

# 婴幼儿配方奶粉中核苷酸含量的测定方法研究

杨大进 方从容 马 兰 王竹天

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘要:**为检测婴幼儿配方奶粉中胞嘧啶核苷酸、尿嘧啶核苷酸、腺嘌呤核苷酸、鸟嘌呤核苷酸、次黄嘌呤核苷酸 5 种核苷酸的含量,建立了奶粉中 5 种核苷酸的紫外检测器液相色谱法。对试样提取、固相萃取等前处理方式和仪器检测条件进行了研究,试样经 0.5% 乙酸去除蛋白质,氨基固相萃取柱富集和净化, Symmetry C<sub>18</sub> 柱分离, 254 nm 紫外检测器液相色谱分析方法定量检测。胞嘧啶核苷酸、尿嘧啶核苷酸、腺嘌呤核苷酸、鸟嘌呤核苷酸和次黄嘌呤核苷酸的添加回收率分别是 90.0%~94.2%、86.4%~93.2%、85.7%~92.6%、90.0% 和 85.7%~93.3%, 相对标准差分别为 6.6%、3.4%、8.2%、6.8% 和 8.2%, 检出限分别为 0.04、0.05、0.05、0.06 和 0.04 μg/mL。3 年来对 30 件送检样品的检测显示,检测结果与标示量基本一致。该方法适用于婴幼儿配方奶粉核苷酸含量的分析。

**关键词:**乳制品; 婴儿食品; 核苷酸类; 色谱法, 高压液相

## A method for determination of nucleotides in infant formula milk powder

Yang Dajin, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021)

**Abstract:** For the determination of 5 nucleotides in infant formula milk powder, the HPLC-UV absorbance detector method was established. We investigated the pretreatment means including sample extraction, solid phase extraction and conditions of instrumentation and established the method in which 0.5% acetic acid was used for elimination of protein, quaternary amine solid phase extraction column for concentration and purification, symmetry C<sub>18</sub> column for isolation and the nucleotides were determined quantitatively at UV 254 nm wavelength with HPLC. Recovery rates of cytidine, uridine, adenosine, guanosine and inosine were in ranges of 90.0%~94.2%, 86.4%~93.2%, 85.7%~92.6%, 90.0% and 85.7%~93.3% respectively, the RSDs were 6.6%, 3.4%, 8.2%, 6.8% and 8.2% respectively, the minimum limit of detection were 0.04, 0.05, 0.05, 0.06 and 0.04 μg/mL respectively. The results of 30 samples analyzed in recent 3 years conformed to the amount shown on labels. The method is suitable to inspect nucleotides in infant formula milk powder.

**Key Words:** Dairy Products; Infant Food; Nucleotides; Chromatography, High Performance Liquid

核苷酸是由含氮的碱基、核糖或脱氧核糖、磷酸 3 种分子连接而成。碱基与糖通过糖苷键连成核苷, 核苷与磷酸以酯键连成核苷酸。

在婴儿配方奶粉中添加的核苷酸品种主要有以下 5 种: 胞嘧啶核苷酸 (cytidine, CMP); 尿嘧啶核苷酸 (uridine, UMP); 腺嘌呤核苷酸 (adenosine, AMP); 鸟嘌呤核苷酸 (guanosine, GMP); 次黄嘌呤核苷酸 (inosine, IMP)。

核苷酸除营养作用外, 鸟嘌呤核苷酸和次黄嘌呤核苷酸还具有呈味和增鲜作用, 在味精、鸡精等调味品中使用。

有关核苷酸检测的报道较多, 可检索到大量体液分析的报道, 食品分析集中在味精和肉等方面, 有些方法的前处理尚不成熟。<sup>[1~3]</sup> 婴儿配方奶粉是婴儿食用辅食前的唯一食物, 对于其健康生长关系很大, 为了给我国制定有关政策提供可靠数据, 我们建立了适用于婴儿配方奶粉的检测方法。由于婴儿配方奶粉样品成分复杂, 解决前处理问题尤为重要, 为

This work was supported by the Special Funds for Health Food of Ministry of Health, China. (BJ - 01 - 20)

基金项目: 卫生部保健食品专项基金课题 (BJ - 01 - 20)

作者简介: 杨大进 男 副研究员

基金项目: 卫生部保健食品专项基金课题 (BJ - 01 - 20)

此专门建立了适用于婴儿配方奶粉的固相萃取法,实际使用效果较好。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

甲醇(保证试剂),乙酸,磷酸二氢钾,磷酸氢二钾。

**核苷酸标准储备溶液** 准确称量经 100 ℃,4 h 干燥处理的标准品胞嘧啶核苷酸钠盐(CMP) 100 mg,尿嘧啶核苷酸钠盐(UMP)、腺嘌呤核苷酸钠盐(AMP)、鸟嘌呤核苷酸钠盐(GMP)、次黄嘌呤核苷酸钠盐 IMP)各 40 mg,加水定容至 100 mL。

**核苷酸标准使用液** 将核苷酸标准储备溶液用 0.25 mol/L,pH3 的磷酸二氢钾稀释 100 倍。

**1.2 设备** 高效液相色谱仪附紫外检测器(UV),美国 water's 公司产品,季铵盐固相萃取柱 2 g 填料,3 mL 容积,产品编号 7091-03,美国 Baker 公司产品。

### 1.3 分析步骤

#### 1.3.1 试样处理

1.3.1.1 准确称取 10 g 试样于 100 mL 容量瓶中,加入约 50 mL 热水 80 mL,完全混匀。当试样液达到室温后用水定容至刻度。

1.3.1.2 准确吸取 10 mL 试样液至 100 mL 容量瓶中,加入 0.5%乙酸 5 mL、水 10 mL,混匀后静置 5 min 以沉淀蛋白质。用水定容至刻度,混匀后过滤,弃去数毫升初滤液后收集约 30 mL 滤液。

1.3.1.3 将氨基固相萃取柱先用 10 mL 甲醇、10 mL 水活化后,再将 20 mL 试样滤液过滤,以 1 mL 水清洗萃取柱,用 0.25 mol/L,pH3.5 磷酸二氢钾溶液洗脱出 5 mL 滤液。全部过程需要控制流速 1 滴/s。

#### 1.3.2 液相色谱参考条件

**色谱柱** Water's Symmetry C<sub>18</sub>:3.9 mm ×150 mm;柱温:25 ℃;紫外检测器:检测波长:254 nm;流动相:0.01 mol/L 磷酸二氢钾 + 0.1 mol/L 磷酸氢二钾 = 480 + 20;流速:0.6 mL/min。标准品及试样的色谱图分别见图 1、图 2。

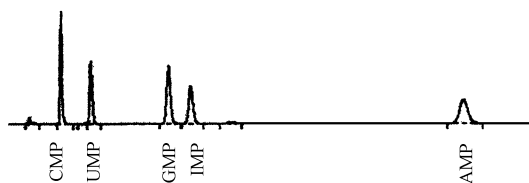


图 1 5 种核苷酸标准色谱图

## 2 结果与讨论

### 2.1 试样前处理条件的选择

由于婴幼儿配方奶

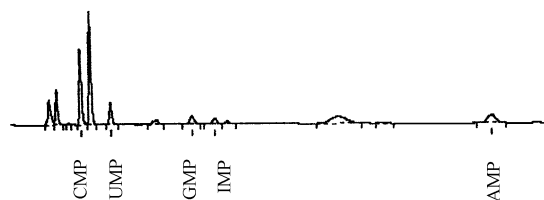


图 2 婴幼儿配方奶粉样品色谱图

粉组成较为复杂,蛋白质、脂肪等干扰成分多,传统的提取净化方式容易出现乳化等现象,严重影响分析,固相萃取是较好的净化方法。采用适合的固相萃取柱可以使待测物与试样中的干扰物得到较好的分离。考虑到核苷酸属于弱酸性物质,采用弱碱性的季铵盐固相萃取柱比较容易将核苷酸吸附,试样中的杂质通过水洗脱,待测物通过酸性的洗脱剂洗脱后可直接进行液相色谱分析,实验证明此方法可行。

对于奶粉试样,必须先将其溶解,为保证溶解效果应尽可能使用热水。据文献报道,4 种固体状态下的核苷酸至少在 180 ℃以下不会分解,且核苷酸在热水中的溶解度更大,<sup>[4]</sup>但液体状态下具体的分解温度未见报道。对提取温度进行条件实验,即用 20、30、50、70、90、100 ℃6 种温度水配制标准溶液并用 0.25 mol/L,pH3 的磷酸二氢钾稀释成标准使用液,直接进行高效液相色谱分析,实验结果表明 20 ℃~100 ℃之间无差异。由于一般婴幼儿配方奶粉的冲调温度为 50 ℃,同时实验结果也表明采用 50 ℃提取核苷酸肯定不会被破坏,故选择使用 50 ℃热水提取试样。

为保证固相萃取的效果,试样提取液在进行固相萃取之前必须先进行初步的净化,其中蛋白质是首要去除物。蛋白质沉淀有多种方法,考虑到既不破坏待测物的结构又尽可能少引入离子,选择酸沉淀蛋白质是最好的方法。乙酸常作为蛋白质沉淀剂使用,对于液相色谱分析比较好。要选择适合的浓度并考虑对核苷酸分析的影响,实验发现乙酸浓度在 0.1%时沉淀效果很差,基本没有蛋白质沉淀下来;乙酸浓度在 0.5%~10%之间可见蛋白质沉淀,同时检测结果与乙酸浓度无关,但随着酸度超过 0.5%,沉淀效果变差,过滤液不澄清,实验表明 0.5%左右的乙酸对蛋白质沉淀效果最好,满足核苷酸分析的要求,故选择 0.5%乙酸作为蛋白质沉淀剂。实验结果见表 1。

**2.2 固相萃取条件的选择** 在该方法中,固相萃取是影响分析结果的关键因素,为保证效果,固相萃取柱需要进行活化并保证一定的流速。

在试样经过固相萃取柱后需要加入 1 mL 水,其

目的是为了去除柱上吸附的一些水溶性杂质。随着清洗用水量的增加,核苷酸也会被洗脱下来,实验证实,水量在 2 mL 以下对结果无显著性影响,且杂质峰可以通过适合的色谱条件与待分析核苷酸进行有效分离,故清洗用水量选择为 1 mL。结果见表 2。

表 1 乙酸浓度对蛋白质沉淀过滤液的影响

乙酸浓度	肉眼观察蛋白质沉淀情况	过滤液澄清度
10 %	可见蛋白质沉淀,上层液体混浊	混浊
5 %	可见蛋白质沉淀,上层液体混浊	混浊
1 %	可见蛋白质沉淀,上层液体基本澄清	基本澄清
0.5 %	可见蛋白质沉淀,上层液体澄清	澄清
0.1 %	未见蛋白质沉淀	混浊

表 2 洗脱液用量对结果的影响<sup>(1)</sup>

洗脱液用量 mL	杂质情况		检测结果 <sup>(2)</sup>
	主要杂质峰数	大小	
5.0	3	较小	80
3.0	4	较大	87
2.0	5	大	96
1.0	5	大	100
0.5	4	大	100

注:(1)以 1 mL 为标准;(2)以 1 mL 为 100。

多次条件实验证实,5 mL 的 0.25 mol/L, pH3.5 磷酸二氢钾溶液可以达到将吸附在柱上的 5 种核苷酸进行 95 % 以上洗脱的效果,应准确收集洗脱液 5 mL。

通常奶粉中核苷酸的添加量较大,因此凡是添加核苷酸的试样经过固相萃取后可以直接进行液相色谱分析,不必再浓缩。

2.3 仪器分析条件的选择 对于核苷酸的仪器分析报道较多,多用 ODS 反相色谱柱,通常采用是离子对反相色谱法。考虑到离子对色谱法的弊端,经对照文献和实际,发现日本 YWG—C<sub>18</sub> 色谱柱分离效果最佳。在没有相同牌号色谱柱的情况下对现有色谱柱进行了比较,只有 Water's Symmetry C<sub>18</sub> 不仅能较好地 5 种物质进行有效分离,还可使杂质峰与核苷酸很好分离。在本试验中 Water's μ - BONDAPAK<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>、Water's Nova-pak C<sub>18</sub>、日本 TOSOH TSK—GEL ODS—80Ts C<sub>18</sub> 等牌号的色谱柱均不能对核苷酸进行很好的分离。使用 Water's Symmetry C<sub>18</sub>,流速在 0.6 mL/min 即可在 18 min 内完成全过程分析。但应当注意的是,核苷酸分析需要色谱柱有较高的活性,如果色谱柱长时间保存在水中或长时间采用缓冲溶液但未恢复到甲醇或乙腈中会使分析出现异常。

2.4 方法的线性范围 分别配制核苷酸标准溶液系列,在给定的仪器条件下进行液相色谱分析,以峰面积对浓度作校正曲线,得到线性回归方程和线性相关系数,分别见表 3。

2.5 方法的准确性 根据试样测定步骤,对于某

表 3 线性方程及检出限

	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	线性方程	r	Hg/mL 检出限
CMP	0.992	1.24	2.48	6.20	12.4	y = 1617.7x + 83.3	0.9996	0.04
UMP	1.17	1.46	2.92	7.30	14.6	y = 18158.5x - 1355.2	0.9996	0.05
GMP	1.01	1.26	2.52	6.30	12.6	y = 25306.6x - 1376.0	0.9997	0.05
IMP	0.948	1.23	2.46	6.15	12.3	y = 16447.4x - 1297.4	0.9993	0.06
AMP	1.30	1.63	3.26	8.15	16.3	y = 37765.5x - 12725.8	0.9998	0.04

一具有一定本底值的试样,作 2 个浓度加标回收试验,回收率结果见表 4,结果表明该方法符合食品分析的要求。

表 4 方法的准确性 mg/100 g

核苷酸	本底值	加标量	测定值	回收率 %
CMP	11.4	6.0	16.8	90.0
		12.0	22.7	94.2
UMP	4.6	2.2	6.5	86.4
		4.4	8.7	93.2
GMP	1.3	0.7	1.9	85.7
		1.4	2.6	92.6
IMP	1.7	1.0	2.6	90.0
		2.0	3.5	90.0
AMP	1.6	0.7	2.2	85.7
		1.5	3.0	93.3

2.6 方法的精密度 为考察方法的精密度,对试样同时进行 6 次检测,结果见表 5。精密度结果符合分析要求。

表 5 方法的精密度结果 mg/100 g

核苷酸	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD %
CMP	11.0	12.4	10.5	11.1	11.5	10.4	11.2	6.6
UMP	4.6	4.3	4.4	4.2	4.3	4.5	4.4	3.4
GMP	1.4	1.6	1.6	1.3	1.4	1.5	1.5	8.2
IMP	1.7	1.9	1.9	1.7	1.8	1.6	1.8	6.8
AMP	1.6	1.3	1.5	1.4	1.4	1.6	1.5	8.2

2.9 试样测定和稳定性情况 3 年来,共采用本方法对 30 件送检试样进行检测,检测结果表明由于该类试样对包装要求很高,同时均由大型企业生产,因此产品质量能够得以保障,与标示基本相符。

除在规定的加速实验保存条件下 3 个月内试样含量没有显著变化外。样品在常温下放置 3 年以上,含量也没有显著变化。

#### 参考文献:

- [1] 张燕婉,鲁红军,王津生. 高效液相色谱法测定食品中核苷酸的含量[J]. 食品科学,1994,6,59-62.  
[2] 任一平,黄百芬,连国义,等. 应用 HPLC 反相色谱快速

测定增鲜味精中的鸟苷酸和肌苷酸[J]. 食品与发酵工业,1994,6,36-41.

- [3] 黄晓兰,李科德,陈云华. 15 种核酸水解产物的高效液相色谱分离及其在酵母抽提物分析中的应用[J]. 分析化学研究简报,2000,28(12):1504-1507.  
[4] 马世昌,主编. 化学物质辞典[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1999.

[收稿日期:2002-12-27]

中图分类号:R15;TS252.51;Q524 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2003)06-0496-04

## 卫生部文件

卫法监发[2003]258号

# 卫生部关于海猪肉粉 不能作为普通食品进行管理的批复

黑龙江省卫生厅:

你厅《关于能否将海猪肉粉做为普通食品进行管理的请示》(黑卫法监发[2003]484号)收悉。经研究,现批复如下:

根据《中华人民共和国食品卫生法》和《新资源食品卫生管理办法》有关规定,海猪肉粉不能作为普通食品,应按新资源食品进行管理。

此复。

附件:黑龙江省卫生厅关于能否将海猪肉粉做为普通食品进行管理的请示

中华人民共和国卫生部

二〇〇三年九月十一日

## 黑龙江省卫生厅文件

黑卫法监发[2003]484号

# 关于能否将海猪肉粉做为普通食品进行管理的请示

卫生部:

近日,我省接到一食品生产企业请示,拟开发生产海猪(荷兰猪、黑豚、豚鼠)肉粉。据调查,目前,我省海猪养殖户已达 1000 多家,年产海猪 10 万余只。海猪肉粉应按普通食品还是新资源食品管理,请批复。

黑龙江省卫生厅

二〇〇三年七月四日