

ICS 65.120

CCS B 46

团体标准

T/SDFA 038—2023

混合型饲料添加剂中 5'-肌苷酸二钠和5'-鸟苷酸二钠 的测定 高效液相色谱法

2023-05-18 发布

2023-06-01 实施

山东省饲料行业协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由山东省饲料行业协会提出并归口。

本文件起草单位：山东省畜产品质量安全中心、希杰(聊城)生物科技有限公司、山东新希望六和集团有限公司、青岛市华测检测技术有限公司。

本文件主要起草人：赵学峰、邵兵、张玮、孙春华、杨青、王竹青、李学原、刘雪芹、邹荣婕、牛艳艳。

混合型饲料添加剂中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了混合型饲料添加剂中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠测定的高效液相色谱法。

本文件适用于混合型饲料添加剂中含量不低于 0.6% 的 5'-肌苷酸二钠和含量不低于 0.9% 的 5'-鸟苷酸二钠的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 5009.3—2016 食品安全国家标准食品中水分的测定

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠用水溶解提取，经高效液相色谱分离，紫外检测器检测，采用外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 四丁基磷酸二氢铵(TBAP)。

5.3 乙腈：色谱纯。

5.4 磷酸：85%。

5.5 磷酸二氢铵。

5.6 磷酸溶液：1 mol/L。在 300 mL 水中加入 68.22 mL 磷酸（5.4），混匀后，加水定容至 1 000 mL。

5.7 溶液 A：称取 2.0 g 磷酸二氢铵（5.5）和 0.2 g 四丁基磷酸二氢铵(TBAP)（5.2）于 1 000 mL 容量瓶中，加水溶解定容至刻度。用磷酸溶液（5.6）调 pH 值至 2.4，现用现配。

5.8 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠标准储备溶液（1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：分别称取 5'-肌苷酸二钠（CAS：4691-65-0；纯度 $\geq 98\%$ ，以干基计，水分测定按 GB 5009.3—2016 卡尔·费休法的规定执行）和 5'-鸟苷酸二钠（CAS：5550-12-9；纯度 $\geq 98\%$ ，以干基计，水分测定按 GB 5009.3—2016 直接干燥法的规定执

行) 0.25 g (精确至 0.1mg), 置于 250 mL 容量瓶中, 加水溶解定容至刻度。于 2 °C~8 °C 贮存, 保存期限 3 个月。

5.9 标准系列工作溶液: 分别准确移取标准储备溶液 (5.8) 0 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL 和 2.5 mL 于 25 mL 容量瓶中, 用水定容。该标准系列工作溶液浓度为 0 µg/mL、20 µg/mL、40 µg/mL、60 µg/mL、80 µg/mL 和 100 µg/mL, 现配现用。

5.10 微孔滤膜: 0.45 µm, 有机相。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪: 配备紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平: 精度 0.1 mg。

7 样品

按 GB/T 20195 制备试样, 粉碎过 0.425 mm 分析筛, 充分混匀, 至少 200 g。密闭保存。

8 试验步骤

8.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取试样适量 (约相当于 5'-肌苷酸二钠或 5'-鸟苷酸二钠 30 mg, 精确至 0.1mg) 于 500 mL 容量瓶中, 用 100 mL 水溶解并超声提取 10 min, 定容至刻度, 摇匀, 静置。上清液过 0.45 µm 微孔滤膜, 滤液备用。

8.2 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C₁₈, 长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 µm。或性能相当者;
- b) 柱温: 40 °C;
- c) 检测波长: 254 nm;
- d) 流动相: 乙腈+溶液 A=3+97;
- e) 流速: 1.0 mL/min;
- f) 进样量: 10 µL。

8.3 测定

8.3.1 标准工作溶液和试样溶液测定

在仪器最佳工作条件下, 分别上机测定标准系列工作溶液 (5.9) 和试样溶液 (8.1), 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠标准溶液的液相色谱图见附录 A。

8.3.2 定性

以保留时间定性, 试样溶液中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠保留时间应与标准工作溶液中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的保留时间一致, 其相对偏差在 ±2.5% 之内。

8.3.3 定量

以 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于 0.99。试样溶液中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用水稀释后，重新测定；如浓度低于系列工作溶液浓度范围，则增加称样量，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠与标准溶液浓度差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中 5'-肌苷酸二钠或 5'-鸟苷酸二钠的含量 ω_i ，以质量分数表示，单位为百分含量（%）。多点校准按公式（1）计算，单点校准按公式（2）计算：

$$\omega_i = \frac{\rho_i \times V \times n}{m \times 1\,000 \times 1\,000} \times R_i \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

ρ_i ——标准曲线查得的试样溶液中 5'-肌苷酸二钠或 5'-鸟苷酸二钠的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样溶液最后定容体积，单位为毫升（mL）；

n ——试样的稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1 000——换算系数；

R_i ——5'-肌苷酸二钠或 5'-鸟苷酸二钠标准品纯度；

$$\omega_i = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V \times n}{A_{si} \times m \times 1\,000 \times 1\,000} \times R_i \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

式中：

A_i ——样品色谱图中 5'-肌苷酸二钠或 5'-鸟苷酸二钠的色谱峰面积；

ρ_{si} ——标准溶液中 5'-肌苷酸二钠或 5'-鸟苷酸二钠的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样溶液最后定容体积，单位为毫升（mL）；

n ——试样的稀释倍数；

A_{si} ——标准品色谱图中 5'-肌苷酸二钠或 5'-鸟苷酸二钠的色谱峰面积；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1 000——换算系数；

R_i ——5'-肌苷酸二钠或 5'-鸟苷酸二钠标准品纯度；

测定结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果表示到小数点后 2 位。

10 精密度

在重复性条件下，两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

附录 A

(资料性)

5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠标准溶液的高效液相色谱图

5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠标准溶液的高效液相色谱图见图 A.1。

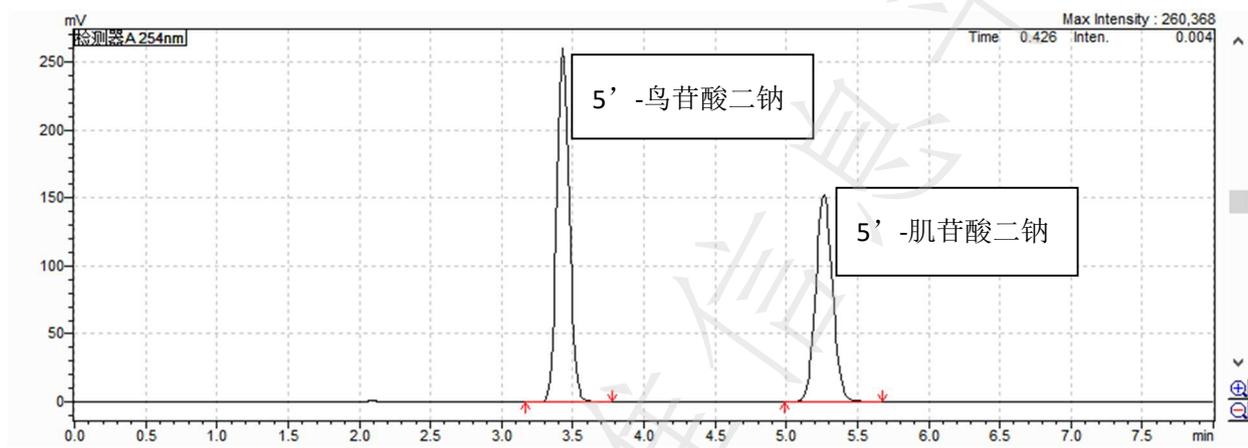


图 A.1 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠标准溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的液相色谱图