

超高效液相色谱-串联质谱优化特殊医学用途 配方奶粉中5种核苷酸含量的测定方法

安迈瑞¹, 刘阳¹, 梅英杰¹, 丁树东¹, 白小东², 张亦速³, 崔梦琪¹, 李政¹, 张贞理¹

(1. 淄博市检验检测计量研究总院, 山东 淄博 255049; 2. 平凉市农产品质量安全检验检测中心, 甘肃 平凉 744000; 3. 武汉理工大学, 湖北 武汉 430070)

摘要: 该文以特殊医学用途配方奶粉为原料, 旨在优化和确定超高效液相色谱-串联质谱法检测该产品中5种核苷酸的最佳方法。通过优化前处理方法和仪器条件, 最终前处理方法为取样量0.80 g, 溶剂温度40℃, 用量40 mL, 酸碱调节剂为25%的乙酸溶液, 调节最终pH值为4.2±0.1; 优化液相色谱、质谱条件和最佳检测条件: 电喷雾电源离子模式, 多反应监测扫描方式, 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸与乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 在该条件下5种核苷酸的平均回收率为91.865%~100.815%。该方法能够快速准确地测定特殊医学用途配方奶粉中5种核苷酸含量。

关键词: 特殊医学用途配方奶粉; 核苷酸; 超高效液相色谱-串联质谱; 含量; 优化

Optimization of Determination Method for Content of Five Nucleotides in Special Medical Formula Milk Powder by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

AN Mairui¹, LIU Yang¹, MEI Yingjie¹, DING Shudong¹, BAI Xiaodong², ZHANG Yisu³, CUI Mengqi¹, LI Zheng¹, ZHANG Zhenli¹

(1. Zibo Municipal General Institute of Inspection and Metrology, Zibo 255049, Shandong, China; 2. Pingliang Agricultural Product Quality Safety and Inspection Testing Center, Pingliang 744000, Gansu, China; 3. Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, Hubei, China)

Abstract: This article used special medical formula milk powder as the raw material to optimize and determine the best method for detecting five nucleotides in this product by using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). By optimizing the pre-processing methods and instrument conditions, the final pre-processing method was adopted under the following conditions: 0.80 g of sample was taken, and the solvent temperature was 40 °C. 40 mL of solvent was used, with a pH regulator of 25% acetic acid solution to adjust the final pH to 4.2±0.1. The UPLC-MS/MS and detection conditions were optimized as follows: electrospray ionization and ion mode and multiple response monitoring scans were used, and 5 mmol/L ammonium acetate-0.1% formic acid solution and acetonitrile was used as mobile phase for gradient elution. Under these conditions, the average recovery rates for the five nucleotides ranged from 91.865% to 100.815%. This method could rapidly and accurately determine the content of the five nucleotides in special medical formula milk powder.

Key words: special medical formula milk powder; nucleotide; ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); content; optimization

引文格式:

安迈瑞, 刘阳, 梅英杰, 等. 超高效液相色谱-串联质谱优化特殊医学用途配方奶粉中5种核苷酸含量的测定方法[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(6): 137-144.

AN Mairui, LIU Yang, MEI Yingjie, et al. Optimization of Determination Method for Content of Five Nucleotides in Special Medical Formula Milk Powder by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Food Research and Development, 2025, 46(6): 137-144.

核苷酸是广泛存在于各种组织以及微生物体中的重要化合物。它们是由核苷和磷酸通过酯键连接而成的非蛋白质氮化合物,主要包括胞嘧啶核苷酸(cytidine 5'-monophosphate, CMP)、尿嘧啶核苷酸(uridine 5'-monophosphate, UMP)、腺嘌呤核苷酸(adenosine 5'-monophosphate, AMP)、鸟嘌呤核苷酸(guanosine 5'-monophosphate, GMP)以及次黄嘌呤核苷酸(inosine 5'-monophosphate, IMP)^[1]。近年来的研究表明,核苷酸是人体细胞 DNA 合成过程中的重要辅助因子,适量摄入核苷酸不仅有助于调节肠道功能、维持体内微生物环境平衡,还有利于提高免疫功能、调控脂质代谢等,有婴幼儿健康研究者认为,核苷酸是维持正常机体免疫功能的必要营养成分,可以增强婴幼儿机体免疫力和抗感染能力^[2-6]。研究发现,母乳中含有一定量的游离核苷酸^[7]。为了最大化模拟母乳的营养组成,常采用额外添加核苷酸的方式来强化特殊医学用途配方奶粉的营养功能^[8]。然而,奶粉样品基质成分复杂,含有多种蛋白质,容易干扰奶粉中核苷酸的提取和分离鉴定,现有检测方法无法有效排除干扰,复杂样品基质中不同类型核苷酸的同步定性和准确定量一直是特殊医学用途配方食品检测领域亟需解决的问题。因此,需要开发简单高效低成本的样品前处理方法,以快速高质量去除蛋白质等杂质并提取出复杂基质样品中的游离核苷酸^[9],而后进行准确定性和定量。

目前,检测奶粉中核苷酸含量的常用方法包括荧光比色法^[10]、毛细管电泳法^[11]、高效液相色谱法^[12-16]、离子色谱法^[17]等。然而,上述方法均存在不足,例如:荧光比色法操作过程复杂且目标核苷酸容易受到干扰;毛细管电泳法对试验条件要求高,且重现性不佳;离子色谱法对离子对流动相的 pH 值要求高且需要较长的操作时间,严重影响设备使用寿命,并且检测时目标核苷酸易受奶粉中复杂成分的干扰;高效液相色谱法中采用常规反相色谱柱对奶粉中核苷酸吸附效果较差,容易受到基质干扰^[18],而采用正相色谱柱会随着检测样品数量的增加而使峰型和重复性变差,难以分离相对分子量接近的核苷酸。本研究以市售特殊医学用途配方奶粉基质为原料,以超高效液相色谱-串联质谱(ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)法为支撑,优化样品前处理方法(筛选最优的沉淀剂、优化提取的 pH 值条件),优化色谱条件(优化色谱柱种类、优化流动相条件),旨在开发一种前处理方法简单、高效,检测效果可靠、稳定,对特殊医学用途配方奶粉中的 5 种不同类型核苷酸具有良好分离效果并能够准确定性定量的方法,以适应复杂基质中核苷酸高质量分析检测的需要。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

GMP、UMP、CMP、AMP、IMP(纯度 $\geq 99.9\%$):美国 Stanford analytical chemicals 公司。

乙腈(质谱纯)、甲醇(色谱纯)、超纯水:默克化工技术(上海)有限公司;高氯酸、盐酸、氢氧化钠、乙酸(均为优级纯):国药集团化学试剂有限公司;乙酸铵、甲酸(均为色谱纯):赛默飞世尔科技(中国)有限公司;特殊医学用途配方奶粉基质(20 g):中国检验检疫科学研究院测试评价中心。

1.2 仪器与设备

ACQUITY BEH C18 色谱柱(1.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm)、ACQUITY BEH Shield RP18 色谱柱(1.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm)、UPLC/XEVO TQ-S 型超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪:沃特世科技(上海)有限公司;3-18KS 型冷冻离心机:西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;MS403TS/02 型电子天平:梅特勒-托利多科技(中国)有限公司;pHS-3C 型 pH 计:上海仪电科学仪器股份有限公司;88882010 型数字旋涡混合器:赛默飞世尔科技(中国)有限公司;KQ-800DE 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;HYCD-205 型医用冷藏冷冻箱:青岛海尔股份有限公司。

1.3 标准溶液配制

分别准确称取 10.0 mg GMP、UMP、CMP、AMP、IMP 标准品,用超纯水溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,得到浓度为 1.0 mg/mL 的标准中间液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。使用时经超纯水稀释为 5.0、10.0、50.0、100.0、250.0 ng/mL 的标准曲线工作溶液(4 $^{\circ}\text{C}$ 保存可使用 1 周)。

1.4 样品前处理优化

1.4.1 前处理步骤

准确称取 0.80 g 特殊医学用途配方奶粉基质样品,加入 5 种核苷酸混合标准溶液,高速涡旋混匀 10 min,静置 3 min,40 mL 温水溶解,涡旋混匀 3 min,超声辅助提取 20 min,用酸溶液调节 pH 值以沉淀蛋白质,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 9 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,经超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪分析检测。

1.4.2 pH 值的优化

通过调节溶剂或溶液的 pH 值可以去除特殊医学用途配方奶粉中容易干扰核苷酸检测的蛋白质,当 pH 值低于 5.0 时,开始有絮状沉淀形成,高速(9 000 r/min、10 min)离心后获得澄清的上清液。通过测定不同 pH 值条件下 5 种核苷酸的回收率以确定最优 pH 值范围。

1.4.3 沉淀剂的筛选

选择 25% 乙酸溶液、13% 高氯酸溶液、1% 甲酸溶液和 1% 盐酸溶液作为特殊医学用途配方奶粉中蛋白

质沉淀剂进行优化,pH值调节至最优范围。通过测定5种核苷酸的回收率以确定最优沉淀剂。

1.5 仪器条件

1.5.1 液相条件

色谱柱:ACQUITY BEH C18 色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm×50 mm)、ACQUITY BEH Shield RP18 色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm×50 mm);柱温:38℃;进样体积:2 μL;流动相A为乙酸铵-甲酸水溶液,流动相B为乙腈;流速:0.280 mL/min。梯度洗脱程序详见表1。

表1 液相洗脱程序

Table 1 Elution procedure of liquid phase

时间/min	流速/(mL/min)	乙酸铵-甲酸水溶液/%	乙腈/%
0	0.280	95.0	5.0
2.00	0.280	75.0	25.0
2.50	0.280	10.0	90.0
3.00	0.280	95.0	5.0
5.00	0.280	95.0	5.0

1.5.2 质谱条件

离子源:电喷雾电源(electrospray ionization, ESI);质谱扫描方式:多反应离子监测(multiple reaction monitoring, MRM);扫描模式:正离子扫描;毛细管电压:2.5 kV;离子源加热温度:500℃;雾化器流速:1 000 L/h;碰撞气流速:150 L/h。5种核苷酸对应离子对及质谱条件见表2。

表2 5种核苷酸的MRM离子对信息

Table 2 MRM ion pair information for five nucleotides

核苷酸	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/kV	碰撞电压/kV
GMP	364.1	152.0	12	20
		97.0	12	25
UMP	325.0	113.0	14	15
		97.0	14	18
CMP	324.4	112.1	14	12
		97.0	14	18
AMP	348.2	136.2	15	18
		97.0	15	18
IMP	349.0	136.7	16	20
		97.0	16	20

1.6 数据处理

采用MassLynx 4.1 质谱软件自动采集数据并积分,采用OriginPro 软件形成矢量图。

2 结果与分析

2.1 样品前处理方法优化

2.1.1 pH值确定

不同pH值对5种核苷酸回收率的影响见表3。

pH值降至5.0以下时,蛋白质开始沉淀,当pH值调至4.0以下时,沉淀物开始出现复溶,沉淀物的量明显减少,高速离心后上清液仍然浑浊,经检测,此时5种核苷酸回收率均低于92%。当pH值调至高于

表3 不同pH值对5种核苷酸回收率的影响

Table 3 Effect of different pH values on recovery rates of five nucleotides

核苷酸	回收率/%			
	pH4.0	pH4.2	pH4.4	pH4.7
GMP	90.5	98.4	103.9	108.5
UMP	88.2	97.5	104.5	107.3
CMP	91.1	98.9	106.2	109.9
AMP	87.1	98.0	104.1	106.4
IMP	85.6	97.1	101.6	105.5

4.3时,5种核苷酸的回收率开始高于100%,pH值在4.7时,5种核苷酸回收率可接近110%。因此,最终确定样品前处理pH值调节范围为4.2±0.1。

2.1.2 沉淀剂筛选

不同提取剂对5种核苷酸回收率的影响见表4。

表4 不同提取剂对5种核苷酸回收率的影响

Table 4 Effect of different extractants on recovery rate of five nucleotides

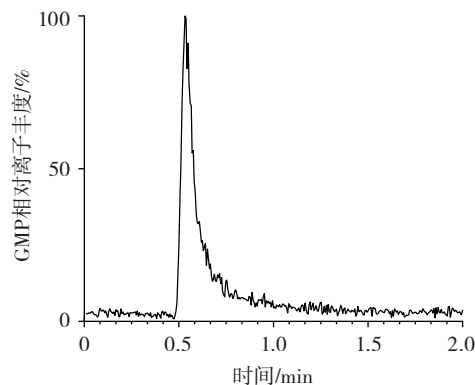
核苷酸	回收率/%			
	25% 乙酸溶液	13% 高氯酸溶液	1% 甲酸溶液	1% 盐酸溶液
GMP	98.7	97.8	98.1	98.4
UMP	97.2	89.5	83.6	87.1
CMP	97.9	95.8	100.4	101.6
AMP	98.0	109.5	111.5	115.2
IMP	96.8	101.9	99.6	100.8

由表4可知,4种无机酸溶液可作为蛋白沉淀剂提取奶粉中的GMP、CMP、IMP3种核苷酸,且回收率范围稳定在95.8%~101.9%内,13%高氯酸溶液、1%甲酸溶液、1%盐酸溶液对AMP的提取效果影响较大,回收率均超过109%,而25%乙酸溶液作为沉淀剂可以将UMP的回收率由另外3种酸溶液提取时的83.6%~89.5%提高至97.2%。综合表4,对比4种无机酸溶液作为沉淀剂时5种核苷酸的回收率结果,最终确定25%乙酸溶液为提取特殊医学用途配方奶粉中核苷酸的沉淀剂。

2.2 色谱条件优化

2.2.1 色谱柱的选择

两种色谱柱分离5种核苷酸结果见图1~图2。



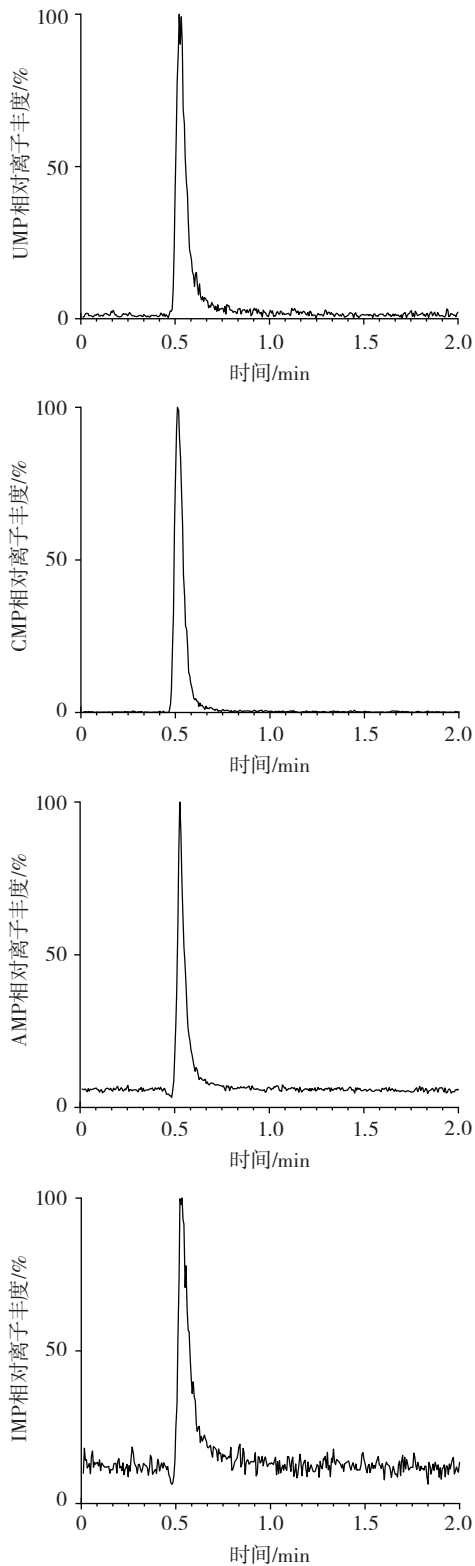


图1 BEH C18柱分离5种核苷酸MRM图谱

Fig.1 MRM spectra of five nucleotides separated by BEH C18 column

BEH C18柱与BEH Shield RP18柱常用于分离特殊医学用途配方奶粉中5种核苷酸,二者分离5种核苷酸的峰型结果显示,BEH Shield RP18柱能够有效分

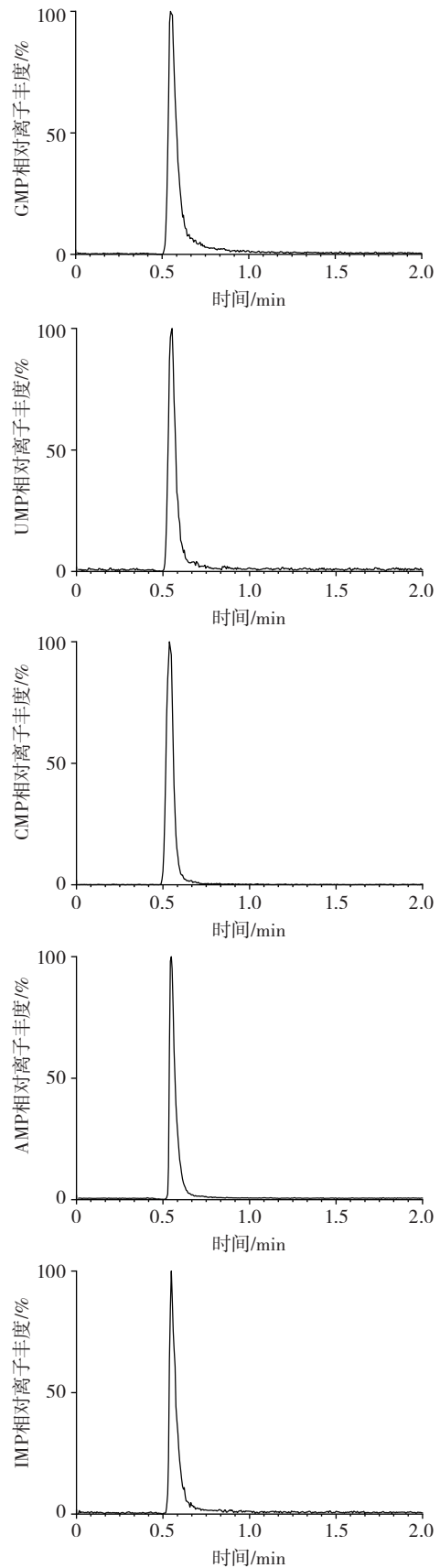


图2 BEH Shield RP18柱分离5种核苷酸MRM图谱

Fig.2 MRM spectra of five nucleotides separated by BEH Shield RP18 column

离5种核苷酸,在相同浓度下相对离子丰度响应值更高,峰型尖锐对称、更流畅更集中、无前延无拖尾。而BEH C18柱分离5种核苷酸时,除相对离子丰度响应较低外,UMP、GMP和IMP3种核苷酸的目标峰峰型不对称,且有较明显的拖尾现象,AMP的目标峰前则有倒峰出现,CMP的分离受两种色谱柱的影响最小。以上结果说明,BEH Shield RP18柱能够在复杂基质的干扰下完成5种核苷酸的高质量分离。

2.2.2 流动相的选择

使用不同流动相分离5种核苷酸结果见图3~图6。

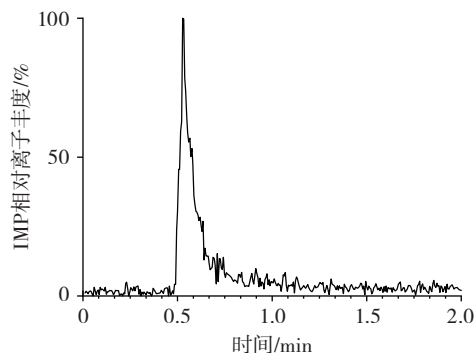
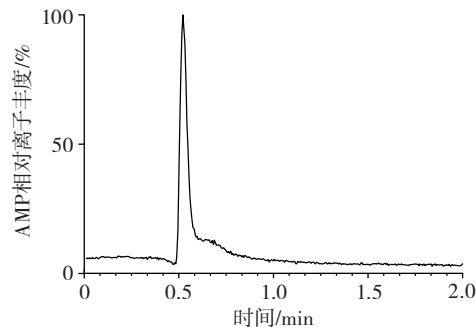
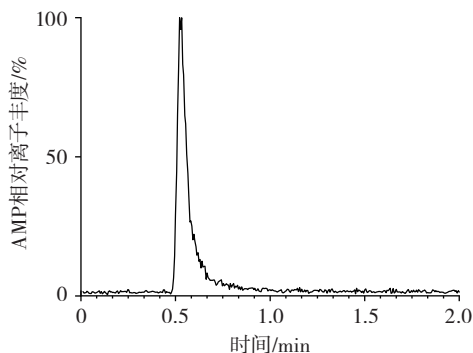
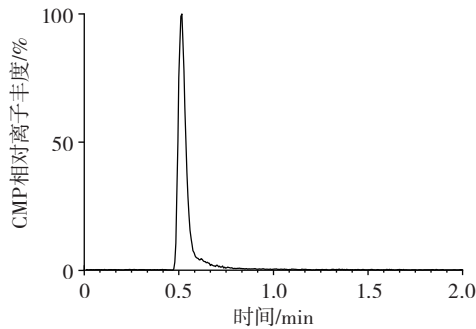
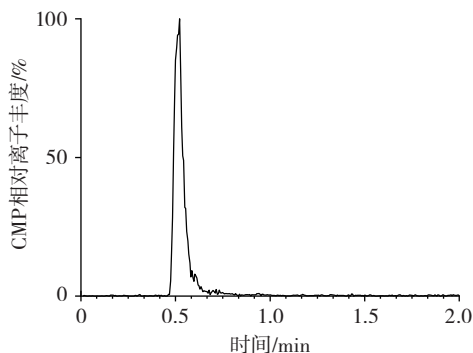
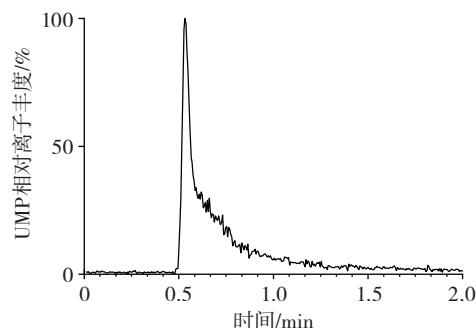
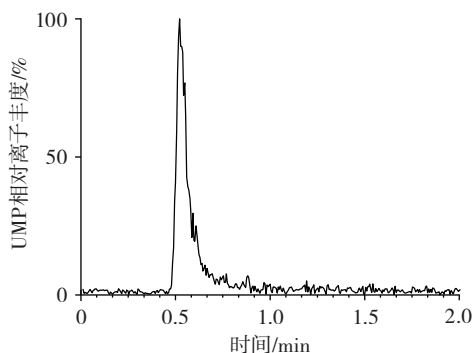
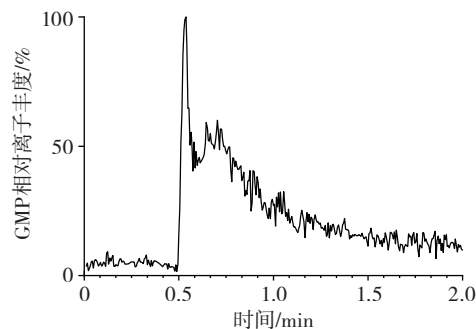
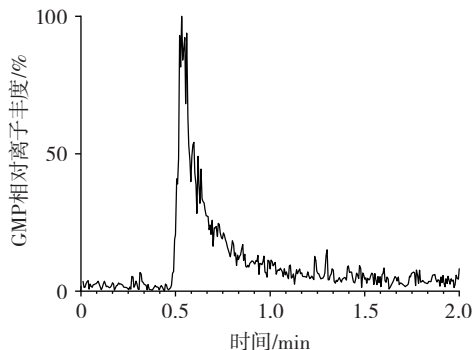


图3 5 mmol/L 乙酸铵-乙腈为流动相分离5种核苷酸 MRM 图谱

Fig.3 MRM spectra of five nucleotides separated by using 5 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile as mobile phase



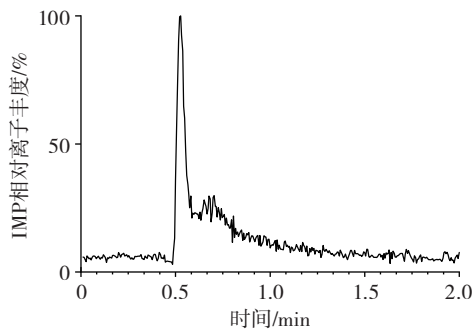


图4 0.1% 甲酸-乙腈为流动相分离5种核苷酸 MRM 图谱
Fig.4 MRM spectra of five nucleotides separated by using 0.1% formic acid-acetonitrile as mobile phase

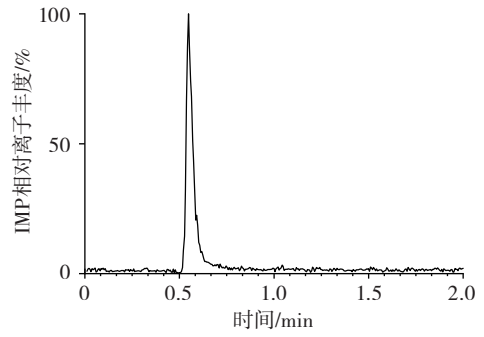
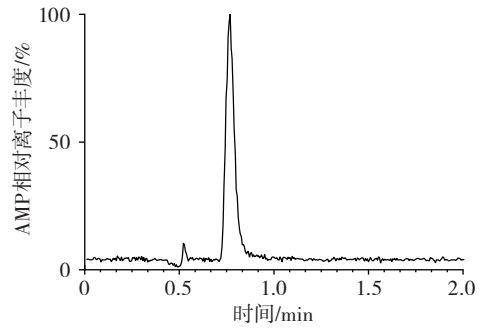
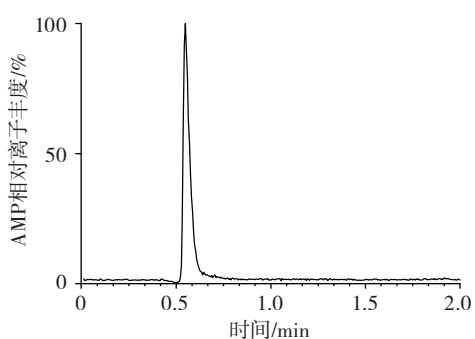
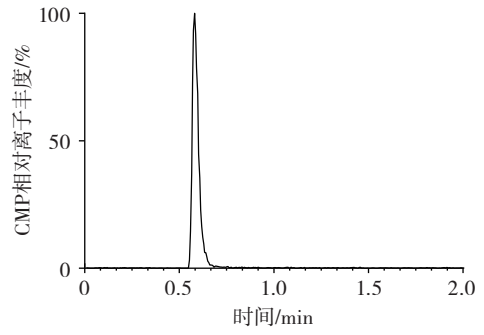
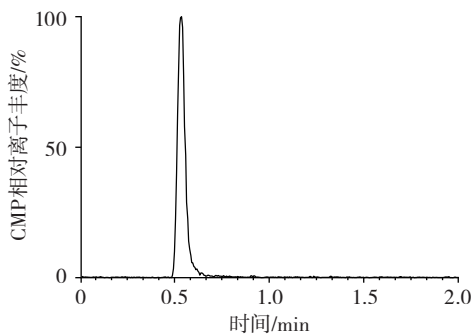
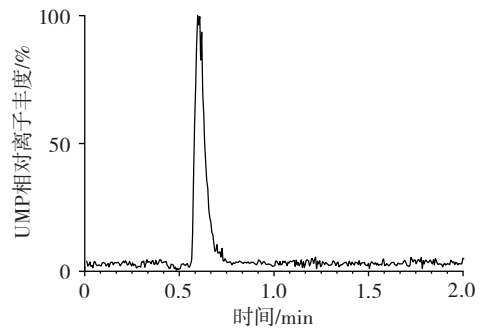
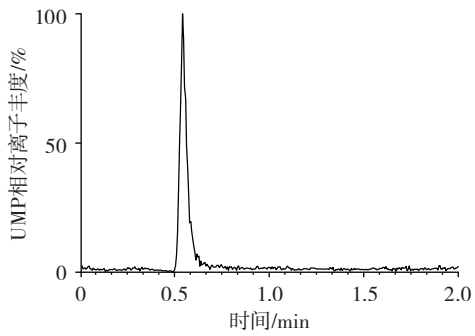
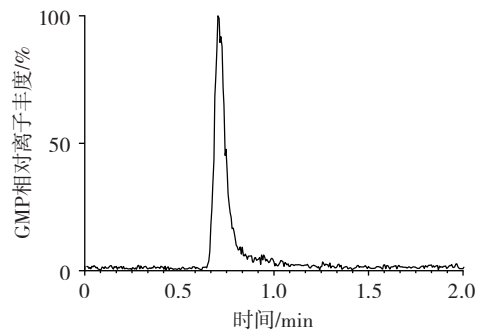
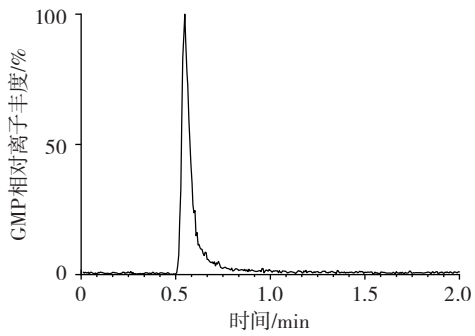


图5 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸-乙腈为流动相分离5种核苷酸 MRM 图谱

Fig.5 MRM spectra of five nucleotides separated by using 5 mmol/L ammonium acetate-0.1% formic acid-acetonitrile as mobile phase



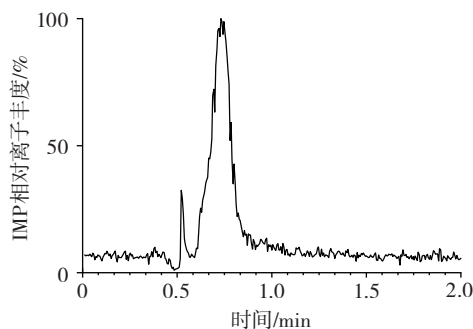


图6 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸-甲醇为流动相分离5种核苷酸 MRM 图谱

Fig.6 MRM spectra of five nucleotides separated by using 5 mmol/L ammonium acetate-0.1% formic acid-methanol as mobile phase

以5 mmol/L 乙酸铵溶液、0.1% 甲酸溶液、5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸溶液作为水相^[19-20],选择乙腈、甲醇为有机相,分别优化流动相条件。由图5~图6可知,相同浓度下,单独使用5 mmol/L 乙酸铵溶液为水相时,5种核苷酸相对离子丰度均较低,GMP和IMP目标峰响应不明显,UMP与AMP目标峰也出现拖尾现象;单独使用0.1% 甲酸水溶液为水相时,5种核苷酸

与基质峰分离不彻底,峰型不流畅,峰型宽而扁;当5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液作为水相,5种核苷酸MRM图谱峰型对称,尖锐且流畅,相对离子丰度较高。此外,传统分离方法通常以甲醇作为有机相^[21],该条件下AMP与IMP相对离子丰度低,且有较高的流动相溶剂效应,溶剂峰响应过高掩盖了目标峰,而采用乙腈作为有机相时可避免此问题。通过比较5种核苷酸在不同水相和有机相中的分离结果,发现CMP最为稳定,不易受到流动相种类的影响,而GMP最易受到流动相的影响,IMP次之。综合水相和有机相的筛选,最终确定流动相条件如下:5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸为水相,乙腈为有机相。

2.3 线性关系及检出限

以不同浓度的核苷酸混合标准溶液为目标物,经UPLC-MS/MS测定,获得对应的标准曲线。其中,测定结果以信噪比S/N=10时对应的各标准物质的进样量为方法检测限,以信噪比S/N=30时对应的各标准物质的进样量为方法定量限。得到线性回归方程、检出限、定量限,结果见表5。

由表5可知,5种核苷酸在5~250 ng/mL浓度范围

表5 5种核苷酸线性回归方程及方法检出限、定量限

Table 5 Linear equations and detection limit and quantitative limit of methods for five nucleotides

核苷酸	线性范围/(ng/mL)	回归方程	相关系数(R)	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
GMP	5~250	$y=788.092x+2\ 527.96$	0.999 05	0.030	0.042
UMP	5~250	$y=365.484x+1\ 483.78$	0.999 22	0.025	0.035
CMP	5~250	$y=945.361x+1\ 345.95$	0.999 26	0.018	0.028
AMP	5~250	$y=4\ 915.36x-12\ 966.7$	0.997 29	0.022	0.032
IMP	5~250	$y=481.761x+189.704$	0.999 56	0.035	0.048

内呈现良好的线性,GMP、UMP、CMP、IMP线性相关系数(R)均大于0.999,AMP线性相关系数(R)大于0.997。其中,CMP在此方法下响应最灵敏,检出限和定量限均为最低值,而5种核苷酸的检出限和定量限均在同一数量级,使用时可以配制成相同浓度的混合标准溶液进行试验。

2.4 加标回收率与精密度

以不含5种核苷酸的特殊医学用途配方奶粉基质为样品,采用外标法定量分析,平均加标回收率($n=6$)和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)详见表6。

由表6可知,在3个不同浓度的加标量下,5种核苷酸平均加标回收率均在91.865%~100.815%,其中,GMP、CMP、AMP3种核苷酸的添加量对应的回收率结果稳定,均维持在97%~100%之间,而UMP在添加量达到1 000 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 时回收率会明显降低,而IMP的回收率则随着添加量的增加而增大。5种核苷酸的RSD为0.467%~6.043%。

表6 5种核苷酸加标回收及相对标准偏差

Table 6 Spiked recovery and relative standard deviation of five nucleotides

核苷酸	添加量/ $(\mu\text{g}/100\text{g})$	平均加标回收率/%	RSD/%
GMP	25	97.076	0.467
	250	98.754	2.865
	1 000	98.546	3.657
UMP	25	94.456	6.043
	250	97.864	2.977
	1 000	91.865	3.576
CMP	25	100.815	1.592
	250	99.589	3.102
	1 000	98.467	2.864
AMP	25	98.211	2.031
	250	97.753	1.545
	1 000	98.456	4.356
IMP	25	92.877	2.787
	250	96.654	3.578
	1 000	98.877	4.578

3 结论

研究获得的样品前处理方法(40℃温水溶解0.8g样品,25%乙酸溶液调节pH值至 4.2 ± 0.1 ,9000 r/min 4℃离心10 min)更适合从特殊医学用途配方奶粉这类复杂基质样品中提取5种核苷酸,平均回收率可达91.865%~100.815%。经UPLC-MS/MS分析检测,借助ACQUITY BEH Shield RP18色谱柱,优化筛选出的5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸溶液与乙腈作为流动相梯度洗脱能够辅助准确定性和定量特殊医学用途配方奶粉中的5种核苷酸,且在5~250 ng/mL浓度范围内具有良好的线性关系以及较高的准确度和精密度。该前处理方法和定性定量方法可为特殊医学用途配方奶粉中核苷酸的提取、鉴定和监测提供一定参考。

参考文献:

- [1] 李红然. 婴幼儿乳制品中脂肪酸和核苷酸识别与控制技术研究[D]. 大连:大连工业大学, 2019.
LI Hongran. Study on identification and control technology of fatty acids and nucleotides in infant dairy products[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019.
- [2] 马世波, 王锡青, 夏克光, 等. 超高效液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中5种核苷酸[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(5): 46-49.
MA Shibao, WANG Xiqing, XIA Keguang, et al. Determination of five nucleotides in infant formula milk powder by ultra performance liquid chromatography[J]. China Dairy Industry, 2019, 47(5): 46-49.
- [3] YAN K I T, HUANG C B, CHEN W, et al. Effect of nucleotides on diarrhea and immune responses in healthy term infants in Taiwan [J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2003, 36(1): 37-43.
- [4] COPPA G V, ZAMPINI L, GALEAZZI T, et al. Prebiotics in human milk: A review[J]. Digestive and Liver Disease, 2006, 38: S291-S294.
- [5] SINGHAL A, KENNEDY K, LANIGAN J, et al. Dietary nucleotides and early growth in formula-fed infants: A randomized controlled trial[J]. Pediatrics, 2010, 126(4): e946-53.
- [6] BUCK R H, THOMAS D L, WINSHIP T R, et al. Effect of dietary ribonucleotides on infant immune status. part 2: Immune cell development[J]. Pediatric Research, 2004, 56(6): 891-900.
- [7] 张淑琼. 离子交换高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中的核苷酸[J]. 食品安全导刊, 2020(16): 52-54.
ZHANG Shuqiong. Determination of nucleotides in infant milk powder by ion exchange high performance liquid chromatography[J]. China Food Safety Magazine, 2020(16): 52-54.
- [8] 贾宏信, 苏米亚, 陈文亮, 等. 母乳核苷酸与婴幼儿健康研究进展[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(8): 35-41, 47.
JIA Hongxin, SU Miya, CHEN Wenliang, et al. Research progress of human milk nucleotides and infant health[J]. China Dairy Industry, 2022, 50(8): 35-41, 47.
- [9] CHEN Y J, LUO L, FENG P Y, et al. Effective and repeatable chromatographic separation of 5 nucleotides in infant formula milk powder by ion-pair high-performance liquid chromatography-ultraviolet [J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(4): 2840-2848.
- [10] 张月, 喻雪莲, 田月月, 等. 紫外分光光度法与荧光光谱法探究呈味核苷酸与EGCG及其蛋白络合物的相互作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(23): 73-80.
ZHANG Yue, YU Xuelian, TIAN Yueyue, et al. Interaction of flavor nucleotides with EGCG and their protein complexes by UV absorption spectrometry and fluorescence spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(23): 73-80.
- [11] 孙云娟, 付洁, 王清清, 等. 核酸杂交酶联桥接分析系统定量分析寡核苷酸[J]. 分析化学, 2012, 40(4): 503-509.
SUN Yunjuan, FU Jie, WANG Qingqing, et al. Development of a nucleic acid hybridization enzyme-linked bridging assay system and its application to oligonucleotides quantification[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(4): 503-509.
- [12] LI J, WANG J F, QIU H Y, 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.
- [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乳粉中5种游离核苷酸[J]. 分析实验室, 2018, 37(1): 74-78.
ZHENG Hong, YU Wenjiang, XUE Xia, 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, 董叶菁, 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 Chuanpi, SUN Wenshan, DONG Yejing, 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] CHEN P, LI W, LI Q, et al. Identification and quantification of nucleosides and nucleobases in *Geosaurus* and Leech by hydrophilic-interaction chromatography[J]. Talanta, 2011, 85(3): 1634-1641.
- [16] STUDZIŃSKA S, BUSZEWSKI B. Effect of mobile phase pH on the retention of nucleotides on different stationary phases for high-performance liquid chromatography[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(5): 1663-1672.
- [17] YE M L, PAN G W, HU Z Y, et al. Determination of nucleotides in infant formula milk powder by ion chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28(9): 898-901.
- [18] 陈曦, 张琳, 沈施. 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法测定乳粉类产品中核苷和核苷酸的含量[J]. 卫生研究, 2018, 47(5): 804-808, 814.
CHEN Xi, ZHANG Lin, SHEN Shi. Determination of nucleosides and nucleotides in milk powder by UPLC-MS/MS[J]. Journal of Hygiene Research, 2018, 47(5): 804-808, 814.
- [19] 中华人民共和国海关总署. 出口乳粉中核苷酸含量的测定: SN/T 5438—2022[S]. 北京: 中国海关出版社有限公司, 2022.
General Administration of Customs of the People's Republic of China. Determination of nucleotide in milk powder for export: SN/T 5438—2022[S]. Beijing: China Customhouse Publishing House, 2022.
- [20] 陈旭晋, 陆宇阳, 曹佳, 等. 超高效液相色谱串联质谱测定大闸蟹中五种核苷酸[J]. 农业与技术, 2022, 42(8): 103-105.
CHEN Xujin, LU Yuyang, CAO Jia, et al. Determination of five nucleotides in hairy crabs by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Agriculture and Technology, 2022, 42(8): 103-105.
- [21] 赵明娟, 顾霄, 郑金琪. 16种核苷与核苷酸LC检测方法的建立及质谱裂解规律的研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(20): 2614-2621.
ZHAO Mingjuan, GU Xiao, ZHENG Jinqi. Establishment of LC methods for 16 nucleosides and nucleotides and the study of cleavage law by mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2022, 39(20): 2614-2621.