

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241015002

引用格式: 薛彦伦, 王柏辉, 梁栋明, 等. 亲水/离子交换混合模式色谱法快速检测婴幼儿食品和乳品中核苷酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(2): 91–98.

XUE YL, WANG BH, LIANG DM, *et al.* Rapid determination of nucleotides content in infant formula and dairy product by mixed-mode hydrophilic interaction/ion exchange chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(2): 91–98. (in Chinese with English abstract).

亲水/离子交换混合模式色谱法快速检测婴幼儿 食品和乳品中核苷酸含量

薛彦伦, 王柏辉*, 梁栋明, 李英杰, 张 兴, 乔 轲, 苏妮汗

(鄂尔多斯市检验检测中心, 鄂尔多斯 017010)

摘 要: 目的 建立亲水/离子交换混合模式色谱-紫外检测法(hydrophilic interaction/ion exchange chromatography-ultraviolet detection, HILIC/IEC-UV)快速测定婴幼儿食品和乳制品中 5 种核苷酸(胞嘧啶核苷酸、腺嘌呤核苷酸、尿嘧啶核苷酸、鸟嘌呤核苷酸和次黄嘌呤核苷酸)含量的分析方法。**方法** 采用两性离子亲水作用色谱柱(Alphasil S-Xion), 以 5 mmol/L 磷酸二氢钾水溶液(磷酸调 pH 3.0)-乙腈(70:30, V:V)为流动相, 对婴幼儿食品和乳品中的核苷酸进行检测。**结果** 该方法在 10 min 内实现了 5 种核苷酸的高效分离, 5 种核苷酸在 2~50 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内线性关系良好, 检出限(limits of detection, LODs)为 0.19~0.66 mg/kg, 定量限(limits of quantification, LOQs)为 0.62~2.19 mg/kg。在 50、100、200 mg/kg 的加标水平, 5 种核苷酸的日内回收率为 96.6%~108.9%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 1.5%~6.3%, 日间回收率为 101.0%~108.0%, RSDs 为 2.4%~7.3%。**结论** 与传统的反相离子对色谱法相比, 本方法具有显著优势: 有效降低了样品基质干扰, 缩短了分析时间, 提高了检测效率, 特别是改善了胞嘧啶核苷酸的定量准确性。该方法快速、准确、抗干扰, 为婴幼儿食品和乳制品中核苷酸的高效分析提供了技术支持。

关键词: 婴幼儿配方食品; 乳制品; 亲水/离子交换混合模式色谱; 核苷酸

Rapid determination of nucleotides content in infant formula and dairy product by mixed-mode hydrophilic interaction/ion exchange chromatography

XUE Yan-Lun, WANG Bo-Hui*, LIANG Dong-Ming, LI Ying-Jie,
ZHANG Xing, QIAO Ke, SU Ni-Han

(Ordos City Inspection and Testing Center, Erdos 017010, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid method for the determination of 5 kinds of nucleotides (cytidine-5'-monophosphate, adenosine-5'-monophosphate, uridine-5'-monophosphate, guanosine-5'-monophosphate

收稿日期: 2024-10-15

第一作者: 薛彦伦(1985—), 男, 工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 280013801@qq.com

*通信作者: 王柏辉(1990—), 男, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为肉品科学和食品检测。E-mail: wbhsmile@126.com

and inosine-5'-monophosphate) in infant formulas and dairy products is developed based on mixed-mode hydrophilic interaction/ion exchange chromatography-ultraviolet detection (HILIC/IEX-UV). **Methods** A zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column (Alphasil S-Xion) was used, with mobile phase consisting of 5 mmol/L KH_2PO_4 (pH adjusted to 3.0 with H_3PO_4)-acetonitrile (70:30, V:V) to detect nucleotides in infant foods and dairy products. **Results** The five nucleotides were baseline separated within 10 min, demonstrating efficient chromatographic performance. They exhibited good linearity within the range of 2–50 $\mu\text{g/mL}$, with limits of detection (LODs) between 0.19 and 0.66 mg/kg, and limits of quantification (LOQs) ranging from 0.62 to 2.19 mg/kg. At spiked levels of 50, 100 and 200 mg/kg, the intraday recoveries ranged from 96.6% to 108.9%, with relative standard deviations (RSDs) of 1.5%–6.3%, while the interday recoveries were between 101.0% and 108.0%, with RSDs of 2.4%–7.3%. **Conclusions** Compared with the traditional reversed-phase ion-pair chromatography, this method has significant advantages: Effectively reducing the matrix interference, shortening the analysis time, improving the detection efficiency, and especially improving the quantitative accuracy of cytidine-5'-monophosphate. The proposed method is rapid, accurate, and anti-interference, which provides technical support for the efficient analysis of nucleotides in infant formulas and dairy products.

KEY WORDS: infant formula; dairy product; hydrophilic interaction/ion exchange chromatography; nucleotide

0 引言

核苷酸是人体所需的一类重要的免疫物质,能帮助激活淋巴细胞活力,提高免疫球蛋白水平,参与了人体几乎全部生理代谢过程^[1]。经研究,母乳中含有胞嘧啶核苷酸(胞苷酸, cytidine-5'-monophosphate, CMP)、腺嘌呤核苷酸(腺苷酸, adenosine-5'-monophosphate, AMP)、尿嘧啶核苷酸(尿苷酸, uridine-5'-monophosphate, UMP)、鸟嘌呤核苷酸(鸟苷酸, guanosine-5'-monophosphate, GMP)和次黄嘌呤核苷酸(肌苷酸, inosine-5'-monophosphate, IMP)等多种核苷酸,为提高婴幼儿的免疫调节功能和记忆力发挥着重要作用^[2-3]。由于牛乳中核苷酸含量很低,我国 GB 14880—2012《食品营养强化剂使用标准》对婴幼儿配方食

品中上述 5 种核苷酸的添加量做出了明确规定,以核苷酸总量计,其添加量应达到 0.12~0.58 g/kg。为保证婴幼儿的健康成长,有必要进行婴幼儿配方食品和乳品中的核苷酸含量测定。

核苷酸主要由嘌呤碱/嘧啶碱、核糖/脱氧核糖和磷酸组成(图 1)。目前,液相色谱法、液相色谱-质谱法、毛细管电泳法等方法均可用于核苷酸的定量分析^[4-7]。由于核苷酸作为营养强化剂的规定添加量较高,实际应用中多采用高效液相色谱法进行定量分析,包括离子交换色谱^[7-9]、反相离子对色谱^[10-11]和极性修饰反相色谱^[12-15]等。然而,这些分析方法各有局限性。例如,离子交换色谱易受缓冲盐浓度和 pH 影响,实际样品分析中需严格控制流动相 pH 以避免基质干扰^[16];反相离子对色谱虽可增强核苷酸的保留,

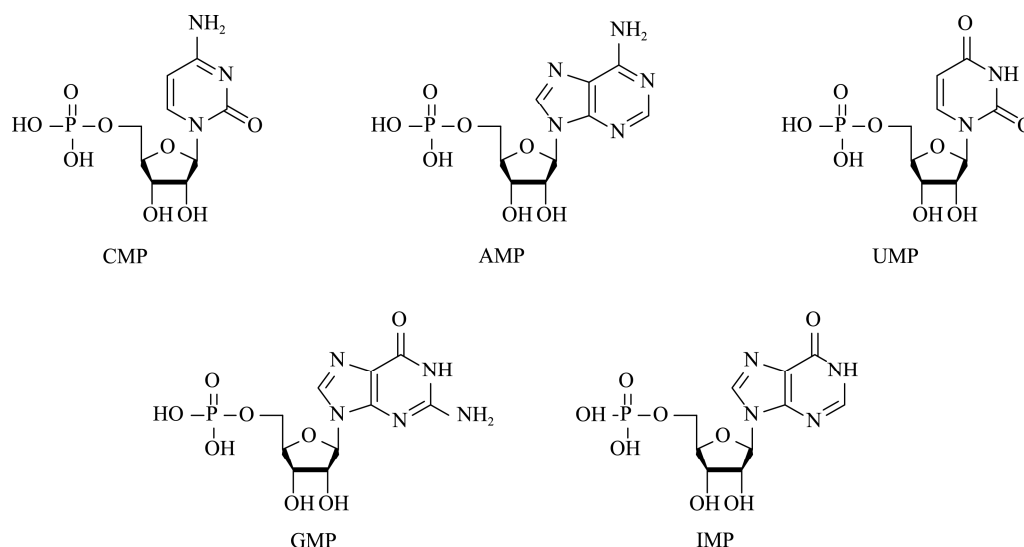


图 1 核苷酸结构式

Fig.1 Chemical structures of the nucleotides

但存在平衡时间长、柱寿命低、保留时间不稳定等问题,限制了其应用^[17];尹丽雨等^[12]和郑红等^[13]采用极性修饰反相 C₁₈ 色谱柱,在纯水相条件下分析了 5 种核苷酸,并系统考察了多种样品前处理方法以降低基质干扰。然而,无论是离子对色谱法还是极性反相色谱法,文献报道的检测结果显示 CMP 保留弱且易受基质干扰,导致无法准确定量^[18-20]。

自 1990 年 ALPERT 提出亲水相互作用色谱法(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)以来,分析科学家开发了大量的 HILIC 固定相^[21-23],并对 HILIC 的保留行为进行了深入研究^[24-26],目前该分离模式已广泛应用于糖、糖肽、糖蛋白、极性药物等强极性化合物的分离^[27-29]。鉴于核苷酸具有强极性和电离特性, HILIC 模式可实现其直接保留,避免添加离子对试剂带来的不利影响。然而,目前 HILIC 模式在核苷酸分离方面的研究报道仍然较少^[30-32],在分离选择性和抗基质干扰方面有一定局限。本研究选用一种表面同时键合氨基和羧基的两性离子亲水作用色谱固定相,对 5 种核苷酸的保留机制进行深入研究,建立了婴幼儿配方食品和乳品中核苷酸的快速分析方法,以期为婴幼儿食品质量监控提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

各品牌婴幼儿配方乳粉及成人乳制品购买自本地超市,空白奶粉样品由国内某乳品生产企业研发部门提供,该样品为企业内部质控使用,可确保无待测核苷酸存在。

CMP(纯度 99%, CAS: 63-37-6)、AMP(纯度 98%, CAS: 61-19-8)、UMP(纯度 98%, CAS: 58-97-9)、乙腈(纯度 99.9%)(上海阿拉丁生化科技有限公司); GMP(纯度 97%, CAS: 85-32-5)(上海泰坦科技股份有限公司); IMP(纯度 98%, CAS: 131-99-7)(北京曼哈格生物科技有限公司); 磷酸氢二钾(纯度 99%)、乙酸铵(纯度 98%)、甲酸(纯度 98%)(北京百灵威科技有限公司); 甲酸铵(纯度 99%)、磷酸(纯度 98%)(天津市大茂化学试剂厂); 醋酸(纯度 99.8%, 西陇科学股份有限公司); 淀粉酶(酶活度 1.5 U/mg, 西格玛奥德里奇贸易有限公司); 超纯水由实验室纯水机制得,电阻率 18.2 MΩ·cm。

Acchrom S6000 型高效液相色谱仪(配有四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、UV 检测器)、Alphasil S-Xion 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Alphasil VC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)[华谱科仪(北京)科技有限公司]; Milli-Q EQ 7008 型超纯水系统(美国 Millipore 公司); XM-P101H 型超声波清洗仪[小美超声仪器(昆山)有限公司]; Seven Direct SD20 型 pH 计、ML104T 102 型电子天平(精度 0.0001 g)[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

分别准确称取 10 mg(精确至 0.1 mg)核苷酸标准品 CMP、AMP、UMP、IMP 和 GMP 至 5 个 10 mL 棕色容量瓶中,用超纯水溶解并定容,配制成 1 mg/mL 的核苷酸单标储备液,放置于 4 °C 冰箱中避光保存(有效期 30 d)。

分别准确移取各单标储备液 1 mL 至 1 个 10 mL 棕色容量瓶中,用水定容,配制成 100 μg/mL 的混合标准工作溶液。用水对混合标准工作溶液进行逐级稀释,配制成 2、5、10、20、50 μg/mL 的标准溶液(有效期 7 d),作为外标法定量的工作曲线。

1.2.2 样品前处理

样品前处理按 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》中的“5.1 试样制备”来进行。

(1) 试样预处理

含淀粉的试样:称取混合均匀的固体试样约 5 g(精确至 0.1 mg)于 100 mL 锥形瓶中,加入约 0.2 g 淀粉酶,加入 20 mL 热水(30~40 °C)充分溶解试样,或称取混合均匀的液体试样约 20 g(精确至 1 mg)于 100 mL 锥形瓶中,加入约 0.2 g 淀粉酶摇匀,于(37±2) °C 培养箱内酶解 30 min。取出冷却至室温。

不含淀粉的试样:称取混合均匀的固体试样约 5 g(精确至 0.1 mg)于 100 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 热水(50~60 °C)充分溶解试样,冷却至室温,或称取混合均匀的液体试样约 20 g(精确至 1 mg)于 100 mL 锥形瓶中。

(2) 待测液的制备

用醋酸溶液调节试样溶液 pH 至 4.1,移入 50 mL 容量瓶中,定容,滤纸过滤,所得滤液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,待上机使用。

1.2.3 色谱条件

色谱柱: Alphasil S-Xion 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 5 mmol/L 磷酸氢二钾(用磷酸调 pH 为 3.0); 流动相 B: 乙腈; 等度洗脱: A:B=70:30 (V:V); 流速: 1.0 mL/min; 进样体积: 10 μL; 柱温 40 °C; 紫外检测波长: 254 nm; 以保留时间定性,外标法定量。

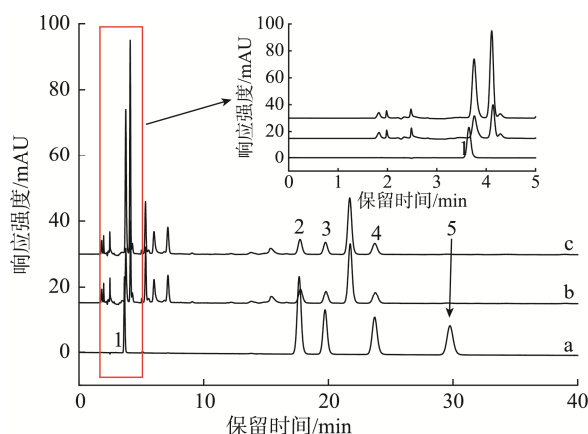
1.3 数据处理

采用华谱科仪 Chromloong 色谱软件采集液相色谱原始数据,并进行目标化合物的积分和信噪比计算。使用 Microsoft Excel 2019 进行线性方程、回收率和相对标准偏差的计算。回收率和精密度的测定中,每个加标浓度设置 6 个平行样,日内重复性分析当日完成,日间重复性连续测定 3 d(共 18 个平行样)。本研究中化学结构式使用 ChemBioDraw 14.0 绘制,色谱图和保留行为变化趋势图使用 Origin 2019 绘制。

2 结果与分析

2.1 分析方法的建立

5 种核苷酸为强极性、可电离化合物。在本研究中采用 Alphasil VC-C₁₈ 色谱柱, 并通过在流动相中添加离子对试剂四丁基硫酸氢铵实现了核苷酸的分离, 结果如图 2 所示。然而, 在该条件下, CMP 的保留能力较弱(图 2a), 在实际样品分析中容易受到基质干扰, 并可能导致 CMP 的保留时间发生漂移(图 2b)。进一步实验发现, 在处理后的实际样品中添加 CMP 会导致两个峰信号同时增强(图 2c), 这些干扰显著增加了 CMP 定性 with 定量分析的难度和不确定度。



注: a. 核苷酸标准溶液; b. 实际样品; c. 在实际样品 b 中继续加标 CMP; 溶剂: 1. CMP; 2. AMP; 3. UMP; 4. GMP; 5. IMP。

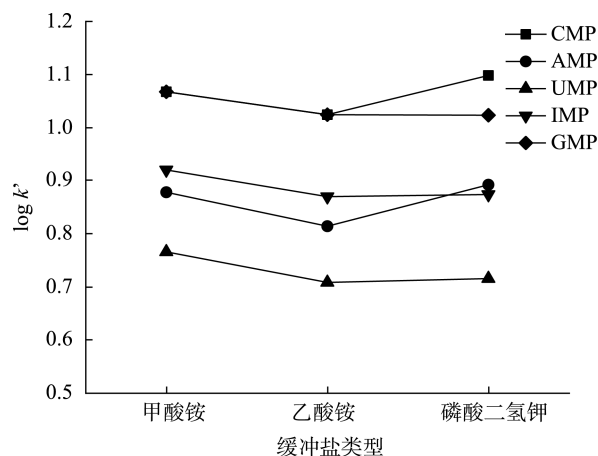
色谱条件: 色谱柱: Alphasil VC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 10 mmol/L 磷酸二氢钾+1.4 mmol/L 四丁基硫酸氢铵, 用 100 mmol/L 磷酸氢二钾调节 pH 至 3.2; 流动相 B: 甲醇; 等度洗脱, A:B=96:4 (V:V); 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 254 nm; 柱温: 25 °C。

图 2 采用 Alphasil VC-C₁₈ 色谱柱分离核苷酸的色谱图
Fig.2 Chromatograms of the nucleotides separated on an Alphasil VC-C₁₈ column

为解决上述问题, 本研究采用两性离子亲水作用色谱柱(Alphasil S-Xion), 在 HILIC 模式下对核苷酸进行保留, 通过考察缓冲盐类型、有机相比例、缓冲盐 pH、缓冲盐浓度等因素对核苷酸保留的影响, 确定核苷酸在该色谱柱上的保留机制, 并最终建立核苷酸的最佳分离方法。

2.1.1 缓冲盐类型的影响

实验首先考察了不同缓冲盐类型对 5 种核苷酸分离的影响(图 3)。从各化合物的 $\log k'$ 值来看, 使用甲酸铵或乙酸铵作为缓冲盐时, 核苷酸峰的分离选择性基本一致, 均无法实现 CMP 和 GMP 的有效分离。然而, 采用磷酸二氢钾作为缓冲盐时, 这两个化合物之间的分离效果得到了显著改善。此外, 磷酸二氢钾的使用对 UMP 和 IMP 的分离选择性也有所不同。因此, 磷酸二氢钾作为添加剂更有利于实现 5 种核苷酸的选择性分离。

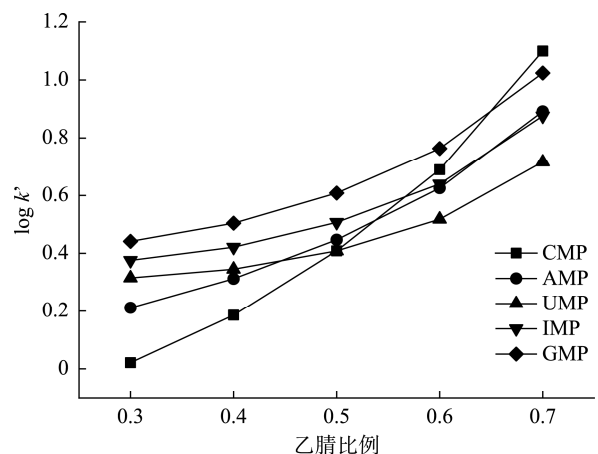


注: 色谱条件: 色谱柱: Alphasil S-Xion (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 10 mmol/L 甲酸铵(甲酸调 pH 3.0)或 10 mmol/L 乙酸铵(乙酸调 pH 3.0)或 10 mmol/L 磷酸二氢钾(磷酸调 pH 3.0); 流动相 B: 乙腈; 等度洗脱, A:B=30:70 (V:V); 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C。

图 3 不同缓冲盐类型条件下核苷酸的保留与分离情况
Fig.3 Retention and separation of nucleotides under different buffer salt types

2.1.2 有机相比例的影响

采用 10 mmol/L 磷酸二氢钾(pH 3.0)为缓冲盐, 考察不同有机相比例条件下各核苷酸的保留和分离情况(图 4)。结果可见, 随着乙腈比例的降低, 核苷酸的保留值整体呈现降低的趋势, 表现出显著的亲水保留行为。此外, 各核苷酸的分离选择性也发生了变化, 如 CMP 的保留值由最强变为最弱, 而 UMP 的保留值由最弱变为居中。由于 S-Xion 色谱柱表面同时键合有氨基与羧基基团, 随着水



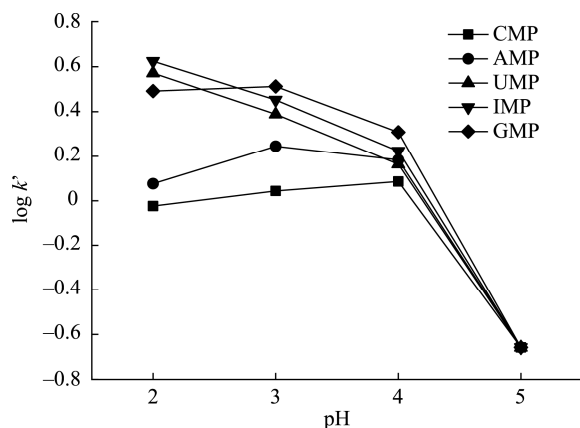
注: 色谱条件: 色谱柱: Alphasil S-Xion (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 10 mmol/L 磷酸二氢钾(磷酸调 pH 3.0); 流动相 B: 乙腈; 流动相 C: 水; 等度洗脱, 保持 30% A 恒定, B 相的比例如图 4 所示, 并由 C 相将总比例补齐至 100%; 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C。

图 4 不同乙腈比例条件下核苷酸的保留与分离情况
Fig.4 Retention and separation of nucleotides under different acetonitrile ratio conditions

相比比例升高, 核苷酸与两性离子 S-Xion 固定相均表现出较显著的电离状态, 二者之间的离子交换作用带来了分离选择性的差异。为更清楚地阐明离子交换作用的影响, 下面将重点考察缓冲盐 pH 和浓度对 5 种核苷酸保留的影响。

2.1.3 缓冲盐 pH 的影响

图 5 展示了核苷酸在不同缓冲盐 pH 条件下的保留行为, 从整体趋势来看, 在低 pH 条件下各核苷酸保留值相对较高, 随着缓冲盐 pH 的升高, 核苷酸保留值逐渐减弱直至不保留。由于 S-Xion 固定相表面的氨基和羧基均可电离, 在低 pH 条件(如 pH 2)下, S-Xion 表面氨基被激活而羧基被抑制, 与核苷酸中的磷酸基团产生静电吸引作用; 而随着 pH 升高, S-Xion 表面氨基被抑制而羧基被激活, 与核苷酸中的磷酸基产生静电排斥作用而导致其保留的丧失。对于 CMP、AMP、GMP 表现出的保留值随 pH 升高略有升高再显著下降的趋势, 则可能是由于其结构中碱基的碱性较强, 在低 pH 条件下碱基被电离并在一定程度上抵消了固定相表面氨基与核苷酸结构中羧基的静电吸引作用。



注: 色谱条件: 色谱柱: Alphasil S-Xion (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 10 mmol/L 磷酸二氢钾(磷酸调 pH 2.0、3.0、4.0、5.0); 流动相 B: 乙腈; 等度洗脱, A:B=70:30 (V:V); 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C。

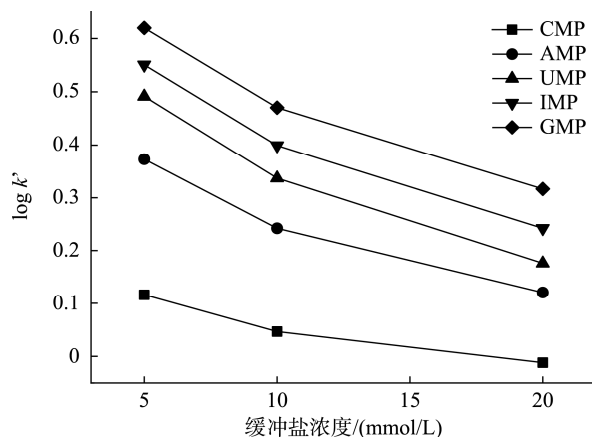
图 5 不同缓冲盐 pH 条件下核苷酸的保留与分离情况

Fig.5 Retention and separation of nucleotides under different buffer pH conditions

2.1.4 缓冲盐浓度的影响

在 30% 乙腈比例及 pH 3.0 条件下, 考察不同缓冲盐浓度对核苷酸保留的影响。从图 6 结果可见, 随着流动相中缓冲盐浓度的升高, 所有核苷酸的保留均呈现下降的趋势, 即呈现出显著的离子交换作用。

通过对缓冲盐类型、乙腈比例、缓冲盐 pH、缓冲盐浓度的系统考察, 结果可知, 采用磷酸盐为缓冲盐, 并在较低乙腈比例条件下, 可以更好地实现 5 种核苷酸的选择性分离。在该分离条件下, 核苷酸的保留行为呈现典型的亲水/阴离子交换混合模式色谱的原理。



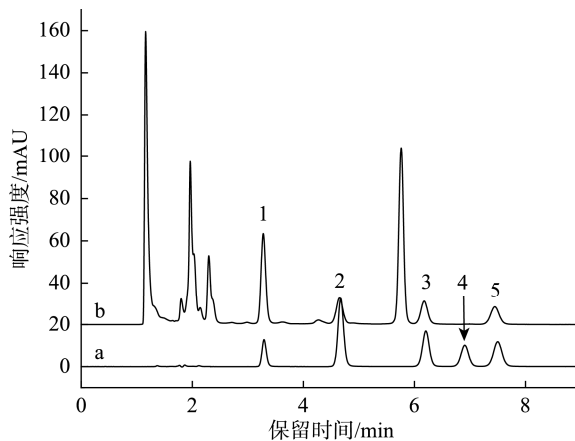
注: 色谱条件: 色谱柱: Alphasil S-Xion (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 5、10 或 20 mmol/L 磷酸二氢钾(磷酸调 pH 3.0); 流动相 B: 乙腈; 等度洗脱, A:B=70:30 (V:V); 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C。

图 6 不同缓冲盐浓度条件下核苷酸的保留与分离情况

Fig.6 Retention and separation of nucleotides under different buffer concentrations

2.1.5 色谱分析方法的建立

综合上述讨论结果, 并充分考虑实际样品分析中可能存在的基质干扰, 优化并确定了最佳色谱分离条件(详见 1.2.3)。在该最佳条件下, 各核苷酸与潜在基质干扰实现了良好的分离, 如图 7 所示。实验结果表明, 该方法有效避免了样品基质对核苷酸检测的干扰。更重要的是, 所有目标核苷酸均能在 10 min 内实现快速分离和检测, 显著提升了分析效率。



注: a. 核苷酸标准溶液; b. 实际样品; 溶质: 1. CMP; 2. AMP; 3. UMP; 4. IMP; 5. GMP。

图 7 核苷酸标准品及实际样品分析色谱图

Fig.7 Analysis chromatograms of nucleotide standards and actual sample

2.2 方法学考察

2.2.1 线性范围和检出限

将 1.2 小节配制的不同浓度标准溶液重复分析 3 次,

用所得到的峰面积平均值(Y)为纵坐标, 核苷酸的质量浓度(X, $\mu\text{g/mL}$)为横坐标建立回归曲线, 结果表明 5 种核苷酸在 2~50 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好, 线性相关系数(r^2)均可达到 0.9999。以信噪比(signal to noise ratio, S/N)大于等于 3 为检出限(limits of detection, LODs), S/N 大于等于 10 为定量限(limits of quantification, LOQs), 5 种核苷酸的 LODs 在 0.19~0.66 mg/kg 之间, LOQs 在 0.62~2.19 mg/kg 之间, 均可满足定量检测的要求。相关结果如表 1 所示。

2.2.2 回收率和精密度

为了评估方法的准确性和精密度, 在空白奶粉基质中添加了 3 个浓度水平(50、100 和 200 mg/kg)的核苷酸标准品, 每个浓度平行测定 6 次, 计算日内回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。通过连续 3 d 重

复上述实验, 进一步评估了日间回收率和 RSDs。结果显示(表 2), 该方法的日内回收率在 96.6%~108.9%之间, RSDs 在 1.5%~6.3%之间; 日间回收率范围为 101.0%~108.0%, RSDs 为 2.4%~7.3%。结果表明该方法具有良好的准确性和重复性, 适用于核苷酸的定量分析。

2.3 实际样品分析

按照本研究建立的方法, 对市场上多个不同品牌的婴幼儿配方食品和乳制品中的核苷酸含量进行测定, 结果列于表 3 中。从结果可见, 对于标识有核苷酸含量的样品, 其检测结果基本与标示量一致, 且添加量以 CMP 为主。对于未标识添加量的成人乳制品, 仅从中检测到了少量 CMP, 而 AMP、UMP、IMP、GMP 未检出。

表 1 5 种核苷酸的线性方程、相关系数、LODs 和 LOQs
Table 1 Linear equations, correlation coefficients, LODs, and LOQs for 5 kinds of nucleotides

分析物	线性方程	相关系数(r^2)	LODs/(mg/kg)	LOQs/(mg/kg)
CMP	$Y=8057X-1149$	0.9999	0.40	1.33
AMP	$Y=27356X-3208$	0.9999	0.19	0.62
UMP	$Y=17789X-2214$	0.9999	0.41	1.37
IMP	$Y=11886X-1501$	0.9999	0.66	2.19
GMP	$Y=15586X-2013$	0.9999	0.60	1.99

表 2 婴儿配方食品中核苷酸的回收率和精密度
Table 2 Recoveries and precisions of nucleotides in infant formula

分析物	浓度/(mg/kg)	日内($n=6$)		日间($n=18$)	
		回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
CMP	50	102.8	5.4	103.3	3.3
	100	103.1	4.1	101.0	4.1
	200	102.6	2.3	103.0	3.9
AMP	50	104.8	6.3	104.9	4.9
	100	104.4	3.5	103.1	2.9
	200	105.4	1.5	104.6	5.4
UMP	50	107.3	6.0	108.0	3.9
	100	97.5	4.4	102.0	4.3
	200	96.6	1.7	102.4	7.3
IMP	50	107.6	5.1	107.1	4.3
	100	104.0	3.4	103.4	2.4
	200	104.9	1.9	104.5	6.1
GMP	50	108.9	5.2	106.8	5.1
	100	104.2	3.4	102.1	3.7
	200	104.7	1.9	104.5	6.0

表 3 实际样品分析结果
Table 3 Actual sample analysis results

序号	标定量/(mg/kg)	核苷酸含量/(mg/kg)					
		CMP	AMP	UMP	IMP	GMP	总量
1	300	151.4	65.0	73.0	25.2	38.6	353.2
2	350	247.0	39.4	50.8	N.D.	61.6	398.8
3	300	125.3	60.9	67.7	42.6	25.1	321.6
4	N.A.	41.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	41.5
5	N.A.	32.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	32.9
6	N.A.	21.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	21.1

注: N.A.: 表示标签中未给出核苷酸添加量; N.D.: 表示未检出(含量低于方法 LODs)。

3 讨论与结论

本研究开发了一种高效、准确地测定婴幼儿配方食品和乳制品中核苷酸的分析方法。该方法采用亲水作用两性离子色谱柱, 在亲水/离子交换混合模式条件下实现了 5 种核苷酸的快速分离分析。相较于传统的反相离子对色谱方法, 本方法具有显著优势: 首先, 它有效降低了样品基质干扰, 提高了分析结果的可靠性; 其次, 分析时间大幅缩短, 显著提升了检测效率; 最后, 本方法特别改善了 CMP 的定量准确性, 解决了传统方法中 CMP 易受干扰的问题。综上所述, 本研究建立的核苷酸检测方法具有快速、准确、抗干扰等优点, 为婴幼儿配方食品和乳制品中核苷酸的高效分析提供了有力的技术支持, 在食品安全监管、营养评估等相关领域具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] WELIN M, NORDLUND P. Understanding specificity in metabolic pathways—Structural biology of human nucleotide metabolism [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 396(1): 157–163.

[2] LEACH JL, BAXTER JH, MOLITOR BE, *et al.* Total potentially available nucleosides of human milk by stage of lactation [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1995, 61(6): 1224–1230.

[3] HODGKINSON A, WALL C, WANG W, *et al.* Nucleotides: An updated review of their concentration in breast milk [J]. Nutrition Research, 2022, 99: 13–24.

[4] INOUE K, OBARA R, AKIBA T, *et al.* Determination of nucleotides in infant formula by ion-exchange liquid chromatography [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(16): 6863–6867.

[5] 肖伟敏, 刘文丽, 张协光, 等. 阴离子交换高效液相色谱法测定婴幼儿食品与乳制品中的核苷酸[J]. 分析测试学报, 2018, 37(8): 962–966.

XIAO WM, LIU WL, ZHANG XG, *et al.* Determination of nucleotides in foods and milk products for infants and young children by anion exchange high performance liquid chromatography [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2018, 37(8): 962–966.

[6] VIÑAS P, CAMPILLO N, LÓPEZ-GARCÍA I, *et al.* Anion exchange liquid chromatography for the determination of nucleotides in baby and/or functional foods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(16): 7245–7249.

[7] STREZSAK SR, BEUNING PJ, SKIZIM NJ. Versatile separation of nucleotides from bacterial cell lysates using strong anion exchange chromatography [J]. Journal of Chromatogry Banalytical Technologies in the Biomedical and Life Science, 2022, 1188: 123044.

[8] TOMIYA N, AILOR E, LAWRENCE SM, *et al.* Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosylation by high-performance anion-exchange chromatography: Sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells [J]. Analytic Biochemistry, 2001, 293(1): 129–137.

[9] KRPAN M, VAHČIĆ N, HRUŠKAR M. Validation of an HPLC method for the determination of nucleotides in infant formulae [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2009, 32(18): 2747–2755.

[10] 杨璐桐, 于苗, 郭志恒, 等. 高效液相色谱法测定母乳及牛乳中总核苷酸含量[J]. 食品科学, 2021, 42(20): 216–221.

YANG LT, YU M, GUO ZH, *et al.* Determination of total nucleotide content in breast milk and cow milk by high performance liquid chromatography [J]. Food Science, 2021, 42(20): 216–221.

[11] NAKAJIMA K, KITAZUME S, ANGATA T, *et al.* Simultaneous determination of nucleotide sugars with ion-pair reversed-phase HPLC [J]. Glycobiology, 2010, 20(7): 865–871.

[12] 尹丽丽, 李珊, 周传静, 等. 固相萃取-液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中的游离核苷酸[J]. 色谱, 2019, 37(12): 1349–1355.

YIN LL, LI S, ZHOU CJ, *et al.* Determination of free nucleotides in infant formula by solid phase extraction-liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(12): 1349–1355.

[13] 郑红, 于文江, 薛霞, 等. 高效液相色谱法同时测定婴幼儿配方奶粉中 5 种游离核苷酸[J]. 分析试验室, 2018, 37(1): 74–78.

ZHENG H, YU WJ, XUE X, *et al.* Determination of five free nucleotides in infant formula by HPLC [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2018, 37(1): 74–78.

[14] 王川丕, 孙文闪, 董叶箐, 等. 复合固相萃取净化-液相色谱法同时测定奶粉中的 5 种核苷酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(15): 5997–6002.

- WANG CP, SUN WS, DONG YJ, *et al.* Simultaneous determination of 5 kinds of nucleotides in milk powder by liquid chromatography with composite solid phase extraction [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(15): 5997–6002.
- [15] 白玮丽, 陈俊辰, 林欣怡, 等. 高效液相色谱法同时测定烟酰胺单核苷酸中 5 种有关物质[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(1): 182–188.
- BAI WL, CHEN JC, LIN XY, *et al.* Simultaneous determination of 5 kinds of related substances in nicotinamide mononucleotide by high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(1): 182–188.
- [16] 孙姗姗, 刘文婧, 张隆龙, 等. 三重四级杆串联质谱法测定乳粉类产品中 5 种核苷酸的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(3): 983–990.
- SUN SS, LIU WJ, ZHANG LL, *et al.* Determination of 5 kinds of nucleotides in milk powder by triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2016, 7(3): 983–990.
- [17] 陈晶燕, 陈万勤, 王峰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿奶粉中核苷酸[J]. *质谱学报*, 2021, 42(1): 93–100.
- CHEN JY, CHEN WQ, WANG F, *et al.* Determination of nucleotides in infant milk powder by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2021, 42(1): 93–100.
- [18] GILL BD, INDYK HE, MANLEY-HARRIS M. Analysis of nucleosides and nucleotides in infant formula by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(15): 5311–5319.
- [19] DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ J, MATEOS-VIVAS M, RODRÍGUEZ-GONZALO E, *et al.* Determination of nucleosides and nucleotides in food samples by using liquid chromatography and capillary electrophoresis [J]. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 2017, 92: 12–31.
- [20] GELDART SE, BROWN PR. Analysis of nucleotides by capillary electrophoresis [J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 828(1): 317–336.
- [21] ALPERT AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds [J]. *Journal of Chromatography A*, 1990, 499: 177–196.
- [22] BUSZEWSKI B, NOGA S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402(1): 231–247.
- [23] QIAO L, SHI X, XU G. Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography [J]. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 81: 23–33.
- [24] DINH NP, JONSSON T, IRGUM K. Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(35): 5880–5891.
- [25] MCCALLEY DV. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1523: 49–71.
- [26] KAWACHI Y, IKEGAMI T, TAKUBO H, *et al.* Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(35): 5903–5919.
- [27] 张丹丹, 矫芮文, 米春孝, 等. 用于分离单糖与寡糖的亲水色谱材料制备及应用进展[J]. *食品科学*, 2024, 45(9): 261–271.
- ZHANG DD, JIAO RW, MI CX, *et al.* Research progress in the preparation and applications of hydrophilic chromatographic materials for separation of monosaccharides and oligosaccharides [J]. *Food Science*, 2024, 45(9): 261–271.
- [28] RADOIČIĆ A, ŠEGAN S, DRAMIĆANIN A, *et al.* Hydrophilic interaction liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical formulations [J]. *Current Analytical Chemistry*, 2024, 20(5): 295–317.
- [29] RAFIQUE S, YANG S, SAJID MS, *et al.* A review of intact glycopeptide enrichment and glycan separation through hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase materials [J]. *Journal of Chromatography A*, 2024, 1735: 465318.
- [30] INOUE K, OBARA R, HINO T, *et al.* Development and application of an HILIC-MS/MS method for the quantitation of nucleotides in infant formula [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(18): 9918–9924.
- [31] SFAKIANAKI AG, STALIKAS CD. Selective microextraction of mononucleotides from milk using alumina and stannia hollow fibers prior to their determination by hydrophilic interaction liquid chromatography-diode array detection [J]. *Food Chemistry*, 2015, 184: 188–195.
- [32] 励炯, 王姣斐, 邱红钰, 等. 改进的高效液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中 5 种核苷酸[J]. *色谱*, 2017, 35(8): 832–836.
- LI J, WANG JF, QIU HY, *et al.* Determination of five nucleotides in infant formula milk powder by modified high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2017, 35(8): 832–836.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)