

1.3 分析条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm; 岛津 (上海) 实验器材有限公司; P/N: 227-30017-08)

流动相：磷酸盐缓冲液 - 甲醇 (1000 : 40, v : v)

流速：1.0 mL/min

进样量：10 μL

波长：254 nm

柱温：25°C

1.4 混合标准溶液的制备

精密称取CMP、UMP、AMP、GMP和IMP各10 mg，加入纯净水10 mL，配成浓度均为1 mg/mL的中间溶液，分别取适量1 mg/mL的中间溶液混合，逐级稀释，配制成CMP、UMP、AMP、GMP和IMP的浓度分别为0.2 μg/mL、0.4 μg/mL、1 μg/mL、4 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL和80 μg/mL的标准系列工作溶液。

■ 样品前处理

称取混合均匀的5 g奶粉样品于50 mL的离心管中，加入20 mL温水(50°C)充分溶解试样，冷却至室温，用乙酸溶液(100 mL/L)调试样溶液pH 4.1，移入50 mL容量瓶中定容，摇匀，转入离心机中，4°C条件下，12000 r/min离心5 min，将上清液用0.22 μm微孔滤膜滤过，备用。

■ 结果与讨论

3.1 色谱图

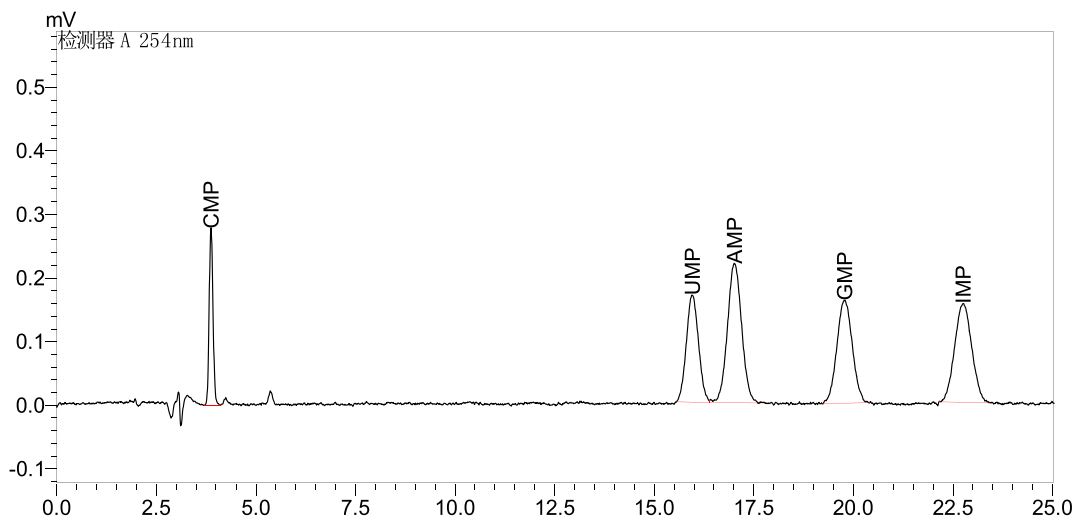


图1 标准溶液定量下限色谱图

3.2 线性、检出限和定量限

将5种核苷酸混合标准工作溶液，按“1.3 分析条件”进行测定，使用外标法定量。以峰面积为纵坐标，对应的标准工作溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，如图2所示。校准曲线线性关系良好，相关系数均大于0.9994，准确度在96.2%~104.8%之间。LabSolutions软件依据信噪比自动计算检出限(S/N=3)及定量限(S/N=10)。线性方程、相关系数、检出限及定量限结果见表1。

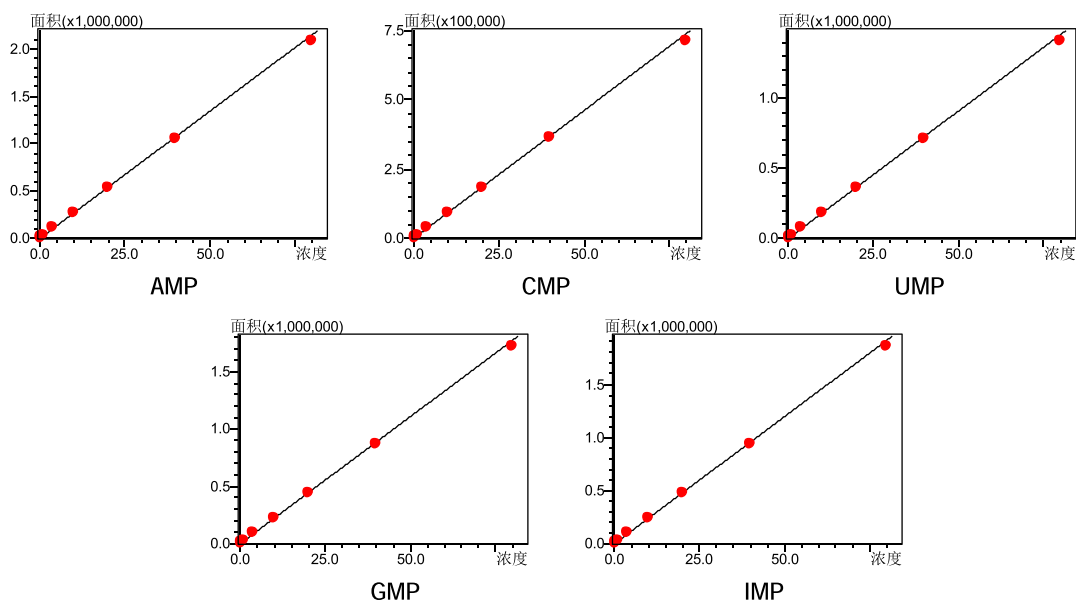


图2 标准曲线

表1 线性关系、检出限和定量限结果

目标物名称	标准曲线	相关系数 R	线性范围 (μg/mL)	准确度 %	检出限 (μg/mL)	定量限 (μg/mL)
AMP	$Y = 26897.8X + 1.58854$	0.9995	0.2 - 80	96.8-104.5	0.02	0.04
CMP	$Y = 9267.2X + 46.0288$	0.9995	0.2 - 80	96.2-104.0	0.01	0.03
UMP	$Y = 18220.1X - 99.8026$	0.9994	0.2 - 80	96.7-104.8	0.02	0.05
GMP	$Y = 22181.4X - 5.54631$	0.9995	0.2 - 80	96.9-104.7	0.02	0.05
IMP	$Y = 23957.1X + 46.5275$	0.9995	0.2 - 80	96.9-104.8	0.02	0.05

3.3 精密度

采用 0.2 μg/mL 和 20 μg/mL 标准工作溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 2 所示。结果显示：不同组分保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02% ~ 0.05% 和 0.02% ~ 1.80% 之间，显示仪器精密度良好。

表2 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

目标物名称	理论浓度 (μg/mL)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	理论浓度 (μg/mL)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
AMP	0.200	0.03	1.05	20.0	0.02	0.05
CMP	0.200	0.03	1.01	20.0	0.02	0.09
UMP	0.200	0.04	0.64	20.0	0.02	0.05
GMP	0.200	0.04	1.65	20.0	0.02	0.02
IMP	0.200	0.05	1.80	20.0	0.03	0.03

3.4 加标回收率

分别精密称取已知 5 种核苷酸含量的市售奶粉样品 6 份，每份 5 g，再加入一定量的核苷酸对照品储备液，按照“2. 样品前处理”方法处理后制备供试品溶液，上机分析，按以下公式考察回收率。

$$\text{回收率}\% = \frac{C_{\text{实测}} - C_{\text{样品}}}{C_{\text{添加}}} \times 100\%$$

其中:

$C_{\text{实测}}$ 为实际测试浓度

$C_{\text{样品}}$ 为样品浓度

$C_{\text{添加}}$ 为添加浓度

添加浓度及加标回收率具体结果如表 3 所示, 5 种核苷酸的加标回收率在 85.75~91.43% 之间。

表 3 加标回收率结果

目标物名称	添加浓度 (mg/kg)	回收率 1 (%)	回收率 2 (%)	回收率 3 (%)	回收率 4 (%)	回收率 5 (%)	回收率 6 (%)	回收率均值 (%)	回收率 RSD%
AMP	50	86.02	85.92	85.80	85.80	85.52	85.46	85.75	0.26
CMP	100	87.92	88.34	88.69	88.33	87.72	87.74	88.12	0.45
UMP	60	87.72	87.50	87.48	87.31	87.08	87.02	87.35	0.31
GMP	20	90.85	91.05	91.80	91.90	91.75	91.25	91.43	0.49
IMP	30	89.07	89.37	89.43	87.30	88.87	88.97	88.83	0.89

3.5 样品测定结果

精密称取市售某品牌奶粉样品 6 份, 按照“2. 样品前处理”方法处理及“1.3 分析条件”进行测定, 色谱图如图 3 所示。结果见表 4, 奶粉样品中核苷酸总量为 0.29 g/kg, 在国家标准《GB 14880-2012 食品安全国家标准食品营养强化剂使用标准》中规定的添加量 0.12~0.58 g/kg (以核苷酸总量计) 范围之内。

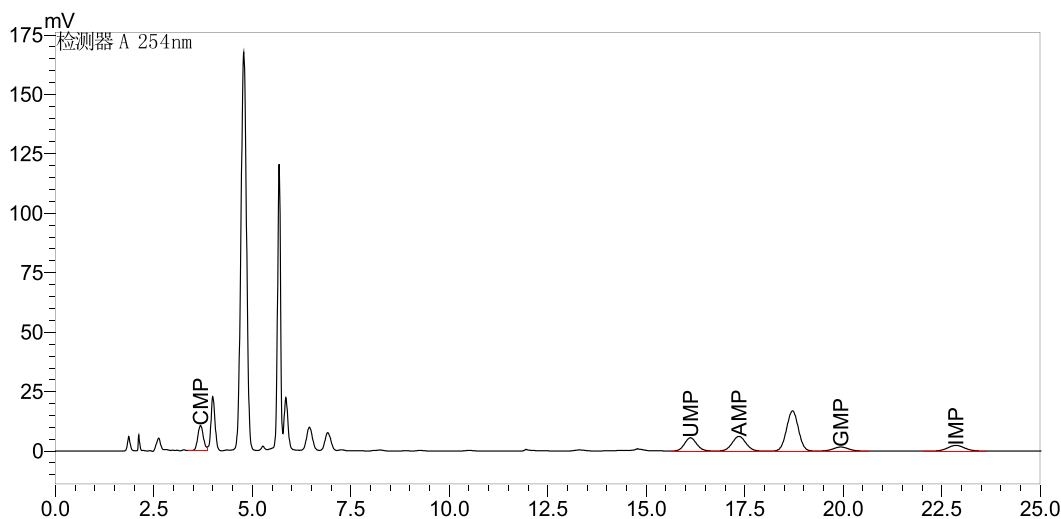


图 3 市售奶粉样品色谱图

表 4 样品测定结果 ($\mu\text{g/mL}$)

目标物名称	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	平均值	RSD%
AMP	5.568	5.572	5.581	5.585	5.595	5.593	5.582	0.20
CMP	11.29	11.29	11.27	11.28	11.30	11.31	11.29	0.12
UMP	6.560	6.575	6.582	6.590	6.603	6.600	6.585	0.25
GMP	2.046	2.042	2.038	2.038	2.040	2.044	2.041	0.16
IMP	3.074	3.071	3.069	3.077	3.071	3.068	3.072	0.11

■ 结论

本应用建立了采用岛津高效液相色谱仪 Nexera LC-40 测定婴幼儿奶粉中核苷酸的检测方法。该方法灵敏度高、重复性好，满足《GB 5413.40—2016 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中核苷酸的测定》中规定的定量限检测要求，为婴幼儿奶粉中核苷酸含量检测提供参考。

岛津应用云

