

团体标准

T/GDFDTAEC 01—2021

保健食品中低聚木糖的测定方法—高效液相色谱法

Determination of total triterpenoids in health food - High Performance Liquid

Chromatography

(送审稿)

2021 - XX - XX 发布

2021 - XX - XX 实施

广东省食品药品评审认证技术协会 发布

前 言

本标准按照 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。

本标准由广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、无限极(中国)有限公司提出。
本标准由广东省食品药品评审认证技术协会归口。

本标准起草单位：广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、无限极(中国)有限公司、汤臣倍健股份有限公司、华测检测认证集团股份有限公司、广州汇标检测技术中心、清远市林中宝生物科技有限公司。

本标准主要起草人：XXX、XXX、XXX

本标准首次发布。

保健食品中低聚木糖的测定-高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了保健食品中低聚木糖的测定方法。

本标准适用于保健食品片剂、固体饮料、口服液中低聚木糖含量的测定。

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

低聚木糖又称木寡糖，是由 2-7 个木糖分子以 β -1,4 糖苷键结合而成的功能性聚合糖。

4 原理

试样中的低聚木糖经酸高温水解后，样液经 PMP 衍生，三氯甲烷净化后，以 C_{18} 反相色谱柱分离，液相色谱-紫外检测器测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 乙腈：色谱纯。

5.2 甲醇。

5.3 浓硫酸。

5.4 氢氧化钠。

5.5 衍生剂：1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP) (CAS: 89-25-8)。

5.6 三氯甲烷。

5.7 浓盐酸。

5.8 无水乙醇。

5.9 氢氧化钠溶液 (5%)：称取 5g 氢氧化钠，用水溶解，定容至 100 mL，摇匀。

5.10 氢氧化钠溶液 (0.3 mol/L)：称取 1.2g 氢氧化钠，用水溶解，定容至 100 mL，摇匀。

5.11 硫酸溶液 (4mol/L)：量取 7mL 水于 10mL 比色管中，加入 2.00mL 浓硫酸。

5.12 PMP 甲醇溶液 (0.5 mol/L)：称取 0.44gPMP，加入 5 mL 甲醇溶解。

5.13 盐酸溶液 (0.3 mol/L)：移取浓盐酸 1.25mL 于 50mL 容量瓶中，加水定容至刻度，摇匀。

5.14 乙酸铵溶液 (0.02 mol/L)：称取 1.54g 乙酸铵，加入适量的水溶解，用水定容至 1000mL，经 0.22 μ m 水相微孔滤膜过滤后备用。

5.15 D-木糖：CAS: 58-86-6，纯度 \geq 98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.16 标准储备溶液 (5.00mg/mL)：准确称取 D-木糖 50mg(准确至 0.01mg)，用水溶解并定容至 10mL，摇匀。

5.17 标准工作溶液：准确吸取 5.00mg/mL 木糖标准储备溶液 5.00 mL 于 25 mL 容量瓶，用水定容至刻度，

溶液浓度为 1.00mg/mL，取适量稀释成 0.00、0.010、0.020、0.100、0.200、0.500 mg/mL 标准工作溶液。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪：带紫外检测器。
- 6.2 电子分析天平：精度为 0.00001g。
- 6.3 超声提取仪。
- 6.4 离心机。
- 6.5 恒温水浴锅。
- 6.6 旋涡混合器。

7 分析步骤

7.1 样品水解

7.1.1 水解前样品溶液的制备 M_1 ：精密称取 0.5-2g（木糖含量在 10-250mg 之间，液体样品需摇匀后再取样测试）于 50mL 离心管中，加水至 25mL，超声提取 20min，加入无水乙醇至刻度，摇匀后，继续超声 10min，4000r/min 离心 5min，准确移取上清液 25.0mL 于烧杯中沸水浴蒸干，残渣准确加入 25.0mL 水溶解，该溶液为水解前样品溶液 M_1 ；另取 1mL 水解前样液过 0.45 μ m 水相滤膜，滤液供衍生化反应使用。

（备注：如在测定低聚木糖过程中，遇到样品超声提取后成为糊状样液、离心不能沉淀的情况，可直接用无水乙醇进行溶解样品，超声提取完毕后，静置过夜，离心，其余步骤不变。）

7.1.2 水解后样品溶液制备 M_2 ：准确移取水解前样液 M_1 10.00mL 于 50mL 水解管中，加入 1.8mL 硫酸溶液（4mol/L）盖紧盖子，于 100 °C 恒温水浴锅中水解 2 h，后冷却至室温，用 5%NaOH 溶液中和水解液至 pH 值 6-7，转入 100mL 容量瓶中，加水定容至刻度，摇匀，即为水解后样品溶液 M_2 ，取 1mL 水解后样液过 0.45 μ m 水相滤膜，滤液供衍生化反应使用。

7.2 衍生化反应

7.2.1 分别取混合标准工作溶液（0.00、0.010、0.020、0.100、0.200、0.500、1.00 mg/mL 标准溶液）、水解前、水解后样品溶液 M_1 、 M_2 各 400 μ L 置于具塞 10 mL 离心管中，向上述离心管中分别加入 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液以及 0.3 mol/L NaOH 溶液各 400 μ L，充分混匀后，于 70 °C 水浴衍生化反应 100 min，放冷，加入 0.3 mol/L HCl 溶液 500 μ L，混匀，加入约 2 mL 三氯甲烷涡旋振荡 30s，静置分层后，弃去下层三氯甲烷溶液，重复以上步骤 2 次，剩余溶液过 0.45 μ m 有机滤膜，滤液供液相色谱仪测定使用。

7.3 测定条件

参考色谱条件如下：

- 7.3.1 C_{18} 色谱柱：4.6 mm×250 mm，粒径 5 μ m 或等效
- 7.3.2 流动相：0.02 mol/L 乙酸铵-乙腈（76:24）；
- 7.3.3 流速：1.0mL/min；
- 7.3.4 柱温：30 °C；
- 7.3.5 检测波长：250 nm；
- 7.3.6 进样量：2 μ L

7.4 测定

将衍生化后的混合标准工作溶液和试液分别进样，以标准系列溶液峰面积为纵坐标、浓度为横坐标绘制标准曲线，以保留时间定性，峰面积外标法定量。根据工作曲线得到试样溶液中木糖的浓度。

8 结果计算

8.1 水解前样品中木糖含量，按下式计算：

$$X_1 = \frac{C_1 \times V}{m \times 10}$$

式中：

X_1 —水解前样品中木糖的含量（g/100g）；

C_1 —由工作曲线得出的水解前样品中木糖的浓度，（mg/mL）；

V —定容体积，（50mL）；

m —试样质量，单位为克（g）；

8.2 水解后样品中木糖含量，按下式计算：

$$X_2 = \frac{C_2 \times V \times N}{m \times 10}$$

式中：

X_2 —水解后样品中单糖的含量（g/100g）；

C_2 —由工作曲线得出的水解后样品中木糖的浓度，（mg/mL）；

V —定容体积，（50mL）；

m —试样质量，单位为克（g）；

N —样品水解过程中的系数倍数，该方法为 10；

8.3 试样中各种低聚木糖（以木二糖计）含量，按下式计算：

$$X = (X_2 - X_1) \times F$$

X —样品中低聚木糖的含量（以木二糖计）（g/100g）；

X_2 —水解后样品中单糖的含量（g/100g）；

X_1 —水解前样品中单糖的含量（g/100g）；

F —木糖与低聚木糖的转换系数，其中木糖转换为低聚木糖（以木二糖计）的系数为 0.940（木糖分子量为：150.13，木二糖分子量为 282.24）

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

10 检出限

本方法中，当取样量为 1g，定容体积为 50mL，稀释倍数为 10 时，低聚木糖检出限为 0.05g/100g。