

反相高效液相色谱法测定 乳制品中核苷酸方法的研究

郝岩平 姜金斗

(国家乳制品质量监督检验中心, 哈尔滨 150086)

胡向蔚

(中国食品发酵工业研究院, 北京 100027)

摘要:建立了高效液相色谱法测定乳制品中核苷酸含量的方法。采用紫外检测器, 波长为 254nm; 色谱柱为迪马钻石 C₁₈, 柱温为 25 °C, 流动相为 ① 0.01mol/L K₂HPO₄ 960ml + 0.1mol/L K₂H₂PO₄ 40ml pH5; 测定腺嘌呤核苷(AMP)、鸟嘌呤核苷(GMP)、次黄嘌呤核苷(IMP)。② 乙腈: (0.01mol/L KH₂PO₄ + 0.005mol/L K₂HPO₄ + 1mmol/L 四丁基溴化氨, 磷酸调 pH5.0) = 5:95, 测定胞嘧啶核苷(CMP)、尿嘧啶核苷(UMP)。流速为 1.0ml/min。五种核苷酸组分。标准曲线相关系数 r 为 CMP 0.9868; UMP 0.9879; GMP 0.9792; IMP 0.9799; AMP 0.9553; 回收率为 94.6%; 8 次样品重复测定变异系数为 1.79%。

关键词: 高效液相色谱, 核苷酸, 乳制品

Research on the Determination Method of Nucleotides in Dairy by HPLC

Hao Yanping, Jiang Jindou

(Nation Dairy Testing Center, Harbin 150086)

Hu Xiangwei

(China National Academy of Food & Fermentation Industries, Beijing 100027)

Abstract: A method for determination of nucleotides in dairy by HPLC is reported. Ultraviolet detector, Dikma - C₁₈ column was used with column temperature 25 °C. Mobile phase ① 0.01mol/L KH₂PO₄ 960ml + 0.1mol/L K₂HPO₄ 40ml pH5 was used for AMP, GMP, IMP; ② ACN: (0.01mol/L KH₂PO₄ + 0.005mol/L K₂HPO₄ + 1mmol/L C₁₆H₃₆BrN, pH5.0) = 5:95 was used for CMP, UMP. The speed of mobile phase was 1.0ml/min. The relative coefficient was CMP 0.9868, UMP 0.9879, GMP 0.9792, IMP 0.9799, AMP 0.9553, the recovery was 94.6%; the CV in 8 sample testing was 1.79%.

Key words: HPLC, Nucleotides, Dairy

0 引言

核苷酸是构成核酸的成分, 目前在乳制品中主

要用于婴幼儿配方奶粉中。作为添加剂添加的核苷酸主要有五种——胞嘧啶核苷(CMP)、尿嘧啶核苷(UMP)、腺嘌呤核苷(AMP)、鸟嘌呤核苷

(GMP)、次黄嘌呤核苷(IMP)。另外还可以加入到饮料、焙烤食品以及各种主、副食品和饮品中。核苷酸的主要生理功能是广泛参与人体的能量代谢、蛋白质合成,具有提高各种酶的活性、活化细胞功能、促进抗体形成、增强免疫功能的作用。对人体来说有很好的保健作用,它们可促进神经细胞的生长发育,是与“神经生长因子”有关或者可以作为神经生长物质利用的营养成分。促进铁质吸收及影响脂质代谢,改变肠道菌丛及提供肠道黏膜完整所需的营养,达到提升免疫功能的效果。一些临床上的研究发现,添加核苷酸的婴儿配方奶粉,可减少腹泻的发生及促进较小胎儿的生长发育。

牛奶中一般不含有核苷酸,在目前实施的婴幼儿配方奶粉国家标准中未规定这项指标;但根据核苷酸对婴幼儿的特殊功效,许多企业特别是国外独资或合资和我国大型乳品企业的标准中都作为重要指标,为此必须尽快研究制定适用于乳制品的检测方法。目前报道的检测方法主要有微生物法、紫外分光光度法、高效液相色谱法^{[1][2][3]}等,但大部分都是针对核苷酸添加剂所制定的方法,对于像乳制品成分复杂的样品尚无适宜的方法。本研究就是在收集有关资料的基础上,结合乳制品样品的特点,选择高效液相色谱法开展研究,建立高效液相色谱法测定乳制品中核苷酸的简便、快速、准确的检验方法。

1 实验仪器与材料

1.1 主要仪器

Waters 1525 高效液相色谱仪, Waters 2487 紫外检测器, Millennium³² 色谱工作站, 超声波等。

1.2 试验用试剂

四丁基溴化氨($C_{16}H_{36}BrN$), 乙腈(色谱纯), 磷酸氢二钾, 磷酸二氢钾, 冰乙酸, 甲醇(色谱纯), 磷酸, CMP、UMP、AMP、GMP(二钠盐)、(IMP)(二钠盐)(购自 Sigma 公司)。

1.3 试验材料

核苷酸添加剂、含核苷酸的婴幼儿配方奶粉

2 试验方法

HPLC 法测定核苷酸主要按下述二种流动相开展研究, 通过研究建立适于乳制品类样品的检测方法:

2.1 方法一: 流动相为: 甲醇: (0.01mol/L KH_2PO_4 960ml + 0.1mol/L K_2HPO_4 40ml pH5.0) 分别为 10:90、5:95 和 0:100 三个组合。色谱条件为: 紫外检测器, 波长 254nm; 流速 1ml/min ; 色谱柱为迪马钻石 C_{18} 柱, $5\mu\text{m}$ $4.6 \times 200\text{mm}$; 柱温 25°C 。

2.2 方法二: 流动相为: 乙腈: (0.01mol/L KH_2PO_4 + 0.005mol/L K_2HPO_4 + 1mmol/L $C_{16}H_{36}BrN$, 磷酸调 pH5.0) 分别为 5:95、3:97 和 0:100 三个组合。色谱条件为: 紫外检测器, 波长 254nm; 流速为 1ml/min ; 色谱柱为迪马钻石 C_{18} 柱, $5\mu\text{m}$ $4.6 \times 200\text{mm}$; 柱温 25°C 。

3 结果与分析

3.1 不同流动相的试验研究

3.1.1 流动相的配制:

3.1.1.1 方法一: 称取磷酸二氢钾 1.27g 和磷酸氢二钾 1.75g 分别于 1000ml 和 100ml 容量瓶中, 加蒸馏水溶解并定容至刻度混匀, 再按 960ml 和 140ml 的体积混合后用磷酸在酸度计上调 pH5.0, 用 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤。再根据试验需要配制或与甲醇不同比例的流动相或在双泵液相色谱仪上按比例进行混合。

3.1.1.2 方法二: 分别称取磷酸二氢钾 1.27g、磷酸氢二钾 0.90g 和四丁基溴化氨 1.322g 于 1000ml 烧杯中, 加蒸馏水溶解后再加水至 950ml 左右混匀, 用磷酸在酸度计上调 pH5.0 后加水定容至 1000ml。用 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤。再根据试验需要配制或与乙腈不同比例的流动相或在双泵液相色谱仪上按比例进行混合。

3.1.2 不同流动相对核苷酸的分离效果

通过对不同流动相及不同组合的试验研究, 找出既能把核苷酸的五个组分进行有效分离, 又可以使这些待测组分与样品中其他成分进行有效分离; 同时还应尽量缩短分析时间的流动相。为此我们进行了如下的试验研究:

3.1.2.1 对方法一中流动相的三个组合进行研究: 甲醇与磷酸盐缓冲液比为 (1) 10:90; (2) 5:95; (3) 0:100。首先分别进行了五种核苷酸标准样品试验, 结果表明: 甲醇比例越高, 各组分的保留时间越短, 但分离效果越差; 使用流动相 (1) 的组合标准样品 CMP、UMP、GMP、IMP、AMP 的保留时间分

别为 2.5、2.8、3.2、3.4、6.0 min,前四种成分几乎完全重合。AMP 可以与他们分开,但由于乳制品样品中其他成分在 6 分钟左右出峰的较多,无法与之分离。所以此流动相不能用于乳制品中核苷酸成分的分离测定。使用流动相(2)的组合标准样品保留时间普遍推迟,AMP 可推迟到 10.0min,但其他四个组分分离度都在 1 以下,且许多与乳制品样品中的杂质峰重叠,仍不能采用。使用流动相(3)的组合标准样品各组分的保留时间大大推迟,CMP、UMP、GMP、IMP、AMP 分别为 3.3、5.0、8.2、9.3 和 23.2 min(见图 1)。经与乳制品样品对比试验证明:前二个组分无法与样品其他成分进行有效分离,而后三个组分则可与乳制品样品其他成分分离。所以此流动相可用于乳制品中 GMP、IMP 和 AMP 的分析。若用于测定核苷酸添加剂,则可以用此流动相一次性测定核苷酸的五个组分。

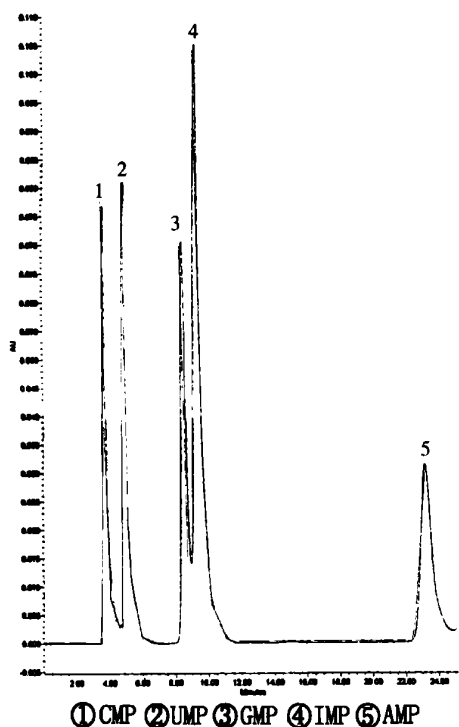


图 1 流动相(3)分离五种核苷酸的效果

3.1.2.2 由于方法一中的流动相不能用于测定乳制品中 GMP 和 UMP,所以我们又开展了方法二的研究。方法二中采用了三个组合的流动相:乙腈:含有四丁基溴化氨的磷酸盐缓冲液为(1)0:100;(2)3:97;(3)5:95。使用流动相(1)的试验表明:各组分保留时间过长,且峰宽增加,拖尾严重,易于乳

制品样品中的杂质重叠。如首先分离出的组分 GMP 保留时间为 15.0min,峰底宽达 3.8min,而最后的 AMP 保留时间大于 50min,不能用于核苷酸成分分析。使用流动相(2)的试验中,核苷酸混合标样的保留时间分别为 CMP 9.1min、UMP 17.5min、GMP + IMP 24.1min、AMP 47.8min(见图 2),可以得出:若测定 CMP、UMP 效果好,且可以与乳制品样品中的其他成分分开,但 GMP、IMP 仍重叠,仅可用于 GMP、IMP 的定性或定量测定。使用流动相(3)的试验结果:核苷酸的保留时间为 CMP 7.4min、UMP 10.3min、GMP + IMP 12.2min(未分开)、AMP 22.2min(见图 3)。样品分离效果见图 4,试验可知: CMP、UMP 和 IMP 基本能与乳制品样品中的其他组分分离,且分析时间也适于样品的测定,故可用于这三种成分的定性或定量测定。

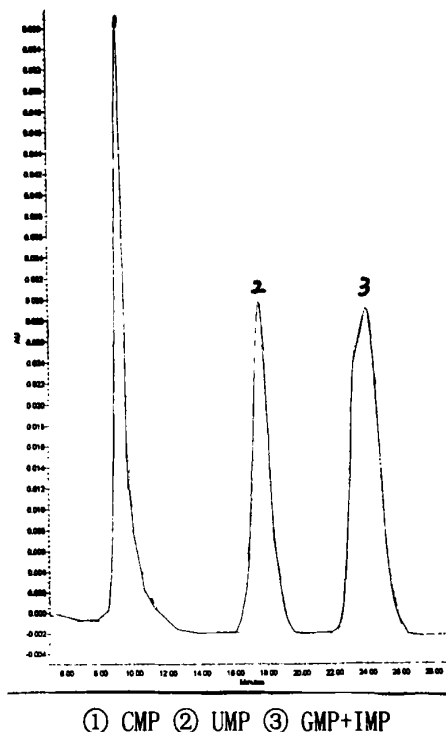
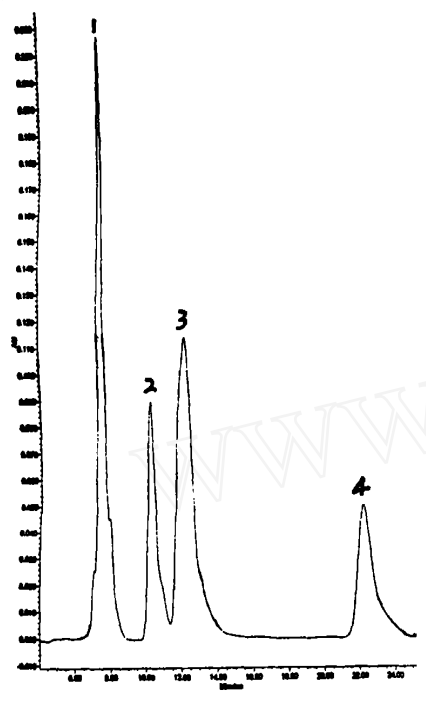


图 2 方法二中使用流动相(2)的核苷酸色谱图

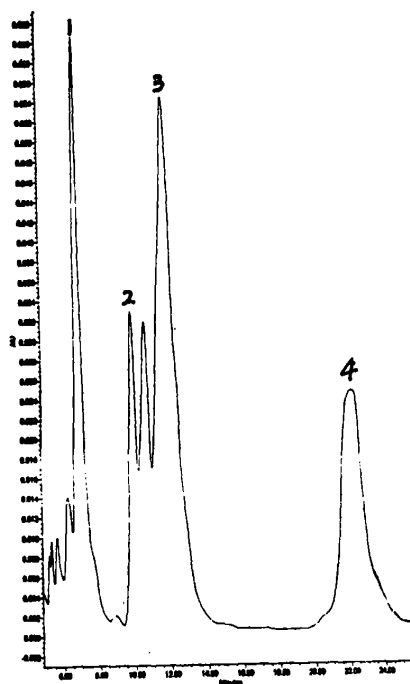
由于不同流动相的研究可以得出:上述流动相都不能一次性完成核苷酸所有五个组分的测定,最好的选择是测定 GMP、IMP 和 AMP 采用方法一中的(3)为流动相;测定 CMP、UMP 则选用方法二中的(3)作为流动相为好。另外方法二中的(2)也可使 CMP、UMP,但(2)测定时间要比(3)长,而分离效果稍好于(3),可以选择使用。下述试验全部

采用两种流动相结合的方法进行。



① CMP ② UMP ③ GMP+IMP ④ AMP

图3 方法二中流动相(3)的核苷酸标准色谱图



① CMP ② UMP ③ GMP+IMP ④ AMP

图4 方法二中流动相(3)的核苷酸样品色谱图

3.2 标准曲线的测定

3.2.1 标准溶液的配制:配制 CMP、UMP、GMP、IMP、AMP 浓度各为 1mg/ml 的储备液;然后配制成浓度各为 10.0、20.0、30.0、40.0、50.0μg/ml 的系列标准浓度的溶液,进样量分别为 10μl。上机测定并计算回归方程及相关系数,结果见表 1。

表1 核苷酸标准曲线测定结果

核苷酸浓度 (μg/ml)	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0
CMP 峰高(μv)	4580	9032	13810	18211	22998
UMP 峰高(μv)	4296	8695	12797	17204	21606
GMP 峰高(μv)	3118	6136	9557	12532	15891
IMP 峰高(μv)	4128	8369	12165	16259	20569
AMP 峰高(μv)	1622	3366	4945	6260	8001

根据上表可计算出五种核苷酸标准曲线的回归方程为 CMP: $y = 0.1754 + 0.0022x$, 相关系数为 $r = 0.9868$; UMP: $y = 0.04868 + 0.0023x$, 相关系数为 $r = 0.9879$; GMP: $y = 0.4380 + 0.0031x$, 相关系数为 $r = 0.9792$; IMP: $y = -0.1507 + 0.0025x$, 相关系数为 $r = 0.9799$; AMP: $y = -0.8532 + 0.0064x$, 相关系数为 $r = 0.9553$ 。浓度与峰高间呈正相关,相关性好,可用于外标法进行定量测定。

3.2 样品测定

3.2.1 样品处理 准确称取 10.00g 左右的样品,用 20ml 温水溶解后放入超声波浴中震荡 10min 取出,转入 50ml 容量瓶中,加入 5ml 10% 的醋酸沉淀蛋白,定容后混匀用滤纸过滤后再通过 0.45μm 滤膜过滤,上机测定。

3.2.2 样品测定 共选用了五个企业生产的 5 个含有核苷酸的婴幼儿配方奶粉进行测定(列于表 2)并按下式计算结果。

$$\text{核苷酸 (mg/100g)} = \frac{h_1 \cdot V \cdot C}{h \cdot m \times 1000} \times 100$$

式中: h_1 — 样品峰高(μv)

h — 标样峰高(μv)

V — 样液体积(ml)

m — 样品质量(g)

C — 核苷酸标准溶液浓度(μg/ml)

$$\text{样品中核苷酸含量 (mg/100g)} = \text{GMP} + \text{UMP} + \text{GMP} + \text{IMP} + \text{AMP}$$

表2 婴幼儿配方奶粉中核苷酸(总量)测定结果

样品号	1号样品		2号样品		3号样品		4号样品		5号样品	
含量(mg/100g)	58.26	56.53	68.32	69.63	48.21	47.96	71.45	72.03	52.81	51.99

从5个样品测定结果看,两次平行间的相对偏差都在5%以内。

核苷酸混合标准溶液,然后再按上述操作步骤进行测定,测定结果见表3:

3.2 回收率与重现性试验

3.2.1 回收率试验:以4号样品为试验材料,加入

表3 核苷酸(总量)回收率试验结果

测定次数	1	2	3	4	5	6	平均
理论值(μg)	2500	2500	5000	5000	7500	7500	
实测值(μg)	2305	2371	4712	4653	7310	7168	
回收率	92.2	94.8	94.2	93.0	97.5	95.6	94.6

六次重复测定结果回收率在92-97%间,平均回收率为94.6%,其准确度可满足测定婴幼儿配方奶粉的要求。

3.2.2 精密度试验:与4号样品作为试验样品,同时重复测定八次,结果见表4。

表4 精密度试验结果(单位:mg/100g)

测定次数	1	2	3	4	5	6	7	8	$\bar{X}$	CV(%)
核苷酸含量	71.45	72.03	68.86	70.12	72.11	69.45	70.18	71.87	70.76	1.79

8个平行样品测定结果统计表明,测定结果的重复性较好,变异系数1.79%。可以满足采用该法测定婴幼儿配方奶粉中该核苷酸含量的要求。

4 结论

4.1 通过对流动相的研究后认为:测定五种核苷酸需以两种流动相配合使用,即0.01mol/L KH_2PO_4 960ml + 0.1mol/L K_2HPO_4 ; 40ml pH5 和乙腈:(0.01mol/L KH_2PO_4 + 0.005mol/L K_2HPO_4 + 1mmol/L $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{BrN}$, 磷酸调 pH5.0) 为5:95。前者用于测定 GMP、IMP、AMP; 后者用于测定 CMP、UMP。测定核苷酸添加剂可采用前者,即可一次性测定出五种组分的核苷酸含量。

4.2 样品测定的色谱条件是:迪马 C_{18} 柱, $5\mu\text{m}$ $4.6 \times 200\text{mm}$; 柱温 25°C ; 流动相流速为 1.0ml/min; 紫外检测器波长 254nm。

4.3 此方法标准曲线线性好,回归方程为 $\text{CMP}: y = 0.1754 + 0.0022x$, $r = 0.9868$; $\text{UMP}: y = 0.04868 + 0.0023x$, $r = 0.9879$; $\text{GMP}: y = 0.4380$

+ 0.0031x, $r = 0.9792$; $\text{IMP}: y = -0.1507 + 0.0025x$, $r = 0.9799$; $\text{AMP}: y = -0.8532 + 0.0064x$, $r = 0.9553$ 。浓度与峰高间呈正相关,相关性好,可用于外标法进行定量测定。

4.4 此方法回收率与精密度试验结果较好,回收率在92-97%,平均为94.6%,样品重复测定8次的变异系数为1.79%。

4.5 若测定核苷酸添加剂中的含量,可采用磷酸盐缓冲液作为流动相。由于无其他组分的干扰,能同时测定五个组分的核苷酸。

综上所述,采用 HPLC 法测定婴幼儿配方奶粉中核苷酸含量是一较理想的方法,该法操作简便,易于掌握,其测定精密度和准确度能满足乳制品分析的要求。因此,可作为常规检测方法应用。

参考文献

1. 王光亚. 保健食品功效成分检测方法(M). 北京: 中国轻工业出版社, 2002. 136 - 140.
2. 杨祖英. 食品检验(M). 化学工业出版社, 2001. 51
3. 宁正祥. 食品成分分析手册(M). 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 251 - 2610.