

团 体 标 准

T/CFIAS 6006—2024

酿酒酵母培养物中甘露聚糖和 β -葡聚糖 含量的测定 高效液相色谱法

Determination of mannan and β -glucan in *saccharomyces cerevisiae* culture
—High performance liquid chromatography

2024-02-07 发布

2024-03-05 实施

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。

本文件由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：北京英惠尔生物技术有限公司、北京市兽药饲料监测中心、河南海瑞正检测技术有限公司、北京三元种业科技股份有限公司饲料分公司。

本文件主要起草人：张亚军、李贤、黄吉波、梁廷银、任泽林、王宏、姚婷、曹林、候林丛、邓露芳、刘晓玥。

酿酒酵母培养物中甘露聚糖和 β -葡聚糖含量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了酿酒酵母培养物中甘露聚糖和 β -葡聚糖含量测定的高效液相色谱法。
本文件适用于酿酒酵母培养物中甘露聚糖和 β -葡聚糖含量的测定。
本文件中甘露聚糖和 β -葡聚糖检出限为30 mg/kg，定量限为100 mg/kg。

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/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

试样中的甘露聚糖和 β -葡聚糖经水解，生成单糖甘露糖和葡萄糖，对两种单糖衍生后，使用三氯甲烷去除衍生试剂，上高效液相色谱仪测定，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 盐酸。
- 5.3 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）。
- 5.4 三氯甲烷。
- 5.5 乙腈：色谱纯。
- 5.6 氢氧化钠溶液（400 g/L）：称取 40 g 氢氧化钠，用水溶解，待冷却至室温后，用水稀释至 100 mL。
- 5.7 PMP 甲醇溶液（0.5 mol/L）：称取 0.871 g PMP，加入 10 mL 甲醇溶解，混匀。临用现配。
- 5.8 氢氧化钠溶液（0.3 mol/L）：称取 1.2 g 氢氧化钠，加水溶解并稀释至 100 mL，混匀。
- 5.9 盐酸溶液（0.3 mol/L）：移取 2.5 mL 盐酸（5.2），加水溶解并稀释至 100 mL，混匀。
- 5.10 盐酸溶液（1+3）：移取 25 mL 盐酸（5.2），加 75 mL 水，混匀。
- 5.11 乙酸铵溶液（0.1 mol/L，pH=5.5）：称取 7.708 g 乙酸铵，加水溶解并稀释至 1 000 mL，用盐酸溶液（5.10）调节 pH=5.5，混匀。

5.12 混合标准储备溶液（1 mg/mL）：称取甘露糖标准品（CAS 号：3458-28-4，纯度 \geq 99%）和葡萄糖标准品（CAS 号：50-99-7，纯度 \geq 98%）各 0.1 g（精确至 0.000 1 g），置于同一个 100 mL 容量瓶中，用水溶解并定容，混匀。2 °C~8 °C 保存，有效期 6 个月。

5.13 混合标准系列溶液：准确移取适量混合标准储备溶液（5.12）于容量瓶中，用水稀释定容，混匀，配制成待测物质量浓度分别为 1 μ g/mL、10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、300 μ g/mL 和 500 μ g/mL 的标准曲线系列溶液。临用现配。

5.14 微孔滤膜：0.45 μ m，有机系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平：感量 0.000 1g。

6.3 立式电热压力蒸汽灭菌锅。

6.4 pH 计：精度 \pm 0.01。

6.5 涡旋混合器。

6.6 水浴锅：70 °C。

7 试样制备

按照 GB/T 20195 规定制备试样，不少于 200 g，粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器，备用。

8 试验步骤

8.1 试样溶液的制备

平行做两份试验。准确称取 0.5 g~1.0 g 试样（精确至 0.000 1 mg），于 250 mL 锥形瓶中，加入 6.0 mL 盐酸（5.2），混匀，再加入 50 mL 水混匀，将锥形瓶放入蒸汽灭菌锅，121 °C 下水解 60 min。取出后冷却，用氢氧化钠溶液（5.6）将溶液调为中性（pH \approx 7），然后用水定容至 100 mL。取适量用中速定性滤纸过滤，此为待测溶液。如果待测溶液浓度较高时，进行适当稀释。

8.2 衍生

取不同浓度的标准工作溶液和待测溶液各 400 μ L，依次加入 PMP 甲醇溶液（5.7）、氢氧化钠溶液（5.8）各 400 μ L，置于 10 mL 离心管中，充分混匀后于 70 °C 水浴衍生化反应 60 min，冷却至室温，加入盐酸溶液（5.9）500 μ L，混匀，加入 4 mL 三氯甲烷涡旋混匀，三氯甲烷在下层，用一次性滴管将上层溶液全部转移到另外一个 10 mL 离心管中，再加 4 mL 三氯甲烷，涡旋混匀，重复此步骤，用三氯甲烷共洗涤 4 次。将洗涤 4 次后的上层溶液，取上清液用 0.45 μ m 孔径的滤膜（5.14）过滤，待测。衍生样品必须 24 h 内上机检测完成。

8.3 测定

8.3.1 色谱条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱： C_{18} 柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μ m，或性能相当者；

b) 流动相：0.1 mol/L 乙酸铵溶液（pH=5.5）：乙腈=75:25；

c) 流速：1.0 mL/min；

- d) 柱温: 35 ℃;
 e) 检测器: 紫外(或二极管阵列检测器), 检测波长250 nm;
 f) 进样量: 10 μL。

8.3.2 混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下, 分别取衍生后的混合标准系列溶液(5.13)和试样溶液(8.2)上机测定。混合标准系列溶液中甘露糖PMP衍生物和葡萄糖PMP衍生物的高效液相色谱图参见附录A。

8.3.3 定性

在仪器的最佳条件下, 试样溶液中待测物的保留时间应与混和标准系列溶液(质量浓度相当)中对应糖的保留时间一致, 其相对偏差在±2.5%之内。

8.3.4 定量

在相同试验条件下, 以甘露糖和葡萄糖混合标准系列溶液中待测物的质量浓度为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 其相关系数应不低于0.99。试样溶液中待测物的质量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衍生, 重新测定。单点校准定量时, 试样溶液中待测物的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中甘露聚糖和β-葡聚糖的含量(X_i)以质量分数计, 数值以质量百分数(%)表示。多点校准按式(1)计算, 单点校准按式(2)计算:

$$X_i = \frac{C_i \times V}{m_1} \times 0.9 \times 10^{-4} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- V ——试样溶液定容体积, 单位为毫升(mL);
 m_1 ——试样质量, 单位为克(g);
 C_i ——标准曲线上查得的试样浓度, 单位为微克每毫升(μg/mL);
 0.9 ——将甘露糖或葡萄糖换算成甘露聚糖或β-葡聚糖的系数。

$$X_i = \frac{A_2 \times C \times V}{A_1 \times m_1} \times 0.9 \times 10^{-4} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A_1 ——标准工作液峰面积;
 A_2 ——试样溶液峰面积;
 V ——试样溶液定容体积, 单位为毫升(mL);
 m_1 ——称取试样的质量, 单位为克(g);
 C ——标准工作液的浓度, 单位为微克每毫升(μg/mL);
 0.9 ——将甘露糖或葡萄糖换算成甘露聚糖或β-葡聚糖的系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示, 保留3位有效数字。

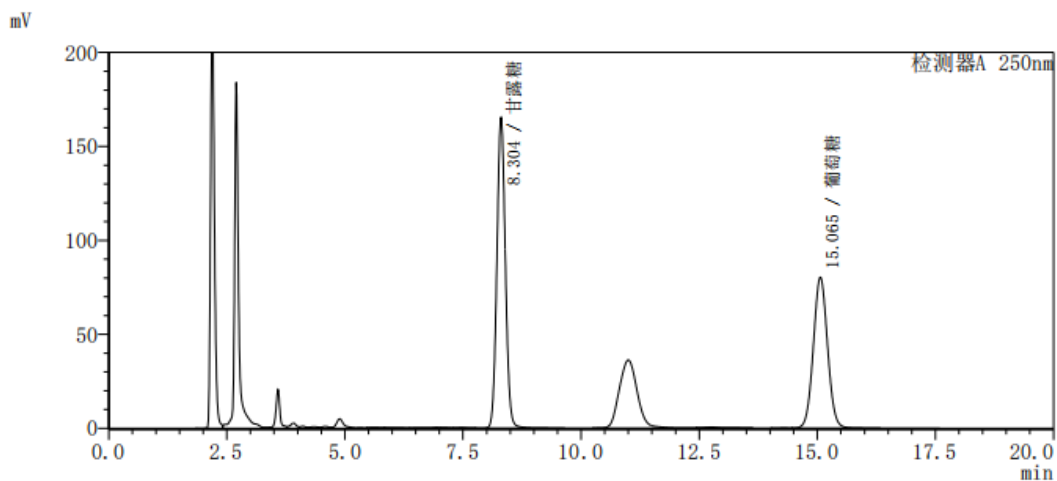
10 精密度

在重复性条件下, 两次独立测定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)

混合标准系列溶液中甘露糖 PMP 衍生物和葡萄糖 PMP 衍生物的高效液相色谱图

混合标准系列溶液中甘露糖 PMP 衍生物和葡萄糖 PMP 衍生物的高效液相色谱图见图 A. 1。



图A. 1 甘露糖 PMP 衍生物和葡萄糖 PMP 衍生物 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的高效液相色谱图

