

T/CASME

中国中小商业企业协会团体标准

T/CASME XXX—2023

L-肌肽的测定 高效液相色谱法

Determination of L-creatine by high performance liquid chromatography

（征求意见稿）

2023 – XX – XX 发布

2023 – XX – XX 实施

中国中小商业企业协会 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 试剂和材料 1

6 仪器和设备 1

7 溶液配制 2

8 试验步骤 2

9 结果计算 3

10 精密度 4

11 检出限和定量限 4

附录 A（资料性） L-肌肽 5

附录 B（资料性） L-肌肽标准溶液高效液相色谱图 6

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。

本文件由苏州富士莱医药股份有限公司提出。

本文件由中国中小商业企业协会归口。

本文件起草单位：苏州富士莱医药股份有限公司……

本文件主要起草人：……

L-肌肽的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了L-肌肽的高效液相色谱测定方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、溶液配制、试验步骤、结果计算、精密度、检出限和定量限。

本文件适用于化妆品等中L-肌肽含量的测定。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的L-肌肽经纯水超声提取，离心过滤后，与衍生试剂2,4-二硝基氟苯发生反应，采用高效液相色谱（紫外检测器）测定，根据保留时间定性，外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 水：除非另有说明，水均为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 乙腈：色谱纯。

5.3 三水乙酸钠：分析纯；

5.4 2,4-二硝基氟苯：纯度 $\geq 99.0\%$ ；

5.5 硼酸：分析纯。

5.6 硼砂：分析纯。

5.7 L-肌肽：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。L-肌肽的英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量和结构式见附录A。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

6.2 分析天平：感量为0.01 g、0.001 g、0.000 1 g。

6.3 旋涡振荡器。

6.4 超声振荡器：工作频率 53 kHz。

6.5 离心机：转速不小于4 000 r/min。

6.6 氮吹仪。

6.7 恒温水浴锅：控温精度 ± 1 °C。

6.8 微量移液器：0.5 μL ~10 μL 。

6.9 微孔滤膜：0.22 μm 、0.45 μm 。

7 溶液配制

7.1 乙酸钠溶液（0.075 mol/L）

称取6.152 2 g三水乙酸钠，加水定容至1 000 mL，溶解，经0.45 μm 微孔滤膜过滤。

7.2 硼酸溶液（0.2 mol/L）

称取12.366 g硼酸于烧杯中，加水溶解后定容至1 000 mL，摇匀。

7.3 硼砂溶液（0.05 mol/L）

称取19.068 g硼砂于烧杯中，加水溶解后定容至1 000 mL，摇匀。

7.4 硼酸-硼砂缓冲液

将硼酸溶液和硼砂溶液按体积比1：4混合配制而成。

7.5 L-肌肽标准储备液（1.0 mg/mL）

称取根据纯度折算相当于10 mg（精确至0.1 mg）L-肌肽标准品，加水溶解定容至10 mL， -18 °C保存，备用。

7.6 L-肌肽标准工作溶液（0.01 mg/mL）

吸取L-肌肽标准储备液1.0 mL，加水定容至100 mL，现用现配。

7.7 L-肌肽标准溶液（1 $\mu\text{g/mL}$ ）

移取L-肌肽标准工作溶液1.0 mL至10 mL容量瓶中，加入5 mL硼酸-硼砂缓冲液和2 μL 2,4-二硝基氟苯，于 80 °C ± 1 °C水浴加热10 min，冷却至室温后用硼酸-硼砂缓冲液定容，0.22 μm 微孔滤膜过滤即得。

8 试验步骤

8.1 试样处理

8.1.1 提取

8.1.1.1 粉类试样

称取试样约0.1 g（精确至0.001 g）于15 mL具塞塑料离心管中，加水至5 mL，漩涡振荡2 min，超声提取15 min，离心机4 000 r/min离心5 min，取1.0 mL上清液经0.45 μm 微孔滤膜过滤，滤液待用。

8.1.1.2 其他试样

称取试样约0.1 g~0.2 g (精确至0.001 g) 于15 mL具塞塑料离心管中,加水35 mL,漩涡振荡2 min,超声提取15 min,离心机4 000 r/min离心5 min,取1.0 mL上清液40 °C氮吹至干,用1.0 mL水复溶,漩涡混匀,经0.45 μm微孔滤膜过滤,滤液待用。

8.1.2 试液制备

取8.1.1滤液1 mL于10 mL具塞刻度试管中,依次加入硼酸-硼砂缓冲缓冲液8.0 mL、2,4-二硝基氟苯3.0 μL,混匀后放入水浴锅中80 °C水浴40 min,冷却至室温后,用硼酸-硼砂缓冲缓冲液定容至10 mL,0.22 μm微孔滤膜过滤,为待测样液。

8.2 测定条件

高效液相色谱测定参考条件如下:

- 色谱柱: C₁₈ 柱, 4.6 mm (内径) × 250 mm, 5 μm 或相当者;
- 柱温: 45 °C;
- 流动相: 0.075 mol/L 乙酸钠: 乙腈 (87: 13, 体积比);
- 流速: 1.0 mL/min;
- 检测波长: 360 nm;
- 进样量: 10 μL。

8.3 标准工作曲线绘制

按8.2色谱条件检测,吸取10 μL L-肌肽标准溶液注入高效液相色谱仪,以色谱峰的峰面积为纵坐标,对应的溶液浓度为横坐标,绘制标准工作曲线。L-肌肽标准溶液的高效液相色谱图参见附录B。

8.4 试样测定

按8.2色谱条件检测,取8.1待测样液注入高效液相色谱仪,以保留时间定性,测得待测样液的色谱峰面积,根据标准工作曲线得到待测样液中L-肌肽的含量。待测样液中L-肌肽的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应稀释后测定。

8.5 平行试验

按8.4步骤,对同一待测样液进行平行测定。

8.6 空白试验

除不称取试样外,按8.1~8.4步骤测定。

9 结果计算

按式(1)计算试样中L-肌肽的含量。计算结果应扣除空白值,保留3位有效数字。

$$X = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试样中L-肌肽的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ ——从标准曲线查得L-肌肽的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);

V ——试样稀释后的总体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

10 精密度

10.1 在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不用超过算术平均值的 10%。

10.2 在再现性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不用超过算术平均值的 15%。

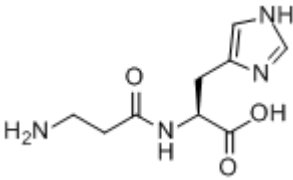
11 检出限和定量限

本方法检出限为0.0602 $\mu\text{g/mL}$ ，定量限为0.2008 $\mu\text{g/mL}$ 。

附 录 A
(资料性)
L-肌肽

L-肌肽的英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量和结构式见表A. 1。

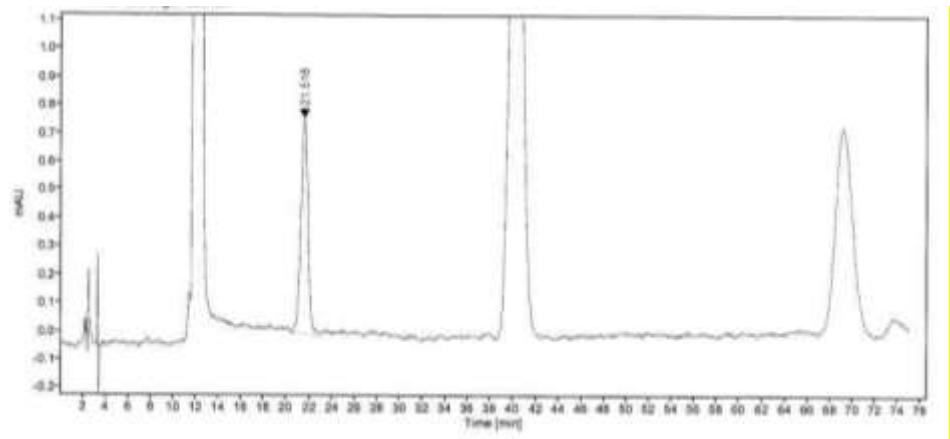
表A. 1 L-肌肽的英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量和结构式

中文名称	L-肌肽
英文名称	L-Carnosine
CAS号	305-84-0
分子式	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃
相对分子质量	226. 23
结构式	

附录 B
(资料性)

L-肌肽标准溶液高效液相色谱图

L-肌肽标准溶液高效液相色谱图见图B. 1。



图B. 1 L-肌肽标准溶液高效液相色谱图