

参考文献

- 1 McCor J M et al. J Biol Chem. 1969, 244: 6049.
- 2 Hill R D. Austral J Dairy Technol. 1975, 30: 26.
- 3 Hicks C L et al. J Dairy Sci 1975, 58: 796.
- 4 Asadal K. Agric Biol Chem. 1976, 40: 1659.
- 5 袁勤生. 中国药学杂志. 1991, 26(8): 456.
- 6 荻原义秀. 日本国特许厅. 特许公报. 1985, 昭 60-54035
- 7 小岛弘之. 日本国特许厅. 公开特许公报. 1989, (A) 平 01-242509.
- 8 冯启浩. 食品工业. 1992, (4): 35.
- 9 冯启浩. 全国食品添加剂通讯. 1992, (3): 42.
- 10 Holbrook J et al. J Dairy Sci. 1978, 61: 1072.
- 11 谢卫化等. 医药工业. 1988, 19 (5): 217.

高效液相色谱法测定食品中核苷酸的含量

张燕婉 鲁红军 王津生 中国肉类食品综合研究中心 100075

摘 要 食品中存在的部分核苷酸 (IMP、GMP、AMP 等) 是食品中重要的鲜味物质, 采用离子交换液相色谱法, 以 KH_2PO_4 溶液为流动相, 在 260 nm 处进行检测, 能将这几种游离的呈味核苷酸很好的分离, 并对几种有代表性的食品进行了方法验证, 实验的结果表明, 添加标准的平均回收率在: 99.96~101.0 之间, 变异系数 CV 在 1.66%~4.74% 之间, 方法的精密度和准确度都较高, 是食品风味研究中一种较理想的核苷酸分析技术。

关键词 核苷酸 高效液相色谱 食品风味

Abstract Flavour nucleotides (5'-IMP, AMP, GMP, UMP) content in food was determined by high performance liquid chromatography using an ion-exchange column, Shimadzu ISA-07/s2504 (4.6 mm×25 cm) and a UV detector at 260 nm and 0.2 mol/L KH_2PO_4 solution (PH4.50) as eluent. The method is simple, rapid, sensitive and reproducible. The calibration graph was liner in the range of 0~0.5 μg . The recovery of nucleotides was over 95% by the standard addition method. The mean composition and standard deviation for the flavour nucleotides composition of certain foods are given.

Key word Nucleotides High-performance liquid chromatography Food flavour

食品中的鲜味物质除了以谷氨酸钠 (MSG) 为代表的 L- α -氨基酸类、酰胺、肽成分以外, 还包括以 5'-肌苷酸 (IMP) 和 5'-鸟苷酸 (GMP) 二钠盐为主的核苷酸类 (新味精)。这些呈味核苷酸, 不仅具有显著的增鲜作用, 而且对于动物性食品的各种滋味也有一定的增减作用。我国对于食品风味的研究工作近几年才开始起步, 风味物质的分析技术还正在建立和不断的完善。所以研究和探索测定食品中核苷酸含量的分析方法对食品风味的研究工作具有重要的意义。目前国内外测定核苷酸的方法, 主要分为离子交换液相色谱法^[1], 反相液相色谱法^[2], 和近几年才兴建的高效毛细管电泳法^[3]。高效毛细管电泳法具有很高的分离效率, 能将各种

核苷酸很好的分离, 但目前这种新型仪器主要靠进口, 价格昂贵, 使用这种仪器受到一定条件的限制; 反相液相色谱法, 具有快速, 操作简便的优点, 但分离的核苷酸种类有限, 只限于分析某些食品中的部分呈味核苷酸, 方法也有一定的局限性; 离子交换色谱法具有较高的分离效率, 尤其对于核苷酸、氨基酸这些生物体中的兼性离子化合物, 能很好地将其分离。虽然离子交换色谱法需要对分离柱进行平衡 (再生), 分析时间比较长, 但它仍然是目前生物学、医学和食品研究工作中主要使用而理想的分析技术。本文就是采用离子交换液相色谱法, 分析食品中几种主要的呈味核苷酸, 验证实验表明, 本方法具有较高的精密度和准确度, 适用

于食品的核苷酸分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪 LC-4A, SPD-2AS 紫外—可见分光光度检测器。

标准品: 5'-肌苷酸钠 (5'-IMP)、5'-鸟苷酸钠 (5'-GMP)、5'-尿苷酸钠 (5'-UMP) 5'-胞苷酸钠 (5'-CMP) 5'-腺苷酸钠 (5'-AMP) 和次黄嘌呤均系日本セマサ醤油株式会社生产。

试剂: KH_2PO_4 为优级纯

HClO_4 为分析纯

1.2 样品制备

市售的新鲜生猪肉、鸡肉、海虾和脱水香菇修整后绞碎, 混匀。称取适量放入 100 ml 烧杯中, 加入冷的 5% HClO_4 溶液约 30 ml, 混匀, 4℃ 冰箱放置 1 h。取出后, 均质, 将匀浆液移入 50 ml 容量瓶中, 用 5% HClO_4 溶液定容。纸过滤, 取滤液 5.0 ml, 移入 10 ml 容量瓶中, 用 3 mol/L KOH 溶液调 pH 到中性, 用水定容到刻度。离心, 上清液用 0.45 μ 的水系滤膜过滤, 滤液上 HPLC 仪分析。

1.3 色谱条件

色谱柱: 岛津 LC 用 ISA-07/S 2504 离子交换柱, $\phi 4.0 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$ 。

柱温: 60℃

流动相: 0.2 mol/L KH_2PO_4 溶液, pH4.50

流速: 1.5 ml/min

检测波长: 260 nm

2 结果与讨论

2.1 标准图谱

图 1a 和 b 分别表示标准器及海虾肉样品色谱图。

2.2 标准曲线

5'-AMP、GMP、UMP、IMP 均以 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 μg 不同浓度的混合液分别进样, 计算峰面积和含量的回归方程见表 1, 标准曲线见图 2。

2.3 回收率和重现性

实验结果如表 2 和表 3 所示。可见回收率和重现性都较好, 说明本方法的精密度和准确度都较高。

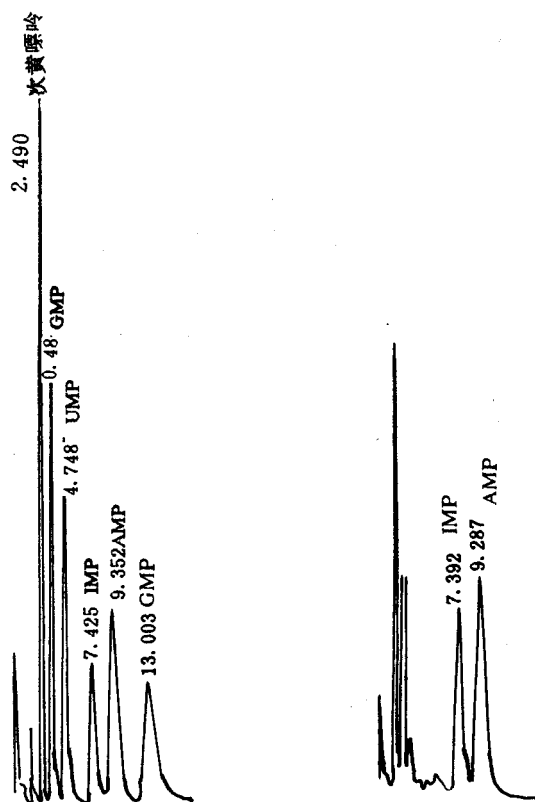


图 1 标准品色谱图(a)和海虾肉样品色谱图(b)

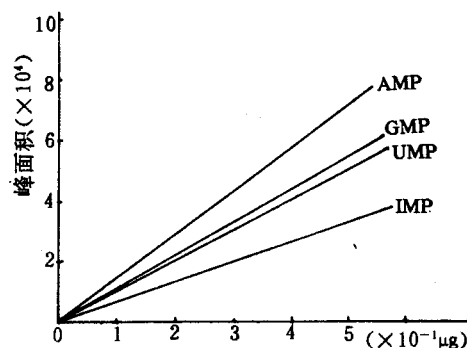


图 2 标准曲线

表 1 AMP、GMP、UMP、IMP 回归分析结果

	AMP	GMP	UMP	IMP
回归方程	$Y=1.84 \times 10^5 X - 1.41 \times 10^3$	$Y=1.46 \times 10^5 X - 4.12 \times 10^3$	$Y=1.40 \times 10^5 X - 1.99 \times 10^3$	$Y=9.15 \times 10^4 X - 1.86 \times 10^3$
相关系数	$r=0.9995$	$r=0.9981$	$r=0.9988$	$r=0.9988$

表 2 回收试验结果

	IMP			AMP			GMP		
加入量(mg)	1.000	3.000	5.000	1.000	3.000	5.000	1.000	3.000	5.000
(n=3)									
回收量(mg)	1.031	2.975	5.04	1.019	2.979	4.941	0.9497	3.015	5.220
回收率(%)	103.1	99.1	100.8	101.9	99.30	98.82	94.97	100.5	104.4
平均回收率	101.±1.97			100.0±1.66			99.96±4.74		
(n=9)	CV=1.95 (%)			CV=1.66 (%)			CV=4.74 (%)		

结果以均值±SD 表示

表 3 四种食品中核苷酸含量

	IMP	AMP	GMP	UMP
脱水香菇	—	23.27±0.85	48.72±0.98	33.35±1.58
鲜猪肉	84.53±1.38	4.304±0.23	—	—
鲜海虾	202.9±7.73	116.2±4.15	—	—
生鸡肉	116.9±1.45	5.85±0.12	3.38±0.082	—

结果以均匀值±SD 表示 (n=4) “—” 是未检出

2.4 讨论

2.4.1 色谱条件的选择

离子交换色谱的流动相是进行离子交换必需的各种盐溶液、缓冲剂, 它们对分离样品具有合适的溶解度。流动相的组成、离子强度和 pH, 影响溶质保留和分离选择。本方法选用的 KH_2PO_4 水溶液是具有良好的溶剂化和离子化特性的盐溶液, 适用于岛津 ISA-07/S2504 柱, 但必须选择合适的溶剂强度和 pH 值。增加溶剂强度, 流动相离子浓度提高, 加速了离子交换基团的竞争交换, 使样品保留值降低, 溶质 k 值减小, 分析加快。通过实验, 我们选择了 0.2 mol/L 的 KH_2PO_4 溶液作为流动相, 它既能很好将各种呈味核苷酸分离, 又能较快地完成分析周期, 准确的定量。改变流动相的 pH 值, 能控制离子交换色谱的溶质保留, 影响色谱的酸、碱平衡和样品的解离度。我们使用的是阴离子交换柱, 分离的对象——核苷酸为有机酸 [HA]。随流动相 pH 降低, 酸的解离被抑制, 保留降低; 而 pH 升高时, 核苷酸解离, A^- 离子与固定相作用增强, 保留值增加。在我们的实验中, 当流动相的 pH 大于 4.5 时, 部分核苷酸的

保留值变大, 分离变差, 这是由于在阴离子交换色谱中不同核苷酸保留值随 pH 值的变化而不同^[4], 如图 3 的研究结果说明, AMP 受 pH 值影响较大, 而 UMP、GMP 影响较小。我们通过实验, 选择了 pH=4.50 的 0.2 mol/L KH_2PO_4 溶液作为流动相, 分离核苷酸。另外, 我们采用 60℃ 柱温进行分析, 这不仅提高了柱效, 还由于升温降低了柱内的传质阻力, 加速了离子交换平衡, 使流动相粘度降低, 加快了分析速度。

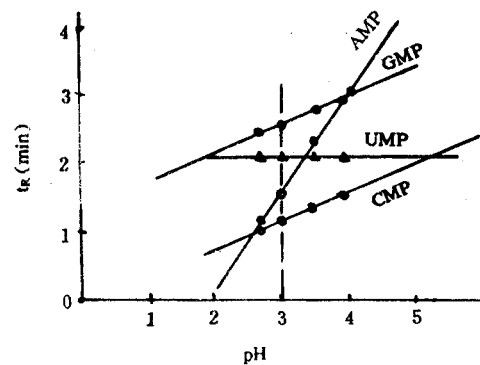


图3 在阴离子交换色谱中不同核苷酸保留值随 pH 的变化

2.4.2 样品预处理条件的选择

本方法选用的样品预处理技术, 是在前人比较研究的基础上建立起来的^[5]。样品预处理方法不仅操作简单、安全, 而且很适用于 HPLC 法分析食品中的核苷酸, 尤其对动物性食品更加适用。由于预处理步骤少, 减少了由于样品处理带来的组分损失, 使此法能够获得满意的回收率。

2.4.3 食品中大多数呈味核苷酸为-磷酸核苷酸, 使用阴离子交换柱分离, 洗脱的顺序是先将一磷酸洗脱下来, 其次是二磷酸、三磷酸。这样, 可以只分析我们需要的一磷酸核苷酸, 缩短了分析时间。若要分析全部的游离核苷酸, 则需要浓度梯度洗脱。本方法虽然只分析一磷酸的核苷酸, 但由于食品中常同时存在其它种核

苷酸, 会与离子交换剂(固定相)作用, 影响柱效, 故需要对分离柱再生, 而使色谱分析得到良好的重现性。

参考文献

- 1 Richard A. et al. The performance of microparticle chemically-bonded anion-exchange resins in the analysis of nucleotides. J. Chromatogr. 1975, 112, 651~662.
- 2 C. Horvath W. Melander and I. Mollnar. Liquid Chromatography of Ionogenic Substances with Nonpolar Stationary Phases. Anal. Chem. 1977, 49 (1): 142.
- 3 Takao Tsoda et al. Separation of Nucleotides by High-Voltage Capillary Electrophoresis J. Appl. Biochem. 1983, 5: 330~336.
- 4 达世禄. 色谱学导论. 武汉大学出版社. 1988, 416.
- 5 Herman W. Shmukler. The Rapid chromatographic Analysis of the Free Nucleotides from Rat Brain. J. Chromatogr. Sci. 1972, (10): 38~40.

杨梅的速冻工艺和质量要素

王新龙 浙江省水产加工储运公司 315020

叶南山 宁波市美乐门商城

吴正泉 宁波市罐头食品厂

于娅逸 宁波市冷藏公司

摘要 以生产实践和理论分析为基础, 详细论述了用单体快速冻结法加工新鲜杨梅的优越性及其工艺流程, 和影响该冻品感官质量、营养质量的诸多因素。

关键词 速冻工艺 质量

Abstract On the basis of production practice and theoretical analysis, this paper elaborates in detail the advantage and processing technology of individual quick freezing method applied to fresh red bayberry, as well as the various factors which affect the sensational quality and the nutritive quality of this frozen food.

Key words Red Bayberry Technology Quick Freezing Quality

杨梅是人们较喜爱、上市较早的水果。杨梅不仅色泽美、风味别致, 而且营养丰富。杨梅含水分79.6%、蛋白质0.9%、糖分18.9%, 以及一定的钙、磷、铁、钾等矿物质和维生素C、硫胺素、核黄素、胡萝卜素、有机酸等。近年来, 杨梅果树不断改良, 产量不断提高, 深受广大消费者欢迎。然而杨梅多汁、娇嫩、季节性强, 耐藏性极差, 一般常温下只能保存2~3天, 冷藏亦只能保存1周左右。就是运用高浓度CO₂处理, 辐射处理及气调贮藏等措施, 虽可减少腐烂率, 但贮藏期仍不超过3~4周, 故新鲜杨梅的市场供应期很短。采用速冻方法保藏杨梅可大大延长贮藏期, 即通过流态化等形式冻结后, 并大-18℃温度条件下贮藏, 则藏期可延长一年之久。

1 速冻工艺

1.1 杨梅的腐败变质主要是酶、微生物及氧化作用所致, 它们都随着温度下降而减弱, 抑制微生物繁殖的临界温度为-12℃。为了充分抑制酶与非酶作用, 长期保藏杨梅, 必须将温度降至-12℃以下, 考虑能源消耗及杨梅一年一熟特点, 贮藏期能达一年已足能满足要求。我们通过低温速冻方法, 使杨梅中绝大部分水分在低温下冻成冰, 这样就能有效地抑制酶与微生物的作用。

1.2 快速冻结的优点

杨梅中的水分由细胞内水分和细胞外水分组成。细胞外水蒸汽张力比细胞内小, 水分中溶解的盐类浓度也较小, 冰点较高, 故在冻结过