

三重四极杆液质联用仪测定婴幼儿奶粉中核苷酸含量

LCMSMS-563

摘要：本应用建立了三重四极杆液质联用仪测定婴幼儿奶粉中核苷酸的方法。在优化后的色谱及质谱条件下，采用正离子模式扫描，通过多反应监测 (MRM) 模式对目标化合物进行测定。结果表明：胞嘧啶核苷酸 (CMP)、鸟嘌呤核苷酸 (GMP) 和次黄嘌呤核苷酸 (IMP) 在 2 ng/mL ~ 1000 ng/mL 浓度范围内，尿嘧啶核苷酸 (UMP) 在 4 ng/mL ~ 2000 ng/mL 浓度范围内，腺嘌呤核苷酸 (AMP) 在 0.8 ng/mL ~ 400 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，所得校准曲线相关系数均在 0.999 以上，各校准点准确度在 91.9%~110.8% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。

关键词：婴幼儿奶粉 核苷酸 三重四极杆液质联用仪

核苷酸是一类由嘌呤碱或嘧啶碱、核糖或脱氧核糖以及磷酸三种物质组成的化合物，又称核甙酸。核苷酸可以增强婴儿的机体免疫力和抗感染能力，特别是在新生儿维持机体免疫系统功能、促进肠道成熟、肝脏的生长发育和代谢、脂质代谢等方面都发挥重要作用。由于牛乳、羊乳中核苷酸含量和母乳差距较大，所以部分婴幼儿配方奶粉中会添加核苷酸以达到与母乳更加接近的目的。目前婴幼儿配方奶粉中核苷酸的添加形式主要有 5 种，胞嘧啶核苷酸 (CMP)、尿嘧啶核苷酸 (UMP)、腺嘌呤核苷酸 (AMP)、鸟嘌呤核苷酸 (GMP) 和次黄嘌呤核苷酸 (IMP)。

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》中规定了核苷酸在婴幼儿配方食品中的添加量为 0.12 ~ 0.58 g/kg (以核苷酸总量计)。《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，CMP、AMP、UMP、GMP 和 IMP 的定量限分别为 3.3 mg/kg、5.0 mg/kg、5.0 mg/kg、5.0 mg/kg 和 6.7 mg/kg。

本文采用岛津三重四极杆液质 LCMS-8050 建立了 5 种核苷酸的测定方法，本方法分析时间短、灵敏度高、重现性好，适用于婴幼儿奶粉中核苷酸的检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20A

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

输液泵：LC-30AD

脱气机：DGU-20A_{SR}

工作站：Labsolutions Ver. 5.98

1.2 分析条件

1.2.1 液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST-HP C18-AQ (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm; P/N: 227-30936-02)

流速：0.35 mL/min

进样量：3 μL

柱温：20°C

流动相：A 相 - 水 (0.15% 甲酸)，B 相 - 乙腈 (0.15% 甲酸)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 2%，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.20	Pumps	B.Conc	2
2.30	Pumps	B.Conc	60
3.00	Pumps	B.Conc	60
3.10	Pumps	B.Conc	2
7.00	Controller	Stop	

1.2.2 质谱条件

分析仪器: LCMS-8050	DL 温度: 150°C
离子源: ESI (+)	加热模块温度: 400°C
雾化气流速: 3.0 L/min	接口温度: 350°C
干燥气流速: 10.0 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
加热气流速: 10.0 L/min	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
AMP	348.2	136.2*	-18	-22	-50
		119.1	-24	-55	-20
CMP	324.2	112.1*	-10	-22	-44
		95.0	-10	-54	-16
UMP	325.0	97.1*	-12	-20	-36
		69.1	-36	-38	-26
GMP	364.0	152.1*	-26	-18	-26
		135.1	-26	-44	-50
IMP	349.2	137.0*	-26	-14	-24
		97.0	-18	-28	-36

注: * 表示定量离子对

1.3 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 的标准中间溶液混合, 采用 0.01% 甲酸 - 水逐级稀释, 配制系列浓度标准工作溶液, UMP 浓度分别为 4 ng/mL、8 ng/mL、20 ng/mL、80 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL、1000 ng/mL 和 2000 ng/mL; AMP 浓度分别为 0.8 ng/mL、1.6 ng/mL、4 ng/mL、16 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、200 ng/mL 和 400 ng/mL; GMP、IMP 和 CMP 浓度分别为 2 ng/mL、4 ng/mL、10 ng/mL、40 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 和 1000 ng/mL。

■ 样品前处理

称取 0.5 g 奶粉样品于 50 mL 的离心管中, 加入 40 mL 温水 (50°C), 摇匀, 加入 0.5% 甲酸 - 水, 调节 pH 值到 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, 取上清液 250 μ L, 加入 0.01% 甲酸 - 水 750 μ L, 混匀, 采用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 备用。

■ 结果与讨论

3.1 标准溶液 MRM 色谱图

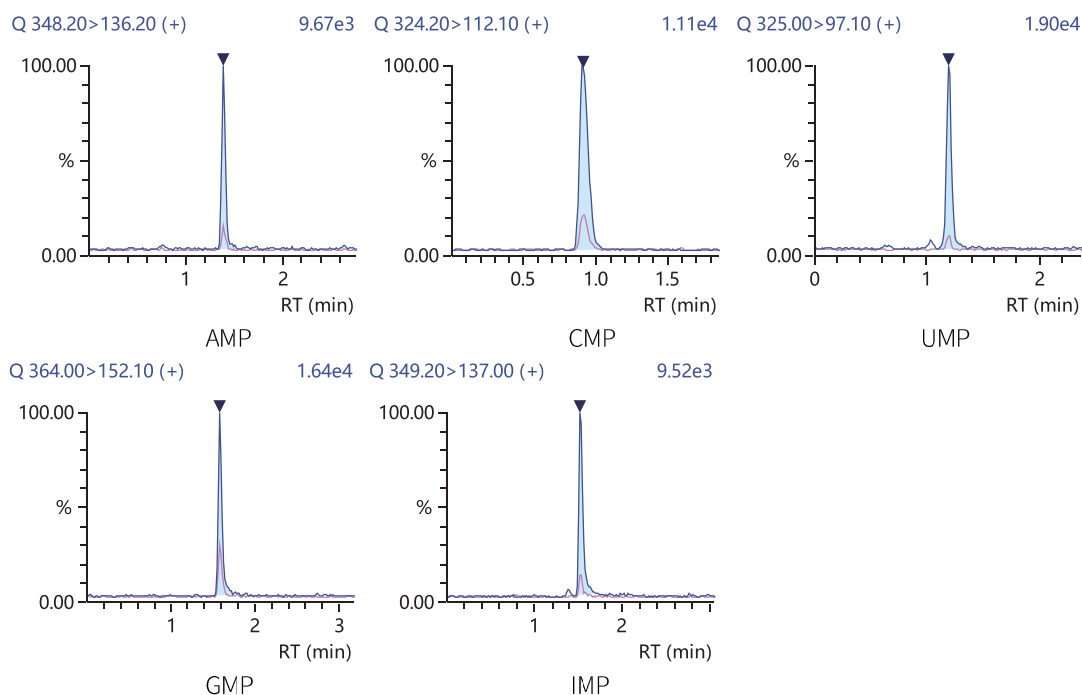


图 1 标准溶液 MRM 色谱图

3.2 线性范围、检出限和定量限

将 5 种核苷酸混合标准工作溶液,按“1.2 分析条件”进行测定,使用外标法定量。以定量离子峰面积为纵坐标,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。所得校准曲线线性关系良好,相关系数均大于 0.999,准确度在 91.9%~110.8% 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 3。

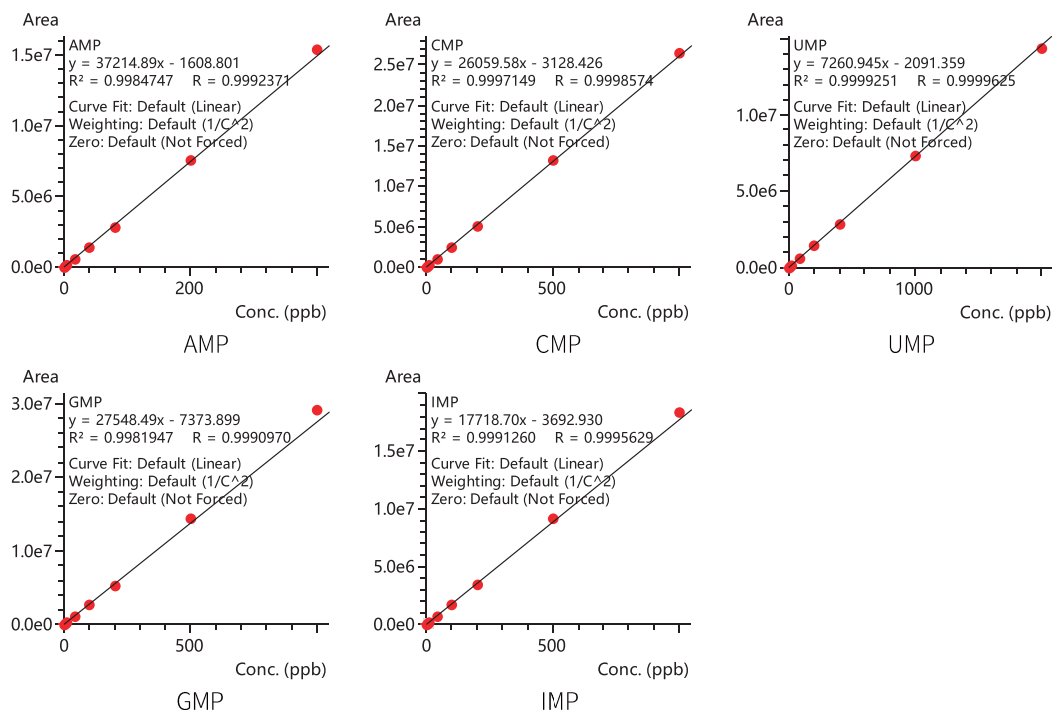


图 2 标准曲线

表 3 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 (ng/mL)	准确度 %	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
AMP	Y = 37214.89X - 1608.801	0.9992	0.8~400	93.6~108.6	0.03	0.08
CMP	Y = 26059.58X - 3128.426	0.9998	2~1000	95.7~104.3	0.05	0.16
UMP	Y = 7260.945X - 2091.359	0.9999	4~2000	95.2~105.3	0.30	1.00
GMP	Y = 27548.49X - 7373.899	0.9990	2~1000	91.9~110.8	0.06	0.20
IMP	Y = 17718.70X - 3692.93	0.9995	2~1000	92.5~107.7	0.08	0.25

3.3 精密度结果

采用 3 个浓度水平的混合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 4 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 0.18% ~ 1.32% 和 0.69% ~ 3.29% 之间，显示仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

目标物名称	理论浓度 (ng/mL)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	理论浓度 (ng/mL)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	理论浓度 (ng/mL)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
AMP	0.8	0.52	2.50	16	0.72	1.37	200	1.32	1.20
CMP	2	0.45	2.26	40	0.39	1.09	500	0.48	0.69
UMP	4	0.39	3.16	80	0.55	1.30	1000	0.92	0.97
GMP	2	0.19	3.29	40	0.58	0.76	500	0.85	1.77
IMP	2	0.18	2.91	40	0.57	0.94	500	0.91	1.43

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 0.5 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，按以下方式考察回收率。

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

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 5 所示，5 种核苷酸的加标回收率在 105.41~109.14% 之间。

表 5 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	60	103.16	108.52	103.72	103.20	111.17	102.70	105.41	3.37
CMP	100	105.70	102.67	108.39	108.60	108.62	108.43	107.06	2.28
UMP	50	109.16	108.27	106.54	112.23	107.76	110.88	109.14	1.93
GMP	20	110.83	106.12	102.09	105.69	105.69	104.83	105.87	2.68
IMP	30	103.19	111.24	107.85	110.33	109.48	112.22	109.05	2.97

3.5 样品测定结果

取市售 2 种品牌奶粉样品，每批次 6 份，按照“2. 样品前处理”方法处理及“1.2 分析条件”进行测定，结果见表 6，两品牌奶粉样品中核苷酸总量分别为 0.31 g/kg 和 0.19 g/kg，与产品包装标示量基本相符，满足国家标准《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）要求。

表 6 样品测定结果 (ng/mL)

目标物名称	品牌 1 平均值	品牌 1RSD%	总量 (g/kg)	品牌 2 平均值	品牌 2RSD%	总量 (g/kg)
AMP	642.7	1.95		232.3	0.78	
CMP	1375.1	0.74		1081.9	1.08	
UMP	559.6	1.23	0.31	322.1	1.48	0.19
GMP	193.3	0.93		176.2	2.38	
IMP	327.8	1.50		106.8	0.46	

■ 结论

本应用建立了采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 测定奶粉中核苷酸的检测方法。该方法分析时间短、回收率高、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

