4): 79-83.
- [6] 苏淑贞, 吕志强, 庞新位, 等. 不同品种猪肉肌苷酸含量的测定[J]. 中国畜牧杂志, 1987, (6): 13-15.
- [7] 苏淑贞, 张正珊, 李群江, 等. 兔肉肌苷酸含量的测定[J]. 中国养兔杂志, 1990, (1): 27-28.
- [8] 李家胜, 陈民利. 高效液相色谱法测定畜禽肌肉中的肌苷酸含量[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(3): 295-296.
- [9] 裘立群, 刘华琳, 黄化成. 高效液相法快速测定畜禽肌肉中肌苷酸含量[J]. 山东畜牧兽医, 2002, (1): 23-23.
- [10] 宋焕禄, 张建, 赵环环. 几种鸡肌肉中肌苷酸(IMP)的测定[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 103-105.