

高效液相色谱-串联质谱法 测定婴幼儿奶粉中核苷酸

陈晶燕, 陈万勤, 王峰, 陈碧莲, 周霞, 刘柱, 梁晶晶

(浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052)

摘要:建立了高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定婴幼儿奶粉中胞嘧啶核苷酸(CMP)、腺嘌呤核苷酸(AMP)、鸟嘌呤核苷酸(GMP)、尿嘧啶核苷酸(UMP)、次黄嘌呤核苷酸(IMP)等5种核苷酸含量。使用碱性磷酸酶去磷酸化作用,把样品中的核苷酸水解成相应核苷,经选择性硼固相萃取净化,ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm×1.8 μm)色谱柱分离,以5 mmol/L 甲酸铵溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱。采用电喷雾正离子源,内标法定量,以多反应监测(MRM)模式进行质谱分析。结果表明,奶粉中5种核苷在各自线性范围内的线性关系良好,相关系数均大于0.998,回收率为74.2%~110.7%,相对标准偏差在0.8%~5.3%之间($n=6$),CMP、AMP、GMP、UMP、IMP的定量限分别为0.7、0.1、0.7、3.3、0.6 mg/100 g。该方法灵敏度高、重现性好、定量准确,可用于测定婴幼儿奶粉中核苷酸含量。

关键词:高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS);奶粉;核苷酸;核苷;多反应监测(MRM)

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2021)01-0093-08

doi:10.7538/zpzb.2019.0156

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Determination of Nucleotides in Infant Milk Powder by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

CHEN Jing-yan, CHEN Wan-qin, WANG Feng, CHEN Bi-lian,

ZHOU Xia, LIU Zhu, LIANG Jing-jing

(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

Abstract: Nucleotides are biologically important small molecules composed of a nitrogenous base, a five-carbon sugar (ribose or deoxyribose) and at least one phosphate group. They play important role in improving gastrointestinal tract repair after damage, maintaining the immune system and regulating lipoprotein metabolism. Nowadays the role of dietary nucleotides has been paid increased attention in infant nutrition. Dietary nucleotides are crucial to maintaining normal growth and development in infants. Therefore the contents of nucleotides in infant milk powder become important. A method for

收稿日期:2019-11-15;修回日期:2020-03-10

基金项目:浙江省市场监管局项目(2018007);浙江省食品药品监督管理局科技计划项目(2019002)资助

作者简介:陈晶燕(1993—),女(汉族),浙江杭州人,助理研究员,从事分析化学研究。E-mail: 506135953@qq.com

通信作者:陈万勤(1983—),男(汉族),浙江温州人,高级工程师,从事分析化学研究。E-mail: wanqin_chen@163.com

the determination of five nucleotides (cytidine 5'-monophosphate (CMP), guanosine 5'-monophosphate (GMP), uridine 5'-monophosphate (UMP), adenosine 5'-monophosphate (AMP) and inosine 5'-monophosphate (IMP)) in infant milk powder by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was developed. The nucleotides in sample were hydrolyzed by alkaline phosphatase to the corresponding nucleosides. The nucleosides were adsorbed by selective boric acid solid phase extraction. After purification and elution, the chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm×1.8 μm), and gradient eluted by 5 mmol/L ammonium formate and acetonitrile, and analyzed by HPLC-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode via positive electrospray ionization. The contents of nucleotides were quantitatively analyzed by internal standard method. The results showed that the linear ranges of five nucleotides in infant formula are good, the correlation coefficients are above 0.998. Five kinds of nucleosides can be separated within 8 min. Cytidine, inosine and guanosine are all linear in the concentration range of 5-200 μg/L, adenosine and uridine are linear in the concentration range of 1-40 μg/L and 25-1 000 μg/L, respectively. The recoveries are between 74.2% and 110.7% with the relative standard deviations from 0.8% to 5.3% (n=6). The limits of quantitation of CMP, AMP, GMP, UMP and IMP are 0.7, 0.1, 0.7, 3.3, 0.6 mg/100 g, respectively. In order to study the accuracy of the method, 3 infant milk powder were analyzed. The method is sensitive, accurate, has good reproducibility and is suitable for the simultaneous determination of nucleotide content in infant formula products.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); milk powder; nucleotides; nucleosides; multiple reaction monitoring (MRM)

核苷酸是由含氮碱基、核糖或脱氧核糖和磷酸 3 种分子连接形成的化合物,主要有胞嘧啶核苷酸(CMP)、鸟嘌呤核苷酸(GMP)、腺嘌呤核苷酸(AMP)、尿嘧啶核苷酸(UMP)以及次黄嘌呤核苷酸(IMP)等 5 种。核苷酸是生物体内关键的含氮化合物之一,是各种核酸的基本组成单位。核苷酸对于婴幼儿的正常和良好发育发挥着关键作用,外源性核苷酸在摄入后能够被生物体消化吸收、代谢、转运。在婴幼儿奶粉中添加核苷酸对婴儿的生长发育有促进作用,可以提供免疫刺激、促进修复肠道损伤、促进肠道有益菌生长等^[1-3]。婴幼儿奶粉中的核苷酸含量是衡量奶粉营养的重要参数之一。很多国家制定了婴幼儿奶粉中核苷酸含量的相关标准,我国规定婴幼儿配方食品中允许添加的核苷酸使用总量为 0.12~0.58 g/kg^[4]。

目前,在核苷酸含量的检测过程中,样品前

处理方法包括固相萃取法^[5]、酶解法^[6]和沉淀杂质法^[7],定量检测方法主要包括高效液相色谱法^[8-10]、毛细管电泳法^[11-12]以及高效液相色谱-质谱联用法^[13-15]等。奶粉中核苷酸含量的检测受到许多因素的干扰,如高含量的蛋白质和脂肪杂质。核苷酸含有磷酸基团,其酸性强、极性大,普通反相液相色谱柱难以实现对核苷酸良好的保留和分离。2016 年,我国颁布了核苷酸的检验新标准^[16],但是该标准在处理奶粉等复杂样品时前处理简单,未进行进一步净化处理,由于核苷酸中 CMP 极性较强,出峰时间过早,基质干扰严重,不利于样品的准确定量。此外,流动相含有离子对试剂,导致平衡时间过长,色谱柱寿命大幅缩短。

本研究拟采用碱性磷酸酶脱去核苷酸上的磷酸基团,水解成相应的核苷,降低被测样品目标物的极性。通过选择性硼酸固相萃取净化,HPLC-MS/MS 分析,根据核苷酸和核苷之间的

转化系数计算婴幼儿奶粉中5种核苷酸含量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Triple Quad 5500 液相色谱-质谱联用仪:美国 AB SCIEX 公司产品;恒温振荡器、涡旋混合器:德国 IKA 公司产品;高速离心机:美国 Thermo 公司产品;氮气吹干仪:天津市恒奥科技有限公司产品。

甲醇、乙腈:色谱级,德国 Merck 公司产品;甲酸、乙酸铵、氨水:色谱级,美国 Sigma 公司产品;Affi-gel 601:美国 Bio-Rad Laboratories 公司产品;碱性磷酸酯酶(来自牛肠黏膜):美国 Sigma 公司产品;实验用水:由 Milli-Q 型超纯水仪制备。

胞嘧啶核苷酸(CMP)(纯度 $\geq 99\%$)、鸟嘌呤核苷酸(GMP)(纯度 $\geq 99\%$)、尿嘧啶核苷酸(UMP)(纯度 $\geq 98\%$)、次黄嘌呤核苷酸(IMP)(纯度 $\geq 98\%$)、腺嘌呤核苷酸(AMP)(纯度 $\geq 97\%$)、尿嘧啶核苷(U)(纯度 $\geq 99\%$)、胞嘧啶核苷(C)(纯度 $\geq 99.0\%$)、腺嘌呤核苷(A)(纯度 $\geq 99\%$)、次黄嘌呤核苷(I)(纯度 $\geq 99\%$)、鸟嘌呤核苷(G)(纯度 $\geq 98\%$)标准品:均为美国 Sigma Aldrich 公司产品; $1'-^{13}\text{C}$ 胞嘧啶核苷(纯度100%)、 $1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}$ 鸟嘌呤核苷(纯度100%)、 $1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}$ 次黄嘌呤核苷(纯度100%)内标物质:均为美国 Omicron Biochemicals 公司产品。

1.2 标准溶液的配制

1.2.1 储备标准溶液 核苷储备标准溶液:准确称取10 mg各核苷,用0.1 mol/L NaOH 溶液溶解,定容至10 mL容量瓶中,配制成约1.0 g/L标准储备液,于2~8℃储存。

核苷酸储备标准溶液:准确称取10 mg各核苷酸,用水溶解,定容至10 mL容量瓶中,得到1.0 g/L标准储备液,于2~8℃储存。

1.2.2 混合标准中间液 核苷混合标准中间液:分别准确量取适量的核苷储备标准溶液于5 mL容量瓶,用水定容,配制成鸟苷、胞苷、次黄嘌呤核苷为40 mg/L,腺苷为8 mg/L,尿苷为200 mg/L的核苷混合标准中间液。

核苷酸混合标准中间液:分别准确量取适量的核苷酸储备标准溶液于5 mL容量瓶,用

水定容,配制成鸟苷酸、胞苷酸、次黄嘌呤核苷酸为40 mg/L,腺苷酸为8 mg/L,尿苷酸为200 mg/L的核苷酸混合标准中间液。

1.2.3 内标储备液 分别准确称取大约10 mg的 $1'-^{13}\text{C}$ 胞嘧啶核苷、 $1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}$ 次黄嘌呤核苷和 $1',2',3',4',5'-^{13}\text{C}$ 鸟嘌呤核苷,用70%甲醇水溶液溶解并定容至10 mL容量瓶中,得到1.0 g/L的各内标储备液,于2~8℃储存。

1.2.4 内标混合工作液 移取0.1 mL各内标储备液于10 mL容量瓶,用水定容,得到10 mg/L的内标混合工作液,于2~8℃储存。

1.2.5 混合工作标准液 取适量的核苷混合标准中间液于5个10 mL容量瓶中,分别加入0.1 mL内标混合工作液,纯水定容并充分混合后,转移到自动进样瓶内,进行HPLC-MS/MS分析。

1.3 样品前处理

1.3.1 碱性磷酸酶溶液配制 取20 μL 碱性磷酸酯酶试剂,用5 mL 0.5 mol/L 醋酸铵(pH 8.75)将上述酶试剂完全溶解后,保存在4℃冰箱中,待用。所配制的酶试剂含量约为12 U/50 μL 。

1.3.2 硼酸亲和凝胶制备 准确量取50 mL 0.1 mol/L 磷酸钾(pH 6.5)于150 mL烧杯中,加入5 g Affi-gel 601亲和凝胶,盖上金属铝箔,持续搅拌4 h。用50 mL 0.25 mol/L 磷酸钾(pH 10.5)清洗凝胶2次,再向凝胶中加入100 mL 0.25 mol/L 磷酸钾(pH 10.5),强力涡旋离心管分散凝胶。将0.7 mL亲和胶浆体等份转移到带有扣盖的2 mL离心管中,待用。

1.3.3 样品制备 将核苷酸在碱性磷酸酶作用下水解成腺嘌呤核苷,示于图1。准确称取10 g奶粉,用温水充分溶解并定容于100 mL容量瓶中,准确移取1 mL至10 mL离心管。向离心管中加入1 mL 0.5 mol/L 醋酸铵溶液(pH 8.75)、50 μL 30%浓氨水、50 μL 1 mol/L 氯化镁溶液、50 μL 10 mmol/L 硫酸锌溶液和50 μL 碱性磷酸酶溶液,混匀后,在(37 \pm 2)℃恒温摇床中以165 r/min振荡2 h,取出离心管,分别多次加入12.5 mL 0.5 mol/L 磷酸钾溶液,将离心管中溶液转移至20 mL容量瓶中,用水定容,摇动混匀,待硼酸凝胶净化。

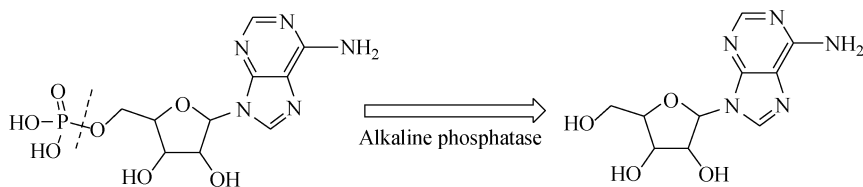


图1 在碱性磷酸酶作用下,腺嘌呤核苷酸水解成腺嘌呤核苷

Fig. 1 Hydrolysis of adenosine nucleotide to adenosine nucleoside at alkaline phosphatase

1.3.4 样品净化 取预先分装好 0.7 mL Affigel 601 的 2 mL 离心管,以 2 000 r/min 离心 3 min,去除上清液。分别加入 1 mL 0.25 mol/L 磷酸冲洗凝胶和磷酸钾缓冲液(pH 10.5),涡旋离心,去除上清液。再次加入 1 mL 0.25 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 10.5),涡旋放置 10~15 min,使凝胶完全转化为碱性形式,离心,去掉上清液。

向凝胶中加入 1 mL 样品溶液和 0.1 mL 10 mg/L 内标混合工作液,振荡 10~15 min,以 2 000 r/min 离心 3 min,去掉上清液;用 1 mL 0.25 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 10.5)冲洗凝胶,以 2 000 r/min 离心 3 min,去掉上清液;再用 1 mL 水冲洗凝胶,以 2 000 r/min 离心 3 min,去掉上清液。加入 250 μ L 5% 甲酸水溶液,涡旋 30 s 分散凝胶并释放出核苷,再加入 1.75 mL 甲醇,转移至 15 mL 离心管。40 $^{\circ}$ C

氮气吹至液面低于 1 mL,用纯水定容至 5 mL,0.22 μ m 水相微孔滤膜过滤后,转移至样品瓶中,待 LC-MS/MS 分析。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3 柱(2.1 mm \times 100 mm \times 1.8 μ m);流动相:A 为 5 mmol/L 甲酸铵(pH 6.0),B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~3.0 min(1%B),3.0~4.5 min(1%~10%B),4.5~5.0 min(10%~40%B),5.0~8.0 min(40%B),8.0~8.5 min(40%~1%B),8.5~14.0 min(1%B);流速:0.3 mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:2 μ L。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子扫描模式;电喷雾电压 5 500 V;离子源温度 500 $^{\circ}$ C。5 种核苷和 3 种内标物的监测离子对及相关参数列于表 1。

表 1 8 种化合物的质谱参数

Table 1 Mass spectrometric parameters of 8 compounds

化合物 Compound	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Product ion (m/z)	碰撞电压 Collision energy/eV	去簇电压 Declustering potential/V	保留时间 Retention time/min
$1'^{13}$ C 胞嘧啶核苷	245.1	112.0*	20	35	1.76
		95.1	56	35	
$1'2'3'4'5'^{13}$ C 鸟嘌呤核苷	289.2	152.0*	19	30	5.44
		135.0	49	30	
$1'2'3'4'5'^{13}$ C 次黄嘌呤核苷	274.1	137.1*	15	30	4.86
		110.0	55	30	
次黄嘌呤核苷	269.0	137.0*	16	40	4.86
		119.0	54	40	
胞嘧啶核苷	244.0	112.0*	18	40	1.76
		95.0	55	40	
尿嘧啶核苷	245.0	113.0*	19	40	2.45
		96.0	46	40	
腺嘌呤核苷	268.0	136.0*	24	40	6.94
		119.0	63	40	
鸟嘌呤核苷	284.0	152.0*	22	32	5.44
		135.0	52	32	

注:* 为定量离子

2 结果与讨论

2.1 前处理方法的优化

婴幼儿奶粉组分复杂,包含蛋白质、脂肪、维生素和矿物质等,样品提取后需净化才能进行 HPLC-MS/MS 分析。奶粉中核苷酸在碱性磷酸酶催化下水解成相应的核苷,再通过选择性硼酸固相萃取将核苷预分离。此时,在碱性条件下,干扰化合物会从凝胶上去除。

实验对比了 Waters Oasis MCX(150 mg, 6 mL)、Waters Oasis HLB(200 mg, 6 mL)、Affi-gel 601 凝胶)3 种固相萃取柱的净化效果。结果发现,利用 MCX 柱处理核苷标准品溶液时,未能完全保留 5 种核苷,其中尿苷在色谱中未出峰;HLB 柱对胞苷、尿苷未能保留,在色谱中未出峰;而 Affi-gel 601 凝胶对 5 种核苷化合物保留较好。因此,选择 Affi-gel 601 凝胶用于核苷净化。将样品溶液加入制作好的预备凝胶,在样品吸附于凝胶后,用磷酸钾溶液冲洗凝胶除去杂质,再用超纯水清洗凝胶,去除非挥发性的磷酸盐,降低其对质谱仪和色谱柱的损耗。通过这种方式,样品中的核苷完全保留于凝胶中,可以进行下一步洗脱步骤。

实验分别比较了 5%、10%、20% 甲酸水溶液对核苷洗脱效果的影响。结果发现,甲酸浓度对核苷洗脱的效果影响不大,其回收率均在 91.67%~103.03% 之间。考虑到甲酸浓度会对质谱仪和色谱柱产生影响,因此选用最低浓度的 5% 甲酸水溶液进行洗脱。

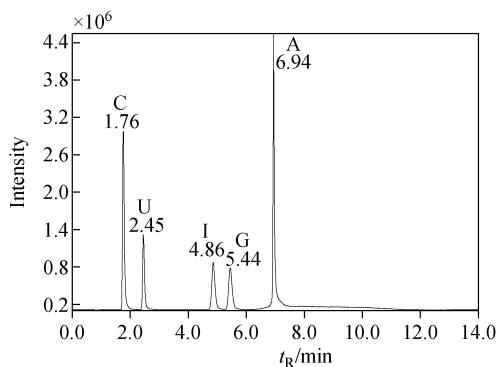
2.2 色谱条件的优化

在相同的流动相下,分别考察了 CORTECS C18(2.1 mm×100 mm×2.7 μm)和 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm×1.8 μm) 色谱柱对 5 种核苷的分离效能。发现 5 种核苷在 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱上均有较强的保留,各化合物均能得到较好的分离,且峰形良好。本实验选择 5 mmol/L 甲酸铵(A 相)和乙腈(B 相)作为流动相进行梯度洗脱,并优化洗脱程序,5 种核苷标准品的提取离子流色谱图示于图 2。

2.3 质谱条件的优化

根据核苷结构,采用电离源正离子模式,使

用 AB 5500 液相色谱-质谱联用仪的 MSONLY 模式对 1.0 mg/L 的 5 种核苷和 3 种内标物的单标溶液进行质谱条件优化,得到各化合物的母离子、主要碎片离子、最佳碰撞电压(collision energy, CE)和去簇电压(declustering potential, DP),列于表 1。



注:U. 尿嘧啶核苷;G. 鸟嘌呤核苷;
C. 胞嘧啶核苷;A. 腺嘌呤核苷;I. 次黄嘌呤核苷

图 2 5 种核苷标准品的提取离子流色谱图

Fig. 2 Extracted ion chromatogram of 5 nucleoside standards

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围 本实验采用内标法定量,将核苷标准溶液用水稀释为不同浓度的标准系列工作液,向每个样品瓶中加入等量的 100 μg/L 3 种同位素内标溶液,用超纯水定容,配制成为鸟苷、肌苷、胞苷为 5、10、20、50、100、200 μg/L,腺苷为 1、2、4、10、20、40 μg/L,尿苷为 25、50、100、250、500、1 000 μg/L 的核苷系列标准工作液。在优化的仪器条件下检测,用定量离子的峰面积(y)对质量浓度(x)进行线性回归,计算 5 种核苷的线性方程和相关系数,结果列于表 2。可见,5 种核苷在各自线性范围内的线性关系良好,相关系数均大于 0.998。

2.4.2 检出限、定量限、回收率和精密度 采用基质液添加各化合物标准溶液,以 3 倍信噪比(S/N)为检出限,10 倍信噪比为定量限,结合化合物在奶粉中允许添加的含量,确定 CMP、AMP、GMP、UMP、IMP 的检出限分别为 0.21、0.03、0.21、0.99、0.18 mg/100 g,定量限分别为 0.7、0.1、0.7、3.3、0.6 mg/100 g。核苷-核苷酸转化系数列于表 3。

表 2 5种核苷的线性方程、相关系数

Table 2 Regression equations, correlation coefficients of 5 nucleosides

化合物 Compound	线性方程 Regression equation	线性相关系数 Correlation coefficient (R^2)
肌苷	$y=0.01099x+0.00294$	0.9996
胞苷	$y=0.00814x+0.01534$	0.9999
尿苷	$y=0.00117x-0.00131$	0.9980
鸟苷	$y=0.00841x-0.00331$	0.9999
腺苷	$y=0.16265x+0.26217$	0.9981

表 3 核苷-核苷酸转化系数

Table 3 Conversion coefficients between nucleotides and corresponding nucleosides

化合物 Compound	核苷分子质量 Molecular mass of nucleoside	核苷酸分子质量 Molecular mass of nucleotide	转化系数 Conversion coefficient
胞嘧啶核苷酸	243.22	323.20	1.3288
鸟嘌呤核苷酸	283.24	407.18	1.4376
尿嘧啶核苷酸	244.2	324.18	1.3275
次黄嘌呤核苷酸	268.23	348.21	1.2982
腺嘌呤核苷酸	267.24	365.24	1.3667

采用标准加入法考察方法的回收率和精密度。准确称取 10 g 无添加核苷酸的奶粉样品,用温水充分溶解并定容至 100 mL 容量瓶中,分别准确移取 1 mL 于 20 mL 容量瓶,加入适量的

低、中、高 3 种浓度水平的核苷酸混合标准中间液和内标混合工作液,采用优化后的方法进行前处理,每个浓度水平进行 6 次平行测试,计算回收率及相对标准偏差(RSD),结果列于表 4。

表 4 奶粉中 5 种核苷酸的回收率、检出限和定量限

Table 4 Recoveries, LODs and LOQs of 5 nucleotides in milk powder

化合物 Compound	加标水平 Spiked/(mg/100 g)	回收率 Recovery/%	相对标准偏差 RSD/%	检出限 LOD/(mg/100 g)	定量限 LOQ/(mg/100 g)
肌苷酸	2	87.2	4.0	0.18	0.6
	5	82.5	0.8		
	10	82.8	1.4		
胞苷酸	2	94.7	4.9	0.21	0.7
	5	94.4	3.8		
	10	110.7	2.2		
尿苷酸	10	108.1	2.6	0.99	3.3
	25	95.1	3.2		
	50	93.7	3.1		
鸟苷酸	2	95.0	3.0	0.21	0.7
	5	89.3	3.0		
	10	91.2	2.0		
腺苷酸	0.4	74.2	5.3	0.03	0.1
	1	91.8	4.8		
	2	98.1	1.8		

可见,5种核苷酸换算回收率为74.2%~110.7%,相对标准偏差在0.8%~5.3%之间($n=6$)。该方法的准确度、精密度和重复性均较好,可满足检测要求。

2.4.3 实际样品分析 从市场购买3批标识有核苷酸的婴幼儿营养奶粉,用本实验方法进行检测分析。3批样品标签含有核苷酸分别为30.0、14.6、45.0 mg/100 g,实际测得为28.7、15.8、43.7 mg/100 g($n=2$),符合我国规定的婴幼儿配方食品中允许添加核苷酸的使用总量。

3 结论

本研究建立了奶粉中核苷酸的检测方法,将样品用碱性磷酸酶处理后,核苷酸转化为核苷,使用亲和凝胶吸附核苷,清洗液清洗凝胶后达到去除杂质的目的,再用洗脱液将核苷洗脱,高效液相色谱-串联质谱法准确定量婴幼儿奶粉中5种核苷酸。该方法可以高选择性地保留目标化合物、净化效果好、检测准确度高,可用于婴幼儿配方奶粉中核苷酸的检测。

参考文献:

[1] COUTINHO-SILVA R, OJCIUS D M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites[J]. *Microbes and Infection*, 2012, 14(14): 1 271-1 277.

[2] 王楠,蔡夏夏,李勇. 外源核苷酸与免疫功能研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(5): 278-282.
WANG Nan, CAI Xiaxia, LI Yong. Advances in research on exogenous nucleotides and immune functions[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2016, 37(5): 278-282 (in Chinese).

[3] ZIMMERMANN H. Extracellular ATP and other nucleotides-ubiquitous triggers of intercellular messenger release[J]. *Purinergic Signal*, 2016, 12(1): 25-57.

[4] GB 14880—2012 食品安全国家标准食品营养强化剂使用标准[S]. 北京:中国标准出版社, 2012.

[5] 孙姗姗,刘文婧,张隆龙,丁艺,王海燕. 三重四极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 Shanshan, LIU Wenjing, ZHANG Longlong, DING Yi, WANG Haiyan. Determination of 5 kinds of nucleotides in milk powder by triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2016, 7(3): 983-990 (in Chinese).

- [6] WANG K, CUI J H, XING S Y, DOU H X. A calixpyridinium-based supramolecular tandem assay for alkaline phosphatase and its application to ATP hydrolysis reaction[J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2016, 14(9): 2 684-2 690.
- [7] FERREIRA I M O, MENDES E, GOMES A M P, FARIA M A, FERREIRA M A. The determination and distribution of nucleotides in dairy products using HPLC and diode array detection [J]. *Food Chemistry*, 2001, 74(2): 239-244.
- [8] QIU W Q, CHEN S S, XIE J, QU Y H, SONG X. Analysis of 10 nucleotides and related compounds in *Litopenaeus vannamei* during chilled storage by HPLC-DAD[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 67: 187-193.
- [9] BHATT D P, CHEN X S, GEIGER J D, ROSENBERGER T A. A sensitive HPLC-based method to quantify adenine nucleotides in primary astrocyte cell cultures[J]. *Journal of Chromatography B*, 2012(889/890): 105-107.
- [10] 肖伟敏,刘文丽,张协光,苏佳婷,杨国武. 阴离子交换高效液相色谱法测定婴幼儿食品与乳品中的核苷酸[J]. *分析测试学报*, 2018, 37(8): 962-966.
XIAO Weimin, LIU Wenli, ZHANG Xieguang, SU Jiating, YANG Guowu. 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 (in Chinese).
- [11] DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ J, MATEOS-VIVAS M, RODRÍGUEZ-GONZALO E, GARCÍA-GÓMEZ D, BUSTAMANTE-RANGEL M, ZAMARREÑO M M D, CARABIAS-MARTÍNEZ R. Determination of nucleosides and nucleotides in food samples by using liquid chromatography and capillary electrophoresis[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2017, 92: 12-31.
- [12] SVOBODOVÁ J, KOFRŇOVÁ O, BENADA O, KRÁL V. Separation of oligopeptides, nucleobases, nucleosides and nucleotides using capil-

- lary electrophoresis/electrochromatography with sol-gel modified inner capillary wall[J]. Journal of Chromatography A, 2017, 1 517: 185-194.
- [13] 孙立民. 飞行时间二次离子质谱在生物材料和生命科学中的应用(上)[J]. 质谱学报, 2012, 33(1): 55-64.
- SUN Limin. Applications of time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) in biomaterials and life science (part 1)[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2012, 33(1): 55-64(in Chinese).
- [14] CHEN Y Y, HU P, ZHANG Y J, LI Y, ZHU X L, CHEN J W, CUI X B, LI X, CHEN Y. Determination of free amino acids and nucleosides and nucleobases in *Annona squamosa* L. fruitages from different regions in China by LC-QTRAP-MS/MS[J]. Analytical Methods, 2017, 9(25): 3 862-3 869.
- [15] JIMMERSON L C, BUSHMAN L R, RAYM L, ANDERSON P L, KISER J J. A LC-MS/MS method for quantifying adenosine, guanosine and inosine nucleotides in human cells[J]. Pharmaceutical Research, 2017, 34(1): 73-83.
- [16] 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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.