



中华人民共和国国家标准

GB 1903.69—2024

食品安全国家标准

食品营养强化剂 5'-单磷酸尿苷

2024-02-08 发布

2024-08-08 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

食品安全国家标准

食品营养强化剂 5'-单磷酸尿苷

1 范围

本标准适用于以酵母核糖核酸为原料经酶解法,或以核苷为原料经酶促法制得的食品营养强化剂 5'-单磷酸尿苷。

2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

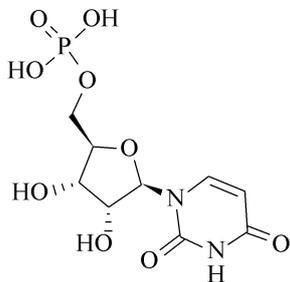
2.1 化学名称

5'-单磷酸尿苷

2.2 分子式

$C_9H_{13}N_2O_9P$

2.3 结构式



2.4 相对分子质量

324.18(按 2018 年国际相对原子质量)

3 技术要求

3.1 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项目	要求	检验方法
色泽	白色或类白色	取适量试样,置于清洁、干燥的白瓷盘中,在自然光线下观察其色泽和状态,嗅其气味
状态	结晶状颗粒或粉末	
气味	无特殊气味	

3.2 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项目		指标	检验方法
5'-单磷酸尿苷含量(以干基计), $\omega/\%$		\geq 95.0	附录 A 中 A.4
吸光度比	$A_{250\text{ nm}}/A_{260\text{ nm}}$	0.70~0.78	附录 A 中 A.5
	$A_{280\text{ nm}}/A_{260\text{ nm}}$	0.34~0.42	
水分, $\omega/\%$		\leq 10.0	GB 5009.3 第四法 卡尔·费休法
有关物质, $\omega/\%$		\leq 2.0	附录 A 中 A.6
pH(0.25%水溶液)		1.8~2.5	GB/T 9724
乙醇/(mg/kg)		\leq 1 000	附录 A 中 A.7
铅(Pb)/(mg/kg)		\leq 1.0	附录 A 中 A.8
总砷(以 As 计)/(mg/kg)		\leq 2.0	附录 A 中 A.9

3.3 微生物限量

微生物限量应符合表 3 的规定。

表 3 微生物限量

项目	限量	检验方法
菌落总数/(CFU/g)	\leq 1 000	GB 4789.2
霉菌和酵母菌总数/(CFU/g)	\leq 100	GB 4789.15
大肠菌群/(MPN/g)	$<$ 3	GB 4789.3
沙门氏菌/25 g	不得检出	GB 4789.4

附录 A

检验方法

A.1 警示

本标准试验方法中使用的部分试剂具有毒性或腐蚀性,使用时需小心谨慎并按照相关规定操作。若溅到皮肤上应立即用水冲洗,严重者应立即治疗。在使用挥发性酸时,要在通风橱中进行。

A.2 一般规定

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的一级水。试验方法中所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品,在没有注明其他要求时,均按 GB/T 601、GB/T 602 和 GB/T 603 的规定制备。所用溶液在未注明用何种溶剂配制时,均指水溶液。

A.3 鉴别试验

A.3.1 试剂和材料

A.3.1.1 盐酸(HCl):36%~38%。

A.3.1.2 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

A.3.1.3 三水合磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。

A.3.1.4 5'-单磷酸尿苷标准品($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$,CAS号:58-97-9):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

A.3.1.5 盐酸溶液:移取 1 mL 盐酸,溶于水并定容至 1 000 mL。

A.3.1.6 磷酸二氢钾溶液(0.1 mol/L):称取 13.6 g 磷酸二氢钾,溶于水并定容至 1 000 mL。

A.3.1.7 磷酸氢二钾溶液(0.1 mol/L):称取 2.28 g 三水合磷酸氢二钾,溶于水并定容至 100 mL。

A.3.1.8 流动相:0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液(A.3.1.6),用 0.1 mol/L 的磷酸氢二钾溶液(A.3.1.7)调 pH 至 5.6,过滤膜,备用。

A.3.1.9 微孔滤膜:0.45 μm ,水系。

A.3.2 仪器和设备

A.3.2.1 电子天平:感量为 0.001 g。

A.3.2.2 紫外-可见光分光光度计。

A.3.2.3 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

A.3.2.4 pH 计:精度为 0.01。

A.3.2.5 石英比色皿:1 cm。

A.3.3 紫外最大吸收峰鉴别

A.3.3.1 分析步骤

A.3.3.1.1 试样溶液的制备

称取试样 0.02 g(精确至 0.001 g),用盐酸溶液(A.3.1.5)溶解并定容至 1 000 mL,混匀,作为试样溶液。

A.3.3.1.2 测定

将试样溶液(见 A.3.3.1.1)注入 1 cm 石英比色皿,以盐酸溶液(A.3.1.5)为空白,用紫外-可见分光光度计 A.3.2.2 测定其吸光度,最大吸收值应在 (262 ± 2) nm 处。

A.3.4 液相色谱保留时间鉴别

A.3.4.1 分析步骤

A.3.4.1.1 试样溶液的制备

称取试样 0.02 g(精确至 0.001 g),用流动相(A.3.1.8)溶解并定容至 10 mL。移取该溶液 1.00 mL,用流动相稀释并定容至 100 mL,混匀,过滤膜,作为试样溶液。

A.3.4.1.2 对照溶液的制备

称取 5'-单磷酸尿苷标准品 0.02 g(精确至 0.001 g),用流动相(A.3.1.8)溶解并定容至 10 mL。移取该溶液 1.00 mL,用流动相稀释并定容至 100 mL,混匀,作为对照溶液。

A.3.4.1.3 色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 色谱柱(柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm),或等效色谱柱。
- b) 检测波长: 254 nm。
- c) 流动相: 同 A.3.1.8。
- d) 流速: 1.0 mL/min。
- e) 柱温: 30 °C。
- f) 进样体积: 20 μL。

A.3.4.1.4 系统适应性试验

将对照溶液(见 A.3.4.1.2)注入液相色谱仪中,记录色谱图。

5'-单磷酸尿苷主峰与它最近的杂质峰的分离度 R 应不小于 2.0。

连续进样 6 次,5'-单磷酸尿苷峰面积的相对标准偏差(RSD)应不大于 2.0 %。

A.3.4.1.5 测定

将试样溶液(见 A.3.4.1.1)及对照溶液(见 A.3.4.1.2)分别注入液相色谱仪中,记录色谱图。两者的主峰保留时间应一致,相对偏差 $\pm 2.5\%$ 。

A.4 5'-单磷酸尿苷含量(以干基计)

A.4.1 紫外分光光度法

A.4.1.1 方法原理

采用紫外-可见分光光度计,测定 260 nm 处试样溶液的吸光度值,以摩尔吸光系数计算试样中 5'-单磷酸尿苷的含量。

A.4.1.2 试剂和材料

A.4.1.2.1 盐酸(HCl): 36%~38%。

A.4.1.2.2 盐酸溶液: 移取 1 mL 盐酸,溶于水并定容至 1 000 mL。

A.4.1.3 仪器和设备

A.4.1.3.1 电子天平:感量为 0.001 g。

A.4.1.3.2 紫外-可见光分光光度计。

A.4.1.3.3 石英比色皿:1 cm。

A.4.1.4 分析步骤

称取 0.5 g(精确至 0.001 g)样品,用盐酸溶液(A.4.1.2.2)溶解并定容至 1 000 mL。移取该溶液 10.0 mL,用盐酸溶液稀释并定容至 250 mL,该溶液即为试样溶液。将试样溶液注入 1 cm 的石英比色皿中,以盐酸溶液做空白,用紫外-可见光分光光度计测定其在 260 nm 处的吸光度。

A.4.1.5 结果计算

试样中 5'-单磷酸尿苷的质量分数(以干基计) w_1 的数值以百分比(%)表示,按式(A.1)计算。

$$w_1 = \frac{A \times M \times V \times f}{\epsilon \times b \times m} \times \frac{100}{100 - w} \times 100 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

A —— 试样溶液在波长 260 nm 下的吸光度;

M —— 5'-单磷酸尿苷的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol)[$M=324.18$];

V —— 试样定容体积,单位为升(L);

f —— 试样溶液的稀释倍数($f=25$);

ϵ —— 5'-单磷酸尿苷在 260 nm 处的摩尔吸收系数,单位为升每摩尔厘米[L/(mol·cm)]($\epsilon=9\ 900$);

b —— 比色皿厚度,单位为厘米(cm);

m —— 试样的质量,单位为克(g);

w —— 试样的水分含量,以%表示。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,保留小数点后一位。两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的 2%。

A.4.2 高效液相色谱法

A.4.2.1 方法原理

采用液相色谱仪,测定试样溶液,以保留时间定性,峰面积外标法定量。

A.4.2.2 试剂和材料

A.4.2.2.1 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

A.4.2.2.2 三水合磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。

A.4.2.2.3 5'-单磷酸尿苷标准品($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$, CAS 号:58-97-9):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

A.4.2.2.4 磷酸二氢钾溶液(0.1 mol/L):称取 13.6 g 磷酸二氢钾,溶于水并定容至 1 000 mL。

A.4.2.2.5 磷酸氢二钾溶液(0.1 mol/L):称取 2.28 g 三水合磷酸氢二钾,溶于水并定容至 100 mL。

A.4.2.2.6 流动相:0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液(A.4.2.2.4),用 0.1 mol/L 的磷酸氢二钾溶液(A.4.2.2.5)调 pH 至 5.6,过滤膜,备用。

A.4.2.2.7 5'-单磷酸尿苷标准储备液(2 000 mg/L):准确称取 5'-单磷酸尿苷标准品 0.02 g(精确至

0.000 1 g)于 10 mL 容量瓶中,用流动相(A.4.2.2.6)溶解并定容至刻度,配制成质量浓度 2 000 mg/L 标准储备液。4 ℃下保存。

A.4.2.2.8 5'-单磷酸尿苷标准工作溶液(20 mg/L):移取 2 000 mg/L 的标准储备液(A.4.2.2.7) 1.00 mL于 100 mL 量瓶中,用流动相(A.4.2.2.6)稀释至刻度。

A.4.2.2.9 微孔滤膜:0.45 μm,水系。

A.4.2.3 仪器和设备

A.4.2.3.1 电子天平:感量为 0.000 1 g。

A.4.2.3.2 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

A.4.2.3.3 pH 计:精度为 0.01。

A.4.2.4 分析步骤

A.4.2.4.1 试样溶液的制备

称取试样 0.02 g(精确至 0.000 1 g),用流动相溶解并定容至 10 mL。移取该溶液 1.00 mL,用流动相(A.4.2.2.6)稀释并定容至 100 mL,混匀,过滤膜,作为试样溶液。

A.4.2.4.2 色谱参考条件

- a) 色谱柱:C₁₈ 色谱柱(柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm),或等效色谱柱。
- b) 检测波长:254 nm。
- c) 流动相:同 A.4.2.2.6。
- d) 流速:1.0 mL/min。
- e) 柱温:30 ℃。
- f) 进样体积:20 μL。

A.4.2.4.3 系统适应性试验

取 5'-单磷酸尿苷标准工作溶液(A.4.2.2.8),注入液相色谱仪中,记录色谱图。

5'-单磷酸尿苷主峰与它最近的杂质峰的分离度 *R* 应不小于 2.0。

连续进样 6 次,5'-单磷酸尿苷峰面积的相对标准偏差(RSD)应不大于 2.0%。

A.4.2.4.4 测定

系统适用性试验合格后,将 5'-单磷酸尿苷标准工作溶液(见 A.4.2.2.8)及试样溶液(见 A.4.2.4.1)分别注入液相色谱仪中,记录色谱图,参考色谱图见附录 B 中图 B.1,按外标法进行计算。

A.4.2.5 结果计算

试样中 5'-单磷酸尿苷的质量分数(以干基计) w_2 的数值以百分比(%)表示,按式(A.2)计算。

$$w_2 = \frac{A_1}{A_2} \times \frac{C_2}{C_1} \times \frac{100}{100 - w} \times 100 \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

*A*₁——试样溶液中 5'-单磷酸尿苷的峰面积;

*A*₂——标准溶液中 5'-单磷酸尿苷的峰面积;

*C*₂——标准溶液中 5'-单磷酸尿苷的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);

*C*₁——试样溶液中样品的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);

w —— 试样的水分含量,以%表示。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,保留小数点后一位。两次独立测定结果的绝对差值不得超过其算术平均值的 2%。

A.5 吸光度比

A.5.1 方法原理

通过测定试样溶液在特定波长处的吸光度比值来表示试样的纯度。

A.5.2 试剂和材料

A.5.2.1 盐酸(HCl):36%~38%。

A.5.2.2 盐酸溶液:移取 1 mL 盐酸,溶于水并定容至 1 000 mL。

A.5.3 仪器和设备

A.5.3.1 电子天平:感量为 0.001 g。

A.5.3.2 紫外-可见光分光光度计。

A.5.3.3 石英比色皿:1 cm。

A.5.4 分析步骤

A.5.4.1 试样溶液的制备

称取试样 0.02 g(精确至 0.001 g),用盐酸溶液(A.5.2.2)溶解并定容至 1 000 mL,混匀,作为试样溶液。

A.5.4.2 测定

将试样溶液(见 A.5.4.1)注入 1 cm 石英比色皿,以盐酸溶液(A.5.2.2)为空白,用紫外-可见光分光光度计分别测定 250 nm、260 nm 及 280 nm 处的吸光度。

A.5.5 结果计算

紫外吸光度比值 X_1 和 X_2 分别按式(A.3)和式(A.4)计算。

$$X_1 = \frac{A_{250}}{A_{260}} \dots\dots\dots(A.3)$$

$$X_2 = \frac{A_{280}}{A_{260}} \dots\dots\dots(A.4)$$

式中:

A_{250} —— 试样溶液在波长 250 nm 处测得的吸光度;

A_{260} —— 试样溶液在波长 260 nm 处测得的吸光度;

A_{280} —— 试样溶液在波长 280 nm 处测得的吸光度。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,保留两位有效数字。两次独立测定结果的绝对差值不得超过其算术平均值的 5%。

A.6 有关物质

A.6.1 方法原理

试样用流动相溶解后,采用液相色谱仪检测,峰面积比较法定量。

A.6.2 试剂和材料

A.6.2.1 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

A.6.2.2 三水合磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。

A.6.2.3 5'-单磷酸尿苷标准品($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$, CAS 号: 58-97-9): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

A.6.2.4 尿苷($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$): 纯度 $\geq 98\%$ 。

A.6.2.5 尿嘧啶($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$): 纯度 $\geq 98\%$ 。

A.6.2.6 磷酸二氢钾溶液(0.1 mol/L): 称取 13.6 g 磷酸二氢钾, 溶于水并定容至 1 000 mL。

A.6.2.7 磷酸氢二钾溶液(0.1 mol/L): 称取 2.28 g 三水合磷酸氢二钾, 溶于水并定容至 100 mL。

A.6.2.8 流动相: 0.1 mol/L 磷酸二氢钾(A.6.2.6), 用 0.1 mol/L 的磷酸氢二钾(A.6.2.7)调 pH 至 5.6, 过滤膜, 备用。

A.6.2.9 微孔滤膜: 0.45 μm , 水系。

A.6.3 仪器和设备

A.6.3.1 电子天平: 感量为 0.001 g。

A.6.3.2 高效液相色谱仪: 配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

A.6.3.3 pH 计: 精度为 0.01。

A.6.4 分析步骤

A.6.4.1 系统适应性溶液的制备

分别称取 5'-单磷酸尿苷标准品(A.6.2.3)、尿苷(A.6.2.4)和尿嘧啶(A.6.2.5)0.02 g(精确至 0.001 g), 用流动相溶解并定容至 10 mL。移取上述溶液各 1.00 mL, 用流动相稀释并定容至 100 mL, 混匀。

A.6.4.2 试样溶液的制备

称取试样 0.02 g(精确至 0.001 g), 用流动相溶解并定容至 10 mL。移取该溶液 5.00 mL, 用流动相稀释并定容至 10.0 mL, 混匀, 过滤膜。

A.6.4.3 对照溶液的制备

移取试样溶液(见 A.6.4.2)2.00 mL, 用流动相稀释并定容至 100 mL, 混匀。

A.6.4.4 灵敏度溶液的制备

移取对照溶液(见 A.6.4.3)1.00 mL, 用流动相稀释并定容至 10 mL, 混匀。

A.6.4.5 色谱参考条件

同 A.3.4.1.3。

运行时间不小于 5'-单磷酸尿苷保留时间的 4 倍。

A.6.4.6 系统适应性试验

取系统适应性溶液(A.6.4.1)注入液相色谱仪中, 记录色谱图。

5'-单磷酸尿苷主峰与它最近的杂质峰的分离度 R 应不小于 2.0。

灵敏度溶液中 5'-单磷酸尿苷主峰的信噪比应大于 3。

A.6.4.7 测定

系统适用性试验合格后,将试样溶液(见 A.6.4.2)及对照溶液(见 A.6.4.3)分别注入液相色谱仪中,记录色谱图。参考色谱图见图 B.2。根据试样溶液各杂质峰的峰面积之和与对照溶液中 5'-单磷酸尿苷的峰面积进行比较计算有关物质的含量。

A.6.5 结果计算

试样中有关物质的含量 w_3 的数值以百分比(%)表示,按式(A.5)计算。

$$w_3 = \frac{A_3 \times 2}{A_4 \times 100} \times 100 \quad \dots\dots\dots (A.5)$$

式中:

A_3 ——试样溶液除主峰以外的所有杂质峰的峰面积之和;

A_4 ——对照溶液中主峰的峰面积。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,保留两位有效数字。两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的 10%。

A.7 乙醇

A.7.1 方法原理

试样置于密闭的顶空瓶中,在特定温度下平衡一定时间,使试样中的乙醇挥发出来并在顶空瓶内达到动态平衡,通过气相色谱仪进行分离检测,外标法定量。

A.7.2 试剂和材料

A.7.2.1 乙醇(C_2H_6O):色谱纯,纯度 $\geq 99.5\%$ 。

A.7.2.2 氢氧化钠(NaOH)。

A.7.2.3 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 40 g 氢氧化钠(A.7.2.2),加水稀释并定容至 1 000 mL。

A.7.2.4 顶空进样瓶:体积 20 mL。

A.7.3 仪器和设备

A.7.3.1 电子天平:感量为 0.001 g、0.000 1 g。

A.7.3.2 气相色谱仪,配顶空进样器和氢火焰离子化检测器。

A.7.4 分析步骤

A.7.4.1 试样溶液的制备

称取试样 10 g(精确至 0.001 g),用氢氧化钠溶液(A.7.2.3)溶解并定容至 100 mL。移取 10 mL 该溶液于顶空进样瓶,旋紧盖子,备用。

A.7.4.2 对照溶液的制备

称取 0.01 g 乙醇(精确至 0.000 1 g),用氢氧化钠溶液(A.7.2.3)溶解并定容至 100 mL。移取 10 mL 该溶液于顶空进样瓶,旋紧盖子,备用。

A.7.4.3 色谱参考条件

a) 色谱柱:毛细管柱(30 m \times 0.53 mm,固定液为 6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷,薄膜厚度

为 3.00 μm)或等效柱。

- b) 柱温:初始温度 40 °C,保持 20 min,以 10 °C/min 速率升温至 240 °C,保持 10 min。
- c) 检测器温度:250 °C。
- d) 进样口温度:140 °C。
- e) 载气:N₂;柱流量:2.5 mL/min。
- f) 顶空进样器条件:平衡温度 80 °C,平衡时间 60 min;定量环温度 85 °C;传输线温度 90 °C。
- g) 进样时间:1 min。
- h) 进样量:1.0 mL。

A.7.4.4 系统适应性试验

取对照溶液(见 A.7.4.2)注入气相色谱仪中,观察色谱图。

连续进样 6 次,乙醇峰面积的相对标准偏差(RSD)应不大于 5.0%。

A.7.4.5 测定

系统适用性试验合格后,将试样溶液(见 A.7.4.1)和对照溶液(见 A.7.4.2)分别注入气相色谱仪中,记录色谱图,参考色谱图见附录 C 中图 C.1。比较乙醇峰面积,计算乙醇含量。

A.7.5 结果计算

试样中乙醇的含量 w_4 的数值以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(A.6)计算。

$$w_4 = \frac{A_5 \times C_3 \times V_1 \times 1\ 000}{A_6 \times m_1 \times 1\ 000} \dots\dots\dots (A.6)$$

式中:

- A_5 ——试样溶液乙醇的峰面积;
- C_3 ——对照溶液中乙醇的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- V_1 ——试样溶液的定容体积,单位为毫升(mL);
- m_1 ——试样质量,单位为克(g);
- 1 000 ——换算系数;
- A_6 ——对照溶液乙醇的峰面积。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,保留两位有效数字。两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的 10%。

A.8 铅(Pb)

称取试样 1 g(精确至 0.001 g),用 1%硝酸溶解并定容至 50 mL,摇匀,作为试样溶液。其他操作按 GB 5009.12 或 GB 5009.75 石墨炉原子吸收光谱法的规定。

A.9 总砷(以 As)计

称取试样 1 g(精确至 0.001 g),加 10 mL 水溶解后,加 4 mL 100 g/L 抗坏血酸和硫脲混合溶液,用水定容至 50 mL,摇匀,作为试样溶液。其他操作按 GB 5009.11 或 GB 5009.76 氢化物原子荧光光度法的规定。

附录 B
5'-单磷酸尿苷液相色谱图

5'-单磷酸尿苷标准品液相色谱图如图 B.1 所示。5'-单磷酸尿苷试样有关物质液相色谱图如图 B.2 所示。

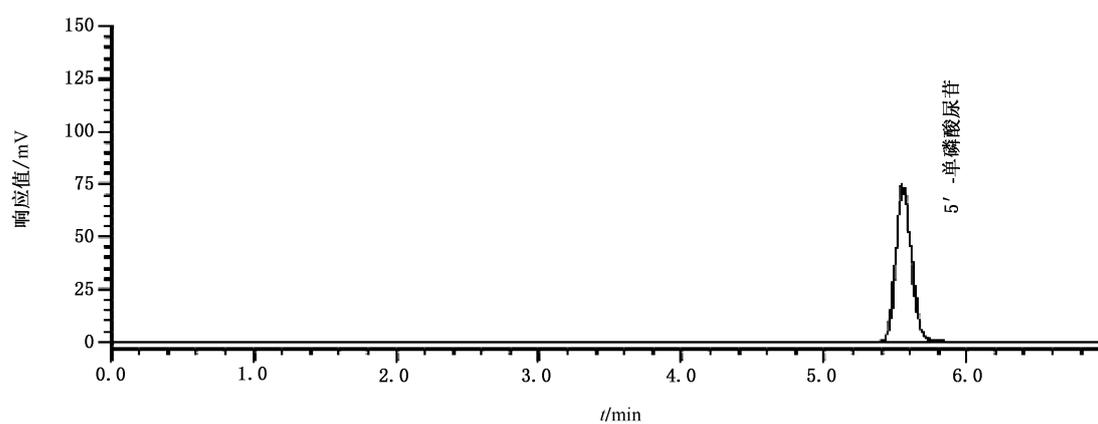


图 B.1 5'-单磷酸尿苷标准品液相色谱图

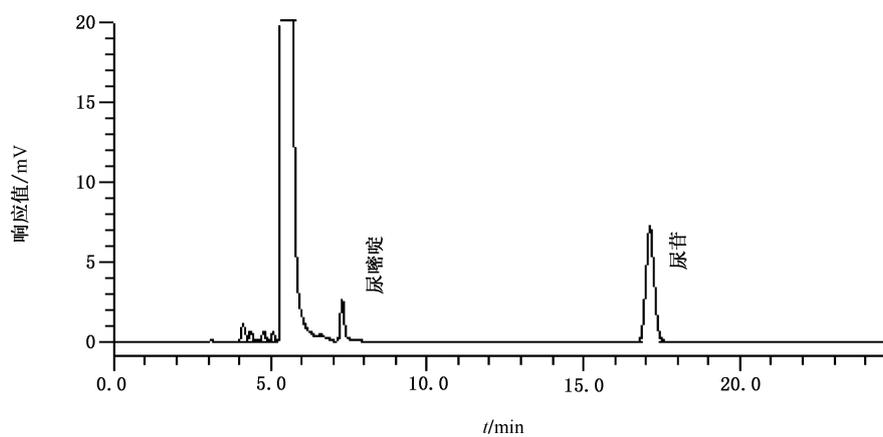


图 B.2 5'-单磷酸尿苷试样有关物质液相色谱图

附录 C
乙醇气相色谱图

乙醇气相色谱图如图 C.1 所示。

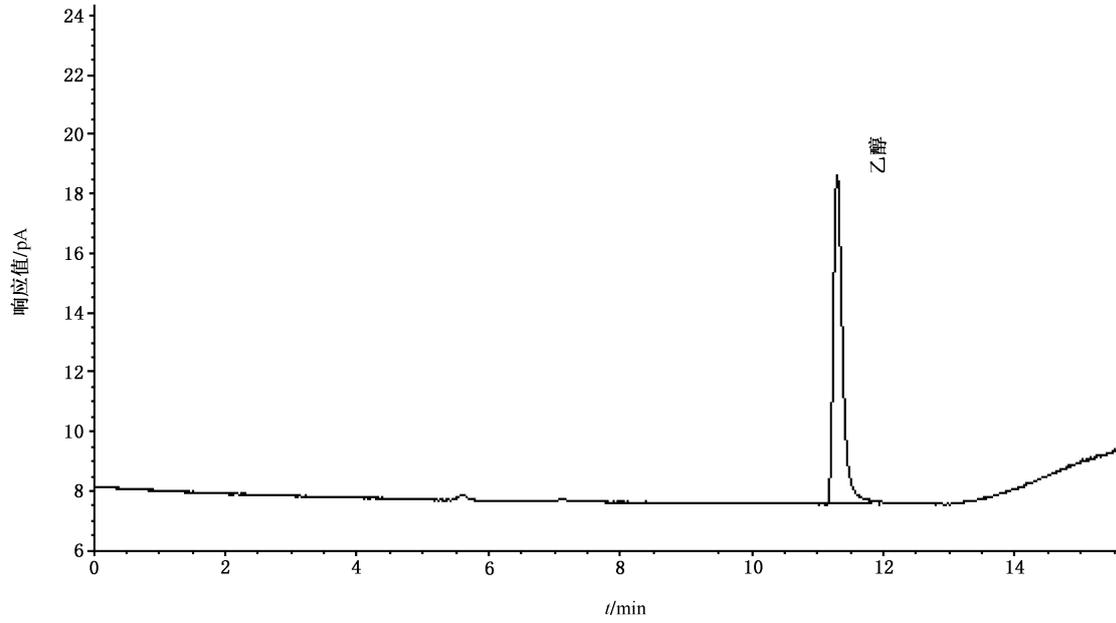


图 C.1 乙醇气相色谱图