

葡寡糖含量的检测 液相色谱法

Determination method for glucon oligosaccharides—Liquid chromatography method

地方标准信息服务平台

2019 - 02 - 28 发布

2019 - 03 - 28 实施

前 言

本标准是依据 GB/T 1.1—2009《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写》给出的规则起草的。

本标准由大连市质量技术监督局提出。

本标准由中国科学院沈阳分院归口。

本标准起草单位：中国科学院大连化学物理研究所。

本标准主要起草人：陈玮、尹恒。

地方标准信息服务平台

葡寡糖含量的检测—液相色谱法

1 范围

本标准规定了葡寡糖含量检测的术语和定义、原理、仪器设备、操作步骤、结果表示和重复性。

本标准适用于以酵母细胞壁、真菌、褐藻、地衣、谷物以及其热凝胶等聚糖为原料，经加工制成的葡寡糖产品中 β -1, 3-葡寡糖（聚合度2-6）含量的测定。

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。

3.1

葡寡糖

葡聚糖在酸水解或生物酶水解条件下降解为聚合度为2~6的线性低聚糖。

3.2

葡寡糖含量

葡寡糖产品中 β -1, 3-葡寡糖（聚合度2-6）的质量百分比。

4 原理

葡寡糖经过色谱柱分离后可得到多个单一聚合度的寡糖组分，分离后的葡寡糖组分进入检测器进行检测，在一定浓度范围内，检测信号的强度与葡寡糖浓度呈线性关系。通过外标法测定并计算得到葡寡糖产品中不同聚合度葡寡糖组分的浓度和质量。不同聚合度葡寡糖的质量总和与其产品总质量比值的百分比结果，即为葡寡糖的含量。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪：配有脉冲式安培检测器（PAD, pulsed amperometric detector）。

5.2 分析天平：感应量为 0.0001 g。

5.3 滤膜：聚四氟乙烯膜，0.2 μm 。

6 试剂和材料

- 6.1 水：符合 GB/T 6682 规定的一级水的规定，即电导率（25℃）/（mS/m） \leq 0.01；
- 6.2 氢氧化钠溶液（ $\omega(\text{NaOH})=50\%$ ）：色谱纯。
- 6.3 三水乙酸钠：色谱纯。
- 6.4 100 mmol/L 氢氧化钠溶液：量取 5.23 mL 氢氧化钠溶液（6.2），用水定容至 1000 mL。
- 6.5 800 mmol/L 三水乙酸钠/100 mmol/L 氢氧化钠溶液：称取 108.86 g 三水乙酸钠，用水（6.1）溶解后加入 5.23 mL 氢氧化钠溶液（6.2），再用水（6.1）定容至 1000 mL。
- 6.6 葡寡糖标准品：昆布二糖，纯度 \geq 95%；昆布三糖，纯度 \geq 95%；昆布四糖，纯度 \geq 95%；昆布五糖，纯度 \geq 90%；昆布六糖，纯度 \geq 90%；结构式参见附录 A。

7 测定步骤

7.1 标样溶液的配制

- 7.1.1 标样溶液 A：分别称取 10.00 mg 经 105℃ 干燥至恒重的 5 种葡寡糖标准品（6.6）于 50 mL 烧杯中，加入 20 mL 水（6.1），振荡使其充分溶解，转移至 100 mL 容量瓶中，用水（6.1）定容至刻度，葡寡糖浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 7.1.2 标样溶液 B：吸取 10.00 mL 标准溶液 A 转移至 100 mL 容量瓶中，用水（6.1）定容至刻度，葡寡糖浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 7.1.3 标样溶液 C：吸取 10.00 mL 标准溶液 B 转移至 100 mL 容量瓶中，用水（6.1）定容至刻度，葡寡糖浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

7.2 样品溶液的制备

当样品是颗粒状态时，应先将其在研钵中研细成粉末。

将粉末状样品在 105℃ 干燥至恒重。称取 25.0 mg 样品于 50 mL 烧杯中，加入 20 mL 水（6.1），振荡使其充分溶解，转移至 100 mL 容量瓶中，用水（6.1）定容至刻度，摇匀。用液相色谱仪测定前，样品溶液用 0.2 μm 滤膜过滤。

7.3 检测条件

需满足如下色谱条件：

- a) 流动相 A：100 mmol/L 氢氧化钠溶液（6.4）；
- b) 流动相 B：800 mmol/L 三水乙酸钠/100 mmol/L 氢氧化钠溶液（6.5）；
- c) 色谱柱：离子交换色谱柱，粒径 5 μm ，柱长 250 mm，内径 4.6 mm；
- d) 柱温：30℃；
- e) 流速：1.0 mL/min；
- f) 进样体积：10 μL 。
- g) 洗脱方式：梯度洗脱：
 - 0-1 min：0% 流动相 B；
 - 1-30 min：0% -37.5% 流动相 B；
 - 30-35 min：37.5% -62.5% 流动相 B；
 - 35-40 min：62.5% -0% 流动相 B。

7.4 分析步骤

7.4.1 标准曲线绘制

在上述操作条件下，待仪器基线稳定后，将标样溶液A（7.1.1）、标样溶液B（7.1.2）、标样溶液C（7.1.3）进样10 μL。标准溶液的典型色谱图参见附录B。

根据已知标样含量与检测器响应值建立线性方程：

$$Y = aX \pm b \dots\dots\dots (1)$$

式中：

a 、 b —已知系数；

X —溶液中葡寡糖的浓度值（μg/mL）；

Y —溶液中葡寡糖的色谱峰面积。

7.4.2 样品测定

在上述操作条件下，待仪器基线稳定后，将样品溶液（7.2）连续进样3次，进样体积10 μL，得到样品中不同聚合度葡寡糖峰面积 Y_i 。

8 结果的计算

8.1 葡寡糖的浓度计算

将样品检测响应值代入公式（1），计算得到不同聚合度葡寡糖浓度 X_i 。

8.2 葡寡糖的含量计算

$$W_i = \frac{X_i \times 100 \times V_s}{m \times 1000} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X_i —样品溶液中葡寡糖的浓度值（μg/mL）；

m —样品的质量，单位为毫克（mg）；

V_s —样品稀释倍数；

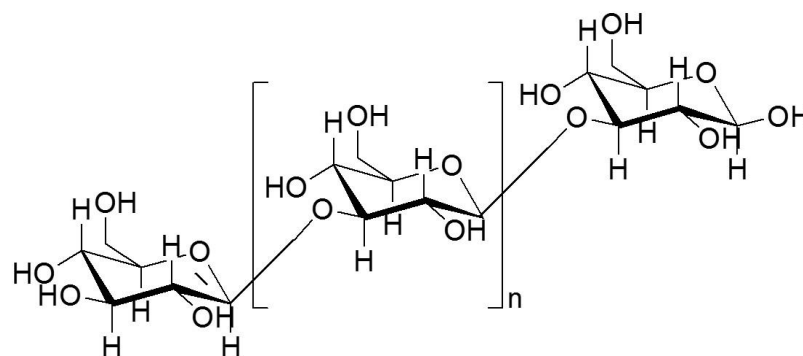
W_i —样品中葡寡糖的含量，%；

9 重复性

在同一实验室由同一操作人员完成的三个平行测定结果，相对标准偏差不大于5%；以三次平行测定结果的算术平均值为测定结果。

附录 A

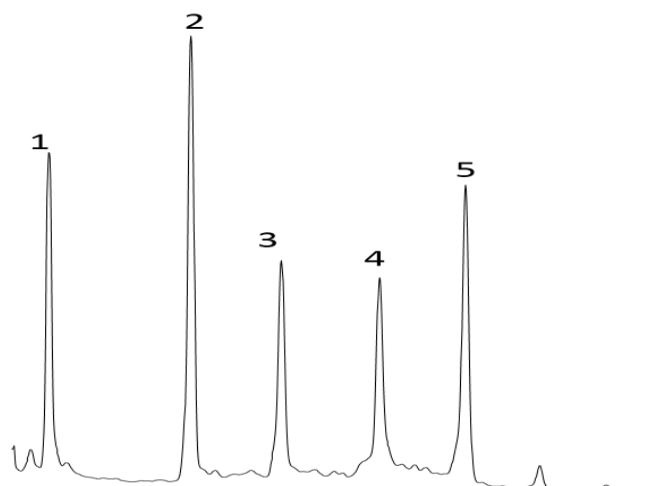
(资料性附录)

 β -1,3-葡寡糖的化学结构式

图A.1 葡寡糖的化学结构式 (n=1,2,3,4)

地方标准信息服务平台

附录 B
(资料性附录)
标准溶液的典型液相色谱图



图B.1 标准溶液的典型液相色谱图

(1-昆布二糖, 2-昆布三糖, 3-昆布四糖, 4-昆布五糖, 5-昆布六糖)

地方标准信息服务平台