



中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××

婴幼儿食品和乳品中核苷酸的测定

Determination of nucleotides in foods for infants and young children,

raw milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准附录 A、附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

婴幼儿食品和乳品中核苷酸的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中核苷酸的测定方法。

本标准第一法适用于婴幼儿食品和乳粉中核苷酸的测定，第二法适用于不含谷基和豆基的婴幼儿食品和乳粉中核苷酸的测定。包括：胞嘧啶核苷酸（CMP）、腺嘌呤核苷酸（AMP）、尿嘧啶核苷酸（UMP）、鸟嘌呤核苷酸（GMP）、次黄嘌呤核苷酸（IMP）。

本标准第一法的定量限分别为：CMP：0.05mg/100g；AMP：0.10 mg/100g；UMP：0.10 mg/100g；GMP：0.10 mg/100g；IMP：0.10 mg/100g。本标准第二法检出限分别为：CMP：0.1 mg/100g、AMP：0.15 mg/100g、UMP：0.15 mg/100g、GMP：0.15mg/100g、IMP：0.20 mg/100g。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

第一法 液相色谱串联质谱法

3 原理

试样经水溶解后，用甲酸溶液调节 pH 至 4.6，沉淀试液中的蛋白质，经超声提取、离心、过滤，滤液中的五种核苷酸经反相色谱柱分离，电喷雾离子源离子化。多反应离子监测（MRM）方式检测。基质加标外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 试剂和标准样品

4.1.1 甲酸：色谱纯。

4.1.2 乙腈：色谱纯。

4.1.3 标准样品：

胞嘧啶核苷酸（CMP）：纯度≥98%；

腺嘌呤核苷酸（AMP）：纯度≥99%；

尿嘧啶核苷酸（UMP）：纯度≥99%；

鸟嘌呤核苷酸（GMP）：纯度≥99%；

次黄嘌呤核苷酸（IMP）：纯度≥99%。

4.2 试验用溶液

4.2.1 1%甲酸溶液：吸取 1 mL 甲酸，用水稀释至 100 mL。

4.2.2 0.1% 甲酸溶液：吸取 1 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL。

4.2.3 空白试样基质溶液：称取 1.00 g 阴性试样（不含所测的五种核苷酸）于 100 mL 烧杯中，按 6.1 步骤操作。

取少量阴性试样滤液供液相色谱—质谱联用仪分离检测，将获得的色谱—质谱图。对照附录 A 中的图 A.1 和图 A.2，在相应的保留时间处，不含胞嘧啶核苷酸（CMP）、腺嘌呤核苷酸（AMP）、尿嘧啶核苷酸（UMP）、鸟嘌呤核苷酸（GMP）、次黄嘌呤核苷酸（IMP）。剩余滤液转移至塑料瓶中后，在-20℃电冰箱内保存，供配制标准系列溶液使用。

4.2.4 核苷酸标准储备溶液：称取五种核苷酸标准品各 25mg（准确至 0.1 mg），用超纯水溶解定容至 25 mL。此标准溶液浓度分别为 1 mg/mL（每个组分称取的质量都要校正水分和钠盐含量，以酸型计）。溶液转移至塑料瓶中后，在-20℃电冰箱内保存，备用。

4.2.5 核苷酸混合标准储备溶液：分别准确吸取100 μ L各核苷酸标准储备溶液（4.3.4）于10 mL容量瓶中。用待测试样空白基质溶液（4.3.3）稀释为10 μ g/mL的混合标准储备溶液。在0~4℃电冰箱内保存。

4.2.6 标准系列溶液：

临用前，用待测试样空白基质溶液（4.3.3）将核苷酸混合标准储备溶液（4.3.5）分别稀释为 0.1 μ g/mL、0.4 μ g/mL、0.7 μ g/mL、1.0 μ g/mL、1.3 μ g/mL、1.6 μ g/mL、2 μ g/mL 的系列标准工作液。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-质谱联用仪：带电喷雾离子源；质量范围：1 质荷比（m/z）-1500 质荷比（m/z）；分辨率：0.1 原子质量单位（AMU）。

5.2 色谱柱：Symmetry®C₁₈，柱长 150 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 3.5 μ m，孔径 10 nm（100 Å），或相当者。

5.3 天平：感量 0.01 g 和 0.0001 g。

5.4 台式 pH 计：精度 0.01。

5.5 超声波清洗器。

5.6 具塞塑料离心管：50 mL。

5.7 离心机：转速不低于 15000 rpm。

5.8 一次性微孔滤头：带 0.22 μ m 微孔滤膜（水相系）。

6 分析步骤

6.1 试液制备

称取待测试样 1.00 g 于 100 mL 烧杯中。加入约 90 mL 水（4.1.2）。经玻璃棒搅拌至完全溶解，用 1% 甲酸溶液（4.3.1）调整 pH 至 4.6。移入 100 mL 容量瓶中，定容至刻度。置于超声波清洗器中超声波提取 10 min 后，移入 50 mL 离心管中，在 4℃ 下离心 15 min（转速 15000 rpm）。吸取上清液，用 0.22 μ m 微孔滤膜的一次性滤头（5.8）过滤。弃去前 0.5 mL 滤液后接取滤液，备测。

6.2 液相色谱参考条件

6.2.1 流动相：A相，0.1%甲酸溶液（4.3.2）；B相，乙腈（4.2.2）。

6.2.2 梯度洗脱：洗脱梯度参见附录B中的表B.1。

6.2.3 流动相流动速度：0.3 mL/min。

6.2.4 色谱柱柱温：40 °C。

6.2.5 试液温度：20 °C。

6.2.6 进样体积：10 μL。

6.3 质谱参考条件

6.3.1 离子化模式

电喷雾电离正离子模式（ESI-）

6.3.2 扫描方式

多离子反应监测（MRM）

6.3.3 离子源控制条件：

毛细管电压：3 kV

锥孔电压：40 V

射频透镜1电压：30 V

射频透镜2电压：0.6 V

离子源温度：120°C

锥孔反吹气流量：50 L/h

脱溶剂气温度：350°C

脱溶剂气流量：500 L/h

电子倍增电压：650 V

碰撞池压力：2.5×10⁻³ mbar

6.3.4 五种核苷酸的特征离子。见附录B 中表 B.2。

6.4 定性

试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，变化范围应在±2.5%之内。

待测化合物的定性离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于 3（S/N≥3），定量离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于 10（S/N≥10）。

每种化合物的质谱定性离子必须出现，至少应包括一个母离子和两个子离子，而且同一检测批次，对同一化合物，样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比，其允许偏差不超过附录 B 中表 B.3 规定的范围。

各检测目标化合物以保留时间和两对离子的（特征离子对/定量离子对）所对应的 LC-MS/MS 色谱峰面积相对丰度进行定性。要求被测试样中目标化合物的保留时间与标准溶液中目标化合物的保留时间一致（一致的条件是偏差小于 20%），同时要求被测试样中目标化合物的两对离子对应 LC-MS/MS 色谱峰面积比与标准溶液中目标化合物的面积比一致。

6.5 标准曲线绘制

将标准系列溶液(4.3.6)由低到高浓度进样检测,以峰面积-浓度作图,得到标准曲线回归方程。

6.6 试样测定

按照 6.2 和 6.3 确立的条件,测定试液(6.1)和标准系列溶液(4.3.6),采用外标法基质加标曲线定量试样中的五种核苷酸。

色谱参考保留时间:胞嘧啶核苷酸(CMP): 1.48 min;腺嘌呤核苷酸(AMP): 3.17 min;尿嘧啶核苷酸(UMP): 4.64min;鸟嘌呤核苷酸(GMP): 5.13 min;次黄嘌呤核苷酸(IMP): 6.76 min。

待测液中的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应重新按6.1进行处理后再进样分析。

6.7 空白试验

不称取试样,按 6.6 的步骤做空白实验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

7 结果计算和表示

7.1 试样中各种核苷酸的含量根据外标法定量,以质量分数*X*计,由色谱数据处理软件或按式(1)计算获得:

$$X = \frac{C_i \times V_i \times n}{m_i \times 1000} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X——试样中单一核苷酸含量,单位为毫克每百克(mg/100g);

C_i——试样中五种核苷酸的含量的数值,单位为微克每毫升(μg/mL);

V_i——试样的定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m_i——试样的质量的数值,单位为克(g)。

n——样液的稀释倍数。

结果计算到小数点后两位。

7.2 试样中核苷酸的含量*Z*,以质量分数毫克每百克(mg/100g)表示,按(2)计算:

$$Z = CMP + AMP + UMP + GMP + IMP \dots\dots\dots (2)$$

式中:

Z——五种核苷酸的总含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

CMP——胞嘧啶核苷酸含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

AMP——腺嘌呤核苷酸含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

UMP——尿嘧啶核苷酸含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

GMP——鸟嘌呤核苷酸含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

IMP——次黄嘌呤核苷酸含量,单位为毫克每百克(mg/100 g)。

8 精密度

在重复性条件下,获得的两次独立测定结果的绝对差值,不得超过算术平均值的10%。

第二法 高效液相色谱紫外光谱法

9 原理

试样经过水提取，用沉淀剂沉淀蛋白质后，通过高效液相色谱分离，用紫外检测器外标法测定试样中核苷酸的含量。

10 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

10.1 四丁基硫酸氢铵

10.2 甲醇

10.3 磷酸氢二钾溶液，浓度为 0.1 mol/L:

称取 K_2HPO_4 2.28 g，用超纯水溶解并定容到 100 mL。

10.4 磷酸二氢钾溶液，浓度为 0.1 mol/L:

称取 KH_2PO_4 13.60 g，用超纯水溶解并定容到 1000 mL，用 0.1 mol/L K_2HPO_4 (10.3) 调pH至 5.0。

10.5 醋酸溶液，浓度为 100 mL/L:

取 10 mL 醋酸，加水定容到 100 mL。

10.6 磷酸盐缓冲液，含 1.40 mmol/L 四丁基硫酸氢铵的 0.01 mol/L KH_2PO_4 缓冲液:

取 100 mL 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (10.4)，加 0.4753 g 四丁基硫酸氢铵 (10.1)，用 0.1 mol/L K_2HPO_4 (10.3) 调 pH 至 3.3，加超纯水定容到 1000 mL。

10.7 核苷酸标准混合液 (必须当天配置):

分别称取核苷酸标准品 CMP20mg、AMP20mg、UMP20mg、GMP10mg 和 IMP10mg (准确至 0.1mg)，用超纯水溶解定容至 100mL。此标准溶液浓度为：CMP200 μ g/mL、AMP200 μ g/mL、UMP200 μ g/mL、GMP100 μ g/mL、IMP 100 μ g/mL。(每个组分称取的质量都要校正水分和钠盐含量，以酸型计。)

11 仪器和设备

11.1 分析天平：感量 0.0001g

11.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

11.2 超声波振荡器

12 分析步骤

12.1 试样处理

称取混合均匀的试样约 5g，精确到 1mg，于 100mL 三角瓶中，加入 20mL 热水 (50-60 $^{\circ}$ C) 充分溶解试样，超声波振荡器振荡 5min。将试样溶液移入 50mL 容量瓶中，加入 5mL 醋酸溶液 (10.5)，定容，滤纸过滤，所得溶液经 0.45 μ m 微膜过滤备用。

12.2 测定

12.2.1 参考色谱条件:

流动相：磷酸盐缓冲液 (10.6) : 甲醇 (10.2) = 1000: 40

色谱柱： C_{18} 极性色谱柱 (250 \times 4.6mm, 5 μ m) 或具同等性能的色谱柱。

流速：1 mL/min
 波长：254 nm
 柱温：25℃
 进样体积：10 μL

12.2.2 标准曲线绘制：

分别吸取标准混合溶液（10.7）2mL、4mL、6mL、8mL、10mL，加超纯水定容至100mL，配成核苷酸系列标准工作液。

表1 核苷酸系列标准工作液各组份浓度(μg.Ml⁻¹)

序号	CMP	AMP	UMP	GMP	IMP
1	4	4	4	2	2
2	8	8	8	4	4
3	12	12	12	6	6
4	16	16	16	8	8
5	20	20	20	10	10

将核苷酸系列标准工作液分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积或峰高。以峰面积或峰高为纵坐标，以标准测定液浓度为横坐标绘制标准曲线。

12.2.3 试样溶液的测定：

将制备好的试样溶液（12.1）注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积或峰高。从标准曲线上查得试样溶液中核苷酸的浓度或通过回归方程计算出试样溶液中核苷酸的浓度（μg/mL）。

13 结果计算和表示

试样中核苷酸各组份的含量 X ，以质量分数毫克每百克（mg/100g）表示，按（3）计算：

$$X = \frac{C_i \times V_i \times n}{m_i \times 1000} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

C_i ——试样溶液中核苷酸各组分的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V_i ——试样溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m_i ——试样的质量，单位为克（g）；

n ——样液稀释倍数。

试样中核苷酸的含量 Z ，以质量分数毫克每百克（mg/100g）表示，按（4）计算：

$$Z = CMP + AMP + UMP + GMP + IMP \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中：

Z ——核苷酸含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

CMP ——胞嘧啶核苷酸含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

AMP——腺嘌呤核苷酸含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

UMP——尿嘧啶核苷酸含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

GMP——鸟嘌呤核苷酸含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

IMP——次黄嘌呤核苷酸含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）。

计算结果以两次独立测定结果的算术平均值表示；保留到小数点后两位。

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附录A

(资料性附录)

五种核苷酸的总离子流及特征离子色谱—质谱图

五种核苷酸的标准曲线图

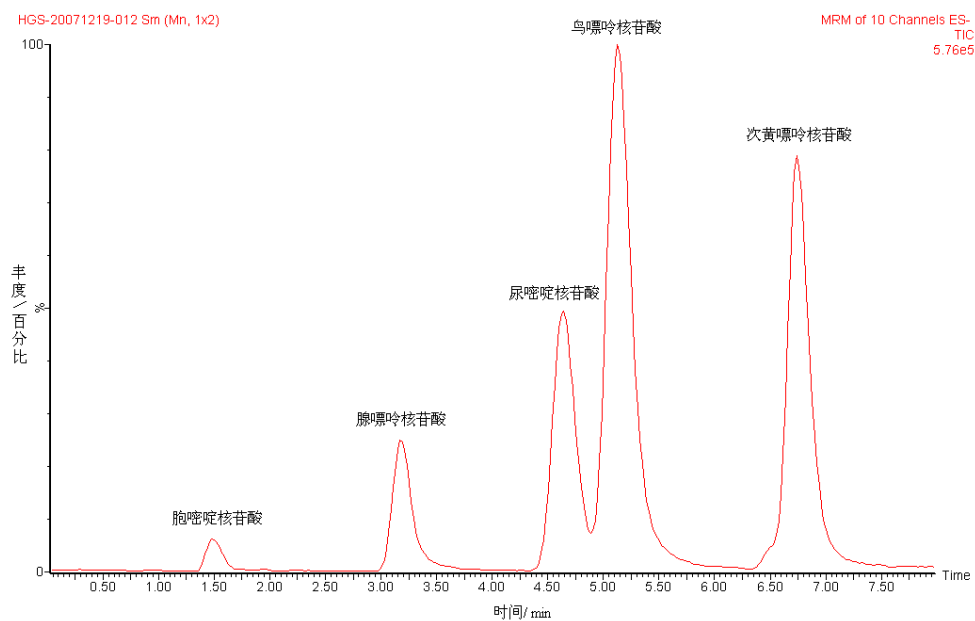


图 A.1 五种核苷酸的总离子流色谱—质谱图

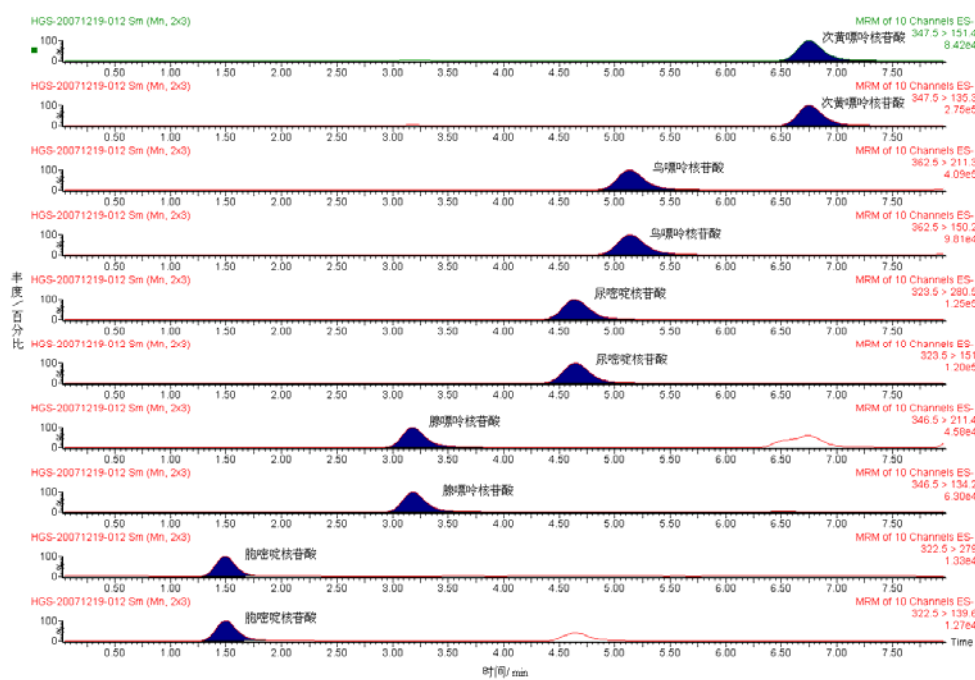


图 A.2 五种核苷酸的特征离子色谱—质谱图

附录 B
(资料性附录)

表B.1 高效液相色谱串联质谱分离梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%	梯度变化曲线
0.00	100.0	0.0	-
5.00	99.0	1.0	6
6.50	95.0	5.0	6
7.00	0.0	100.0	6
7.50	0.0	100.0	1
7.70	100.0	0.0	6

注:1为即时变化, 6为线性变化

表B.2 五种核苷酸的特征离子

名称	分子量	特征离子	滞留时间 (S)	碰撞能量 (eV)
胞嘧啶核苷酸 (CMP)	322.50	139.60 ^a	0.100	15.00
		279.00	0.100	15.00
腺嘌呤核苷酸 (AMP)	346.50	134.20 ^a	0.100	20.00
		211.40	0.100	15.00
尿嘧啶核苷酸 (UMP)	323.50	280.50 ^a	0.150	15.00
		151.00	0.150	20.00
鸟嘌呤核苷酸 (GMP)	362.50	211.30 ^a	0.180	15.00
		150.20	0.180	25.00
次黄嘌呤核苷酸 (IMP)	347.50	135.30 ^a	0.180	25.00
		151.40	0.180	20.00

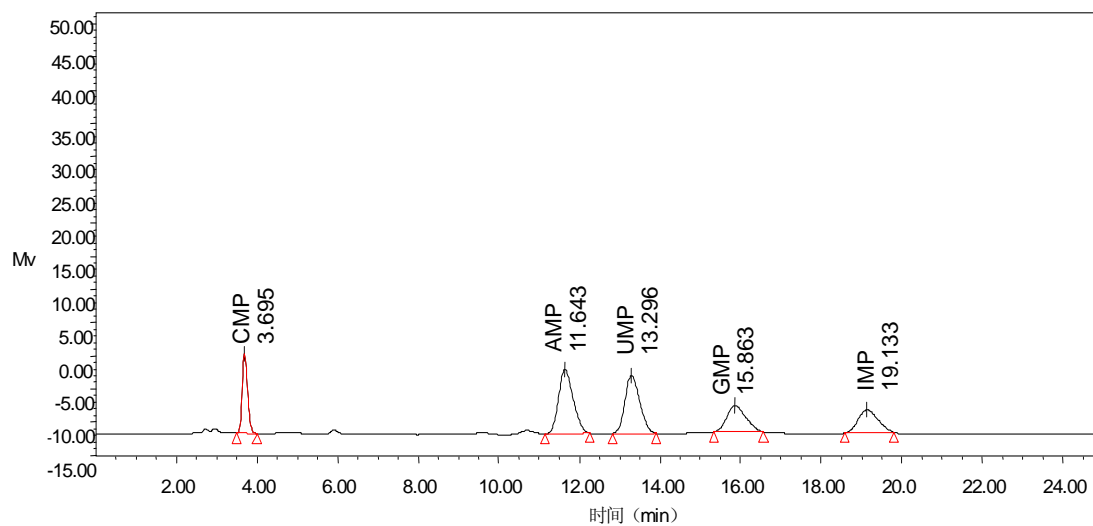
a 为定量离子

表 B.3 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

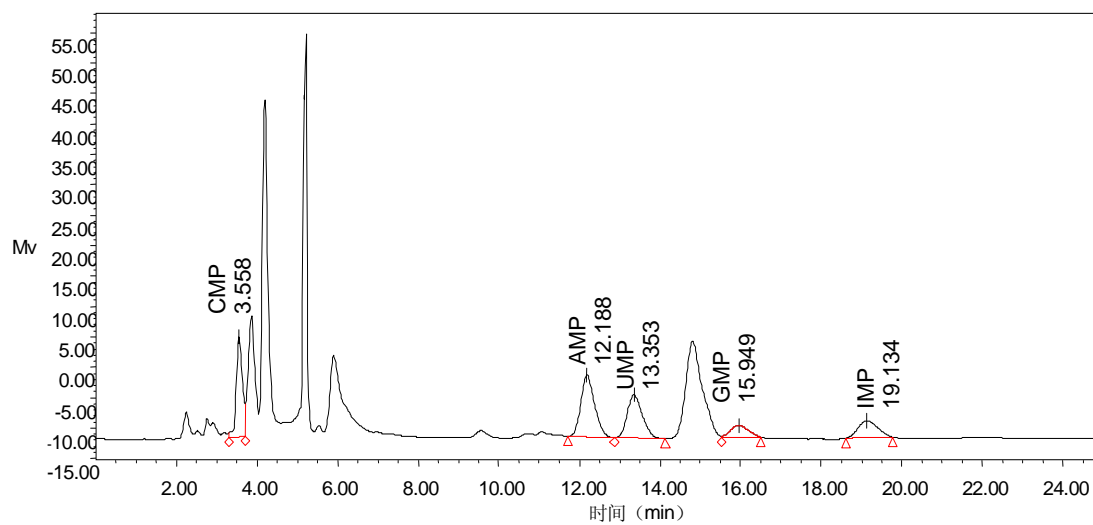
相对离子丰度	>50%	>20% ~ 50%	>10% ~ 20%	≤10%
允许相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

附录 C
(资料性附录)

高效液相色谱紫外法标准和试样核苷酸色谱图



C.1 五种核苷酸标准色谱图



C.2 试样与试样加标色谱图