

ICS 67.120

X22

# 团 体 标 准

T/NAIA 0003—2020

## 肌肉中肌苷 肌苷酸的测定 高效液相色谱法

(征求意见稿)

2020-XX-XX 发布

2020-XX-XX 实施

宁夏化学分析测试协会 发布

## 前 言

本标准的编写格式符合 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分 标准的结构和编写》规定编写。

本标准由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本标准由宁夏大学、宁夏饲料工程技术研究中心、宁夏兽药饲料监察所、宁夏饲料工作站、宁夏农林科学院、宁夏昊标检测服务研究院、宁夏化学分析测试协会起草。

本标准主要起草人：辛国省、刘辉、卜姣姣、燕翀、杨仪、丁园、高巧仙、王建林、武晓宏、谢荣国、张小飞、张艳、王京。

本标准于 2020 年 XX 月 XX 日首次发布。

# 肌肉中肌苷 肌苷酸的测定

## 高效液相色谱法

### 1 范围

本标准规定了肌肉中肌苷 肌苷酸高效液相色谱法的测定。

本标准适用于肌肉中肌苷 肌苷酸的测定。

本方法检测限为：0.01g/kg。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有修改单位）适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 9695.19 肉与肉制品、取样方法

### 3 原理

肌肉组织中肌苷 肌苷酸经高氯酸溶液提取后，通过调节 pH 值至 6.5 呈弱酸性，试液过滤膜进高效液相色谱仪经 C18 色谱柱分离，在 254nm 波长下紫外检测器（或性能相当的检测器）检测。

### 4 试剂与材料

除另有说明外，所用试剂均为优级纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水

4.1 高氯酸。

4.2 5%高氯酸：取 5ml 高氯酸加入 95ml 水中。

4.3 磷酸。

4.4 三乙胺。

4.5 甲醇（色谱纯）。

4.6 肌苷标准品（CAS：58-63-9，纯度不低于 99.0%）。

4.7 肌苷标准储备液（0.8mg/mL）：称取肌苷标准品（4.6）20mg（准确至 0.1mg）于 25mL 容量瓶中，用水定容。置于 4℃冰箱保存，有效期 3 个月。

4.8 肌苷酸标准品（CAS：131-99-7，纯度不低于 99.0%）。

4.9 肌苷酸标准储备液（1mg/mL）：称取肌苷酸标准品（4.8）50mg（准确至 0.1mg）于 50mL 容量瓶中，用水定容。置于 4℃冰箱保存，有效期 3 个月。

### 5 仪器和设备

- 5.1 实验室用粉碎机或研钵。
- 5.2 分析天平：感量 0.0001 g。
- 5.3 均质机。
- 5.4 高效液相色谱仪：配紫外或二极管阵列检测器。
- 5.5 高速离心机。
- 5.6 超声波。
- 5.7 容量瓶：50mL、25mL。
- 5.8 移液管：玻璃移液管 0.5mL、1mL、2mL、5mL。
- 5.9 砂芯过滤装置。

## 6 试样制备与保存

取肌肉组织，加液氮研磨或粉碎后置于-80℃冰箱备用。

注：在采样和制备过程中，应避免试样污染，如长途运输应加液氮或冰袋保存。

## 7 测定步骤

### 7.1 试样提取

平行做两份试验。称取 2g（准确至 0.0001g），置于 50mL 塑料离心管中，用 20mL 5% 高氯酸溶液分 3 次匀浆，匀浆液在 4℃ 下以 4000r/min 离心 10min，上清液转入 50mL 烧杯中，沉淀物继续用 5% 的高氯酸 5mL 洗涤、离心，反复 2 次，合并上清液于 50mL 烧杯，用 KOH 溶液调 pH 至 6.5，用蒸馏水定容至 50mL，摇匀，经 0.45μm 滤膜过滤装入进样小瓶待测。随同试样进行空白试验。除不称取样品外，均按试样步骤进行。

### 7.2 色谱条件

色谱柱：C18，长 250mm，内径 4.6mm，粒径 5μm，或性能相当；

柱温：25℃；

进样量：20μl；

流动相：取 3.5mL 磷酸溶液加入 200mL 水和 7.2mL 三乙胺混匀，定容至 1L，用三乙胺调 pH6.5 后取 950mL 加 50mL 甲醇混匀，经 0.45μm 过滤，超声波脱气；

流速：1mL/min；

检测波长：254nm。

### 7.3 标准系列溶液

准确吸取标准储备液（4.7、4.9）0、0.1mL、0.2mL、0.5mL、1mL、2mL 肌苷 肌苷酸储备液分别置于 25mL 容量瓶中，用水定容。浓度分别为：肌苷：0、3.2μg/mL、6.4μg/mL、16μg/mL、

32ug/mL、64ug/mL。肌苷酸：0、4ug/mL、8ug/mL、20g/mL、40ug/mL、80ug/mL。现配现用。

#### 7.4 测定

按照 7.2 给出参考色谱条件，依次上机测定标准系列溶液和试样溶液。

#### 7.5 标准曲线绘制

试样溶液与标准溶液中肌苷、肌苷酸保留时间相对偏差在±2.5%之内。在线性范围内，以肌苷、肌苷酸浓度为横坐标，以其响应值（峰面积）为纵坐标；绘制标准曲线，标准曲线相关系数不低于 0.999。

### 8 分析结果的计算

按式(1)计算试样中的肌苷、肌苷酸含量，其数值用 mg/kg 表示。

$$w(\text{肌苷、肌苷酸}) = \frac{C \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：C—标准曲线下查的肌苷、肌苷酸浓度(ug/mL)；

V—试样定容体积(mL)；

m—试样量，单位(g)。

### 9 重复性

在重复条件下完成两个平行测定结果的相对偏差不大于 5%。

## 附录

(资料性附录)

## 肌苷、肌苷酸标准溶液高效液相色谱图

