



中华人民共和国国家标准

GB XXXX—XXXX

食品安全国家标准

食品营养强化剂 5'-单磷酸尿苷

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 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

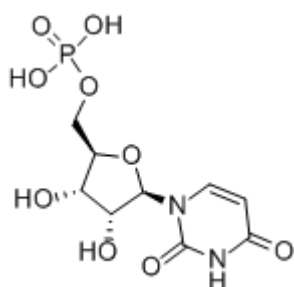
2.1 化学名称

5'-单磷酸尿苷

2.2 分子式

$C_9H_{13}N_2O_9P$ 。

2.3 结构式



2.3 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
状态	结晶状颗粒或粉末	

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），w/%	≥ 95.0	附录 A 中 A.4
吸光度比	A _{250nm} /A _{260nm}	0.70~0.78
	A _{280nm} /A _{260nm}	0.34~0.42
水分，w/%	≤ 10.0	GB 5009.3 卡尔·费休法
有关物质，%	≤ 2	附录 A 中 A.6
pH(0.25%水溶液)	1.8~2.5	GB/T 9724
乙醇/(mg/kg)	≤ 1000	附录 A 中 A.7
铅(Pb) /(mg/kg)	≤ 1.0	附录 A 中 A.8
总砷(以 As 计) /(mg/kg)	≤ 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	采样方案 ^a 及限量				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数/(CFU/g)	5	2	1000	10000	GB 4789.2
大肠菌群/(CFU/g)	5	2	10	100	GB 4789.3
沙门氏菌	5	0	0/25g	---	GB 4789.4
霉菌和酵母菌总数/(CFU/g) ≤	100				GB 4789.15
^a 样品的采样及处理按 GB 4789.1 执行。					

附 录 A

检验方法

A.1 警告

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 之规定制备。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：68-97-9)：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1000 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1000 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 (精确到0.001 g)，用盐酸溶液 (A.3.1.5) 溶解并定容至1000 mL，混匀，作为试样溶液。

A.3.3.1.2 测定

将试样溶液 (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-可见分光光度计测定其吸光度，最大吸收值应在 (262 ± 2) nm波长处。

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（精确到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（精确到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： C_{18} 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 $^{\circ}\text{C}$ 。
- f) 进样体积：20 μL 。

A.3.4.1.4 系统适应性试验

将对照溶液(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之间的分离度R应不小于2.0。

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

A.3.4.1.5 测定

将试样溶液（A.3.4.1.1）及对照溶液（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-可见光分光光度计，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 试剂与材料

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1000 mL。

A.4.1.3 仪器与设备

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（精确到0.001 g）样品，用盐酸溶液（A.4.1.2.2）溶解并定容至1000 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，以盐酸溶液作空白，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 ，数值以百分比（%）表示，按式（A.1）计算。

$$w_1 = \frac{A \times 324.18}{9900} \times \frac{V}{b} \times \frac{25}{m} \times \frac{100}{100 - w} \times 100 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

A——试样溶液在波长260 nm下的吸光度；

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

9900 ——5'-单磷酸尿苷在波长260 nm下的摩尔吸光系数，单位为升每摩尔每厘米 [L/(mol·cm)]；

V——试样定容体积，单位为升（L）；

b ——比色皿厚度，单位为厘米（cm）；

25 ——试样溶液的稀释倍数；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

w ——试样的水分含量，单位为百分比（%）；

100 ——换算系数。

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 试剂与材料

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：68-97-9）：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1000 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（2000 mg/L）：准确称取5'-单磷酸尿苷标准品0.02 g（精确到0.0001 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，配制成浓度2000 mg/L标准储备液。于4℃保存。

A.4.2.2.8 5'-单磷酸尿苷标准工作溶液（20 mg/L）：移取2000 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。现用现配。

A.4.2.2.9 微孔滤膜：0.45 μm，水系。

A.4.2.3 仪器与设备

A.4.2.3.1 电子天平：感量为0.0001 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（精确到0.0001 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5μm), 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之间的分离度R应不小于2.0。

连续进样6次, 5'-单磷酸尿苷峰面积响应值的相对标准偏差(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(A.4.2.2.8)及试样溶液(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 , 数值以百分比(%)表示, 按公式(A.2)计算。

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

式中:

A_1 ——试样溶液中5'-单磷酸尿苷的峰面积响应值;

A_2 ——标准溶液中5'-单磷酸尿苷的峰面积响应值;

C_s ——标准溶液中5'-单磷酸尿苷的浓度, 单位为毫克每升(mg/L);

C_i ——试样溶液中样品的浓度, 单位为毫克每升(mg/L);

w ——试样的水分含量, 单位为百分比(%);

100——换算系数。

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 试剂与材料

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1000 mL。

A. 5. 3 仪器与设备

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（精确到0.001 g），用盐酸溶液（A.5.2.2）溶解并定容至1000 mL，混匀，作为试样溶液。

A. 5. 4. 2 测定

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

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（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 250nm 处测得的吸光度；

A_{260} ——试样溶液在波长 260nm 处测得的吸光度；

A_{280} ——试样溶液在波长 280nm 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 1%。

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 试剂与材料

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：68-97-9）：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1000 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 仪器与设备

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(精确到0.001 g),用流动相溶解并定容至10 mL。分别移取上述溶液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0.01 g(精确到0.001 g),用流动相溶解并定容至10 mL。移取该溶液1.00 mL,用流动相稀释并定容至100 mL,混匀,过滤膜。

A. 6. 4. 3 对照溶液的制备

移取试样溶液(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(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之间的分离度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(A.6.4.2)及对照溶液((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面积之和与对照溶液中5'-单磷酸尿苷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 , 数值以百分比(%)表示,按公式(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面积之和;

A_4 ——对照溶液主峰峰面积。

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 试剂与材料

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1000 mL。

A. 7. 2. 4 顶空进样瓶: 体积20 mL。

A. 7. 3 仪器与设备

A. 7. 3. 1 电子天平: 感量为0.001 g、0.0001g。

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（精确到0.001 g），用氢氧化钠溶液（A.7.2.3）溶解并定容至100 mL。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10 mg乙醇（精确到0.0001 g），用氢氧化钠溶液溶解并定容至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×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 ℃，保持20 min，以每分钟10 ℃速率升温至240 ℃，保持10 min。
- c) 检测器温度：250 ℃。
- d) 进样口温度：140 ℃。
- e) 载气：N₂；柱流量：2.5 mL/min。
- f) 顶空进样器条件：平衡温度80 ℃，平衡时间60 min；定量环温度85 ℃；传输线温度90 ℃。
- 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(A.7.4.2)注入气相色谱仪中，观察色谱图。

连续进样6次，乙醇峰面积响应值的相对标准偏差(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（A.7.4.1）和对照溶液（A.7.4.2）分别注入气相色谱仪中，记录色谱图，参考色谱图见图C.1。比较乙醇峰面积响应值，计算乙醇含量。

A.7.5 结果计算

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

$$w_4 = \frac{A_5 \times C_1 \times V \times 1000}{A_6 \times m_1 \times 1000} \dots\dots\dots (A.6)$$

式中：

A_5 ——试样溶液乙醇峰面积；

A_6 ——对照溶液乙醇峰面积；

C_1 ——对照溶液中乙醇的浓度，单位为毫克每千克（mg/kg）；

V ——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）；

1000——换算系数。

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

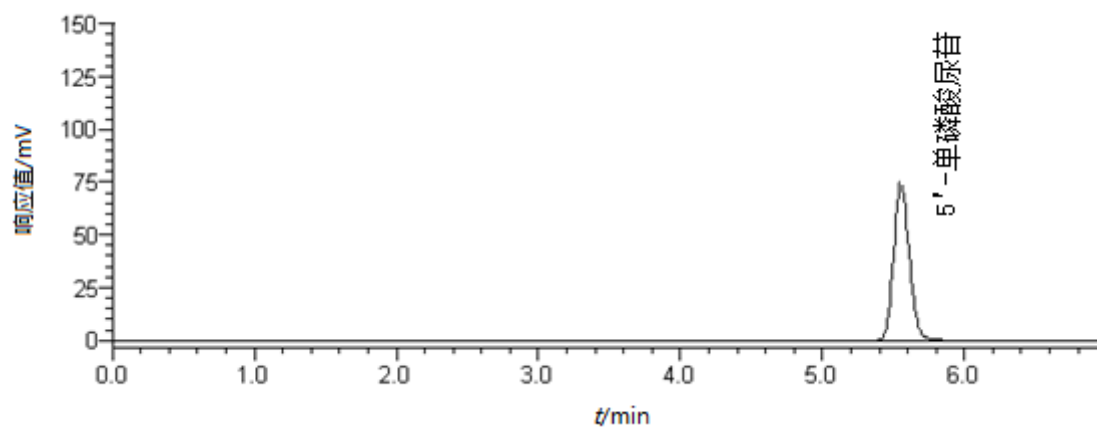
A.9 总砷(以As)计

称取试样1 g(精确到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。以下操作按GB 5009.11或GB 5009.76氢化物原子荧光光度法的规定。

附录 B

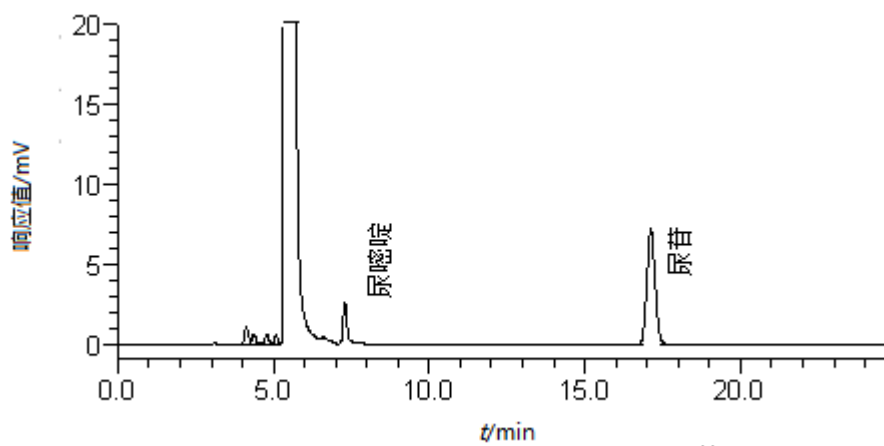
5'-单磷酸尿苷液相色谱图

5'-单磷酸尿苷标准品液相色谱图如图B.1所示。



图B.1 5'-单磷酸尿苷标准品液相色谱图

5'-单磷酸尿苷有关物质液相色谱图如图B.2所示。

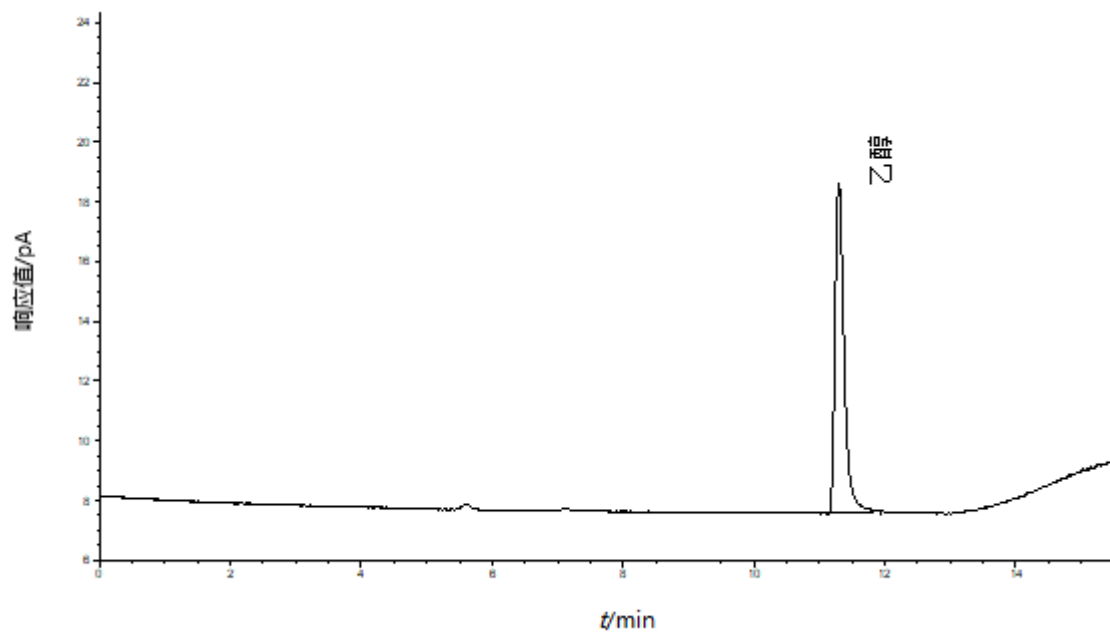


图B.2 5'-单磷酸尿苷试样有关物质液相色谱图

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