

团体标准

T/ NAIA×××-××××

枣中环磷酸腺苷的测定
高效液相色谱法

Determination of Cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate in Jujube
High performance liquid chromatography

2021-××-××发布

2021-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农产品质量标准与检测技术研究所、银川市（园林）技术推广站、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：赵子丹、张艳、杨春霞、牛艳、张琴、杨静、吴燕、王晓菁、李彩虹、葛谦、刘霞、王芳、开建荣、王晓静、王彩艳、张锋锋、陈翔、张小飞。

本文件为首次发布。

枣中环磷酸腺苷的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了枣中环磷酸腺苷的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于枣中环磷酸腺苷的测定。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

环磷酸腺苷 (cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate, 简称cAMP)是核苷酸衍生物，具有第二信使的作用，是有机体中广泛存在的一种具有生理活性的重要物质。

4 原理

试样用甲醇/磷酸二氢钾溶液超声提取，高速离心后，用高效液相色谱-紫外检测和确证，以保留时间定性，面积外标法定量。

5 试剂

除非另有规定外，所有试剂均为分析纯，水符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 甲醇 (CH₄O)：色谱纯。

5.2 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)：分析纯。

5.3 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液：准确称取 6.80g 磷酸二氢钾，用水溶解并定容至 1000mL 容量瓶中，混匀后过膜使用。

5.4 甲醇/0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液 (2:8=v:v)，取 20 mL 甲醇加入 80 mL 0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液中混匀。

5.5 甲醇/水溶液 (7:3=v:v)：取 30 mL 水加入 70mL 甲醇中混匀。

5.6 标准品：环磷酸腺苷 (cAMP)，CAS 号 60-92-4，纯度≥99%。

5.7 标准溶液配制：准确称取环磷酸腺苷标准品 10mg (精确至 0.01 mg)，用甲醇水溶液

(5.6) 溶解并定容至 10 mL 容量瓶中, 即为 1000 mg/L 的标准溶液, 于-18℃贮存。

6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪: 配紫外检测器 (UV)。

6.2 分析天平: 感量 0.01 g 和 0.00001 g。

6.3 组织捣碎机。

6.4 高速万能粉碎机: 10000 r/min。

6.5 超声波清洗器。

6.6 离心机: 4000 r/min。

6.7 涡旋混合器。

6.8 离心管: 50 mL, 塑料。

6.9 滤膜: 0.22 μm, 水相。

7 试样的制备及提取

7.1 试样的制备

鲜枣去核后, 经高速匀浆机处理, 置于样品盒中, -18℃冷冻备用。

干枣去核后, 经烘箱烘干, 用高速万能粉碎机粉碎, 置于样品袋中, -18℃冷冻备用。

7.2 试样的提取

干枣样品: 称取1 g (精确到0.001 g) 制备好的试样于50 mL离心管中, 加入20.00 mL提取液(5.5), 涡旋1 min后, 放置超声波中超声提取40 min (期间振摇2-3次), 取出后在4000r/min转速下离心10min, 取上清液, 过0.22 μm水相滤膜, 用高效液相色谱-紫外测定。

鲜枣样品: 称取5 g (精确到0.01 g) 制备好的试样于50 mL离心管中, 其余步骤同上。

8 液相色谱参考条件

8.1 色谱柱: C18 色谱柱, 250 mm×4.6 mm (i.d), 5.0 μm, 或性能相当者;

8.2 柱温: 35 °C;

8.3 流动相: 甲醇, 0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液;

8.4 流速: 0.8 mL/min;

8.5 进样量: 10μL;

8.6 波长: 254nm;

8.7 等度洗脱: 甲醇-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液=15:85。

9 标准曲线的绘制

将标准溶液分别配制成1.0 mg/L、5.0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L，依次由低到高进样检测，以质量浓度X(mg/L)为横坐标，响应值（峰面积）Y为纵坐标进行线性回归，得到环磷酸腺苷的标准曲线回归方程。

10 测定

待测液中环磷酸腺苷的响应值应在标准曲线范围内，超过线性范围则应稀释后再进样分析。同时做空白试验。

11 结果计算

样品中环磷酸腺苷的含量按公式（1）计算。

$$w = \frac{\rho_0 \times A \times V}{A_0 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

w ——待测液中环磷酸腺苷含量，单位为 mg/kg；

ρ_0 ——环磷酸腺苷标准溶液的质量浓度，单位为 mg/L；

A_0 ——环磷酸腺苷标准溶液的峰面积；

A ——样液的峰面积；

V ——提取体积，单位为 mL；

m ——试样质量，单位为 g；

测定结果取两次测定的算术平均值，计算结果保留两位有效数字。

12 色谱图

环磷酸腺苷标准溶液色谱图见附录A。

13 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值算术平均值的10%。

14 定量限

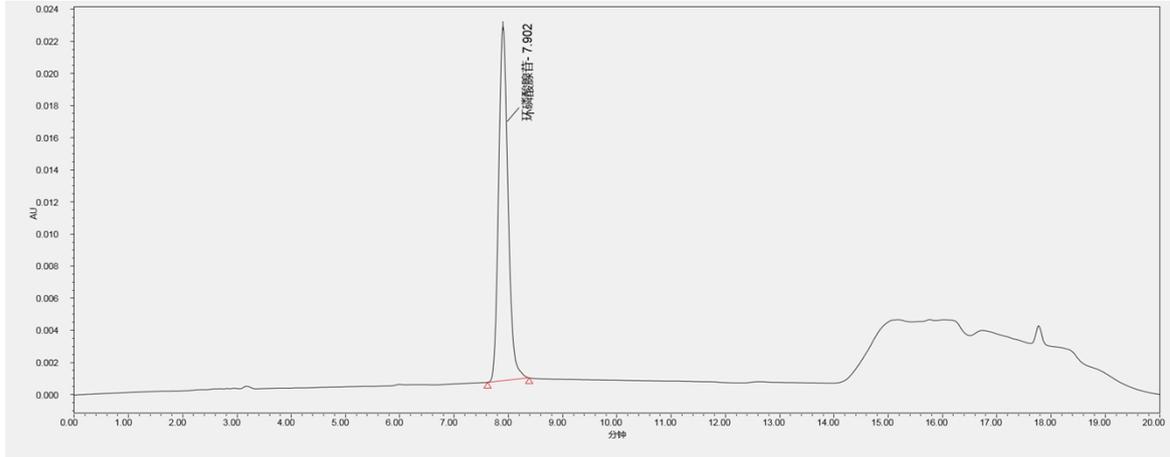
方法的定量限为0.10 mg/kg。

附录A

(资料性)

环磷酸腺苷标准溶液色谱图

环磷酸腺苷标准溶液色谱图



环磷酸腺苷标准溶液色谱图 (10mg/L)
