

HPLC 测定呈味核苷酸二钠中 IMP 和 GMP 的含量

李阳杰¹, 龚志强^{2*}, 黄敏²

(1. 郑州华信学院, 郑州 451100; 2. 广西中医学院赛恩斯新医药学院, 南宁 530222)

[摘要] 目的: 建立呈味核苷酸二钠的含量测定方法。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(含 0.005 mol·L⁻¹ 四丁基溴化铵及 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾)(2:98), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 250 nm, 柱温常温。结果: 5'-肌苷酸二钠(IMP)的线性范围为 0.50 ~ 4.00 μg($r=0.9999$), 平均加样回收率为 99.12% ($n=6$), RSD 0.56%; 5'-鸟苷酸二钠(GMP)的线性范围为 0.50 ~ 4.00 μg($r=0.9999$), 平均加样回收率 99.18% ($n=6$), RSD 0.45%。结论: 该方法灵敏度高、重复性好, 可用于呈味核苷酸二钠的含量检测。

[关键词] 高效液相色谱法; 5'-肌苷酸二钠; 5'-鸟苷酸二钠; 呈味核苷酸二钠

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0116-03

Determination of IMP and GMP in Flavor Nucleotides by HPLC

Li Yang-Jie¹, Gong Zhi-Qiang^{2*}, Huang Min²

(1. Zhengzhou Huaxin University, Zhengzhou 451100, China; 2. Faculty of Chinese Medical Science Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530222, China)

[Abstract] **Objective:** Establish a method of determination for flavor nucleotides. **Method:** Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was employed. Acetonitrile-water (containing 0.005 mol·L⁻¹ tetrabutyl ammonium bromide and 0.05 mol·L⁻¹ monobasic potassium phosphate) (2:98) was used as mobile phase, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Ultraviolet detection wave length was 250 nm. **Result:** The IMP (disodium inosinate) was linear in the concentration range of 0.50-4.00 μg ($r=0.9999$). The average recovery rate ($n=$

[收稿日期] 20110930(010)

[第一作者] 李阳杰, 硕士研究生, 从事药事管理学和药学质量控制研究

[通讯作者] * 龚志强, 硕士研究生, 从事药物化学及药学质量控制研究, E-mail: gong150645259@126.com

和水浴加热回流, 结果显示 75% 乙醇水浴加热回流提取可以将大多数成分提取出来, 且各成分含量较高, 故确定 75% 乙醇回流为提取方案。

实验表明, 流动相的组成和比例对样品峰的峰形和比例都有很大的影响, 甲醇-水, 甲醇-磷酸做流动相时, 峰形差, 分离差, 将甲醇换为乙腈后, 峰形和分离度都得到明显的改善, 其次流动相中不加酸峰会出现拖尾现象, 加入酸后可改善峰形, 在酸的选择上, 比较了相同浓度的甲酸、冰醋酸、和磷酸溶液, 发现加入甲酸和冰醋酸后, 基线噪音大且漂移严重, 而磷酸可降低基线噪音和漂移现象, 基线平稳, 故选用磷酸。研究中曾试过 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2% 的磷酸, 结果表明 0.1% 的磷酸效果最佳, 故确定

0.1% 磷酸作为流动相。

[参考文献]

- [1] 王晓明, 李付彪, 吕文伟, 等. 白芍总苷对犬急性心肌缺血的保护作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2006, 32(3): 393.
- [2] 徐承水, 王文房. 何首乌提取物对大鼠血脂水平的影响[J]. 曲阜师范大学学报: 自然科学版, 2004, 30(3): 85.
- [3] Chart Y C, Cheng F C, Wang M F. Beneficial effects of different *Polygonum multi-florum* Thunb. extracts on memory and hippocampus morphology [J]. J Nutr Sci Vita-minol(Tokyo), 2002, 48(6): 491.

[责任编辑 蔡仲德]

6) was 99.12% (RSD 0.56%). The GMP (disodium 5'-guanglate) was linear in the concentration range of 0.50-4.00 μg ($r=0.9999$). The average recovery rate ($n=6$) was 99.18% (RSD 0.45%). **Conclusion:** The method is accurate and reliable, which can be used to determinate the quality of IMP and GMP in flavor nucleotides.

[Key words] HPLC; IMP; GMP; flavor nucleotides

5'-肌苷酸二钠(简称IMP)和5'-鸟苷酸二钠(简称GMP)具有呈味性,故IMP和GMP又称为呈味核苷酸(简称I+G)。呈味核苷酸二钠作为一种新型的食品添加剂广泛应用于食品工业中^[1],包括制造复合味精,在酱油中添加一定比例的呈味核苷酸,能显著增加酱油浓厚风味及提高酱油鲜度,添加呈味核苷酸还能消除或抑制异味。目前,测定鸟苷酸二钠和肌苷酸二钠有紫外分光光度法^[2-3]、高效液相色谱法^[4-5]、毛细管电泳法^[6],国家药典测定方法为紫外分光光度法。HPLC测定中大多用离子交换柱,价格高、易损坏,较少使用 C_{18} 反相柱,由于IMP和GMP的分子结构较为相似,为使IMP和GMP有较好的分离,本文通过研究在流动相中加入四丁基溴化铵离子对来改变流动相组分。

1 材料

1.1 仪器与试剂 Aglient 1200 高效液相色谱系统,安捷伦色谱工作站,Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),VWD 紫外检测器。乙腈(色谱纯,批号 371012-08601),水(娃哈哈纯净水),磷酸二氢钾(分析纯,批号 20100312),四丁基溴化铵(分析纯,批号 20100113),鸡精(自购)5'-肌苷酸二钠和5'-鸟苷酸二钠标准品(Sigma公司)。

1.2 标准溶液的配制 精密称取5'-肌苷酸二钠和5'-鸟苷酸二钠对照品各50.0 mg置于100 mL量瓶中,加水超声15 min溶解,定容至刻度,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.3 样品的预处理 准确称取市售鸡精样品1.0 g(精确至0.000 1 g),精密称定,置于100 mL量瓶中,加水超声15 min溶解,定容至刻度。精密吸取1 mL稀释至25 mL,待测。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 检测波长的选择 分别配制5'-肌苷酸二钠和5'-鸟苷酸二钠溶液于分光光度计进行扫描,5'-肌苷酸二钠在波长249 nm有最大吸收峰,5'-鸟苷酸二钠在波长254 nm有最大吸收峰,综合两者峰值,选择250 nm为检测波长。

2.1.2 流动相的选择 用乙腈-水(含0.05 mol \cdot

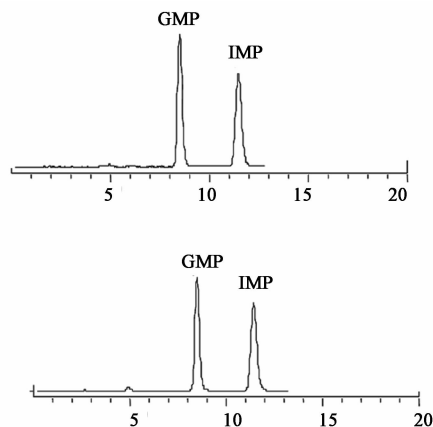
L^{-1} 磷酸二氢钾溶液)(2:98)作为流动相时,IMP和GMP虽然能分离,但分离效果不佳,峰形也不好,在流动相中加入四丁基溴化铵离子对后,IMP和GMP分离效果好,峰形也好。考查不同浓度四丁基溴化铵离子对以及甲醇和乙腈对IMP和GMP色谱出峰的影响,最后确定流动相为乙腈-水(含0.005 mol \cdot L^{-1} 四丁基溴化铵及0.05 mol \cdot L^{-1} 磷酸二氢钾溶液)(2:98)。

2.1.3 流速的选择 分别考查流速为0.5,0.8,1.0 mL \cdot min^{-1} 对IMP和GMP色谱峰的影响,确定流速为1.0 mL \cdot min^{-1} 较为合适,分离度 >2.0 ,理论塔板数不低于5 000。

2.1.4 色谱条件的确定 依据上述试验,确定色谱条件如下 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);流动相乙腈-水(含0.005 mol \cdot L^{-1} 四丁基溴化铵及0.05 mol \cdot L^{-1} 磷酸二氢钾)(2:98);流速1.0 mL \cdot min^{-1} ;检测波长250 nm;柱温室温。

2.2 方法学考查

2.2.1 系统适用性试验 分别取标准品溶液和样品溶液10 μL 进样,按2.1.2项下色谱条件进样,对照品及样品液相色谱图见图1。



A. 肌苷酸二钠和鸟苷酸二钠标准液相色谱图;

B. 样品液相色谱图

图1 鸡精样品色谱

2.2.2 线性关系试验 精密吸取1.2制备对照溶液储备液0.5,1.0,2.0,4.0,8.0 mL,用流动相稀释至10 mL,依次进样10 μL ,以进样量(X)为横坐标,

峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线。5'-肌苷酸二钠的线性方程为 $Y = 1\ 269X - 78\ 143$, r 为 0.999 9, 线性范围 0.50 ~ 4.00 μg , 最低检测限为 0.006 μg 。5'-鸟苷酸二钠的线性方程为 $Y = 1\ 413X - 84\ 859$, r 为 0.999 9, 线性范围 0.50 ~ 4.00 μg , 最低检测限为 0.004 μg 。

2.2.3 重复性试验 取鸡精样品取样 6 份, 按 1.2 的方法操作配制, 测定。分别计算 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠含量, 其重复性 RSD 分别为 0.62%, 0.74%, 结果表明重复性良好。

2.2.4 精密度试验 精密吸取系列混合对照溶液的中间浓度溶液 10 μL , 重复进样 5 次。测定峰面积, 5'-肌苷酸二钠精密度 RSD 0.49% ($n = 6$), 5'-鸟苷酸二钠精密度 RSD 0.31% ($n = 6$), 结果表明精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取同一样品溶液在 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 内分别测定, 分别计算 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的含量, 其稳定性 RSD 分别为 0.69%, 0.75%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.6 回收率试验 取已知含量的样品 5 份, 精密称定, 分别准确加入 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠进行测定, 计算回收率。5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的平均回收率分别为 99.12%, 99.18% ($n = 6$), RSD 分别为 0.56%, 0.45% ($n = 6$), 结果表明该方法回收率高 (表 1, 2)。

表 1 5'-肌苷酸二钠回收率试验 ($n = 6$)

鸡精样品量/mg	IMP 原含量/mg	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
4.990	2.495	2.5	4.975	99.60		
4.904	2.452	2.5	4.894	98.83		
5.012	2.506	2.5	4.977	99.42	99.12	0.56
4.994	2.497	2.5	4.903	98.12		
5.004	2.502	2.5	4.970	99.36		
4.996	2.498	2.5	4.969	99.39		

3 讨论

在流动相中加入缓冲盐主要有两个方面考虑, ①利用其缓冲能力用于调节流动相的 pH, 使流动相的 pH 在某一指定值的附近; ②增强流动相的离子强度, 减少或削弱被分析化合物与固定相中硅羟基

表 2 5'-鸟苷酸二钠回收率试验 ($n = 6$)

鸡精样品量/mg	GMP 原含量/mg	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
5.045	2.437	2.5	4.893	99.114		
4.986	2.408	2.5	4.841	98.630		
5.018	2.424	2.5	4.909	99.702	99.18	0.45
5.022	2.426	2.5	4.863	98.729		
4.992	2.411	2.5	4.892	99.610		
4.987	2.409	2.5	4.875	99.313		

的相互作用, 改善峰形。加入离子对试剂时最主要的一个目的就是利用离子对试剂的两面性, 既能在 C_{18} 填料上有较好的保留, 又能与强极性的被分析物产生电性作用, 增强化合物的保留能力。但是离子对试剂加入后化合物保留时间的变化对 pH 非常敏感, 而离子对试剂本身并不能起一个有效的 pH 缓冲或稳定作用。为了使离子对试剂加入后保留时间相对稳定, 因此需要在加入离子对试剂的同时也加入缓冲盐在流动相中来调节 pH。

考查了流动相中加入 0.005 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四丁基溴化铵及 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾用于测定呈味核苷酸二钠中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠, IMP 和 GMP 色谱峰组分离好, 精密度高, 准确度好, 快速简便, 实际应用范围广。

[参考文献]

- [1] 杜琨, 张亚宁, 方多. 呈味核苷酸及其在食品中的应用 [J]. 中国酿造, 2005, 151(10): 50.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 中华人民共和国国家标准 GB10795-89 [S]. 食品添加剂. 呈味核苷酸二钠.
- [3] 叶姗. 主成分回归校正法-紫外分光光度法同时测定鲜味剂中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠 [J]. 理化检测: 化学分册, 2010, 46(7): 784.
- [4] 陈青川, 牟世芬, 侯小平. 离子对色谱法测定增味剂中的 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠 [J]. 色谱, 1999, 17(3): 290.
- [5] 汪国旗, 陈青俊, 丁献尊, 等. 高效液相法测定调味品中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠 [J]. 中国酿造, 2007, 174(9): 53.
- [6] 杜建中, 曾秀文, 黄少春, 等. 毛细管电泳法测定增味剂中的 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的含量 [J]. 食品工业科技, 2010, 12(31): 335.

[责任编辑 蔡仲德]