

团 体 标 准

T/GFDTAEC 02-2022

保健食品中低聚木糖的测定 —高效液相色谱法

Determination of Xylo-oligosaccharides in health food – High Performance
Liquid Chromatography

2022 – 07 – 06 发布

2022 – 07 – 06 实施

广东省食品药品审评认证技术协会 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。

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。

本文件由广东省食品药品评审认证技术协会归口。

本文件起草单位：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。

本文件主要起草人：张志舟、张方圆、窦文渊、孙红梅、郑海岚、冯齐、黄绮敏、江志鹏、魏鲜娥、黎小兰、孙宇、周璇、杨群华、温恒、廖明凯、唐静、张飞、蓝燕玲。

本文件为首次发布。

保健食品中低聚木糖的测定-高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了保健食品中低聚木糖含量的测定方法。

本文件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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的低聚木糖经高温酸水解后，样液经 PMP 衍生，三氯甲烷净化后，以 C₁₈ 反相色谱柱分离，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

除非另有规定，本文件所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈：色谱纯。

5.1.2 甲醇。

5.1.3 浓硫酸。

5.1.4 氢氧化钠。

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

5.1.6 三氯甲烷。

5.1.7 浓盐酸。

5.1.8 无水乙醇。

5.2 溶液配制

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

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

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

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

5.2.5 盐酸溶液（0.3 mol/L）：移取浓盐酸 1.35 mL 于 50 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，摇匀。

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

5.3 标准品

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

5.4 标准溶液配制

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

5.4.2 标准工作溶液：准确吸取 5.00 mg/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 1.00 mg/mL，取适量稀释成 0.00 mg/mL、0.010 mg/mL、0.020 mg/mL、0.100 mg/mL、0.200 mg/mL、0.500 mg/mL 浓度的标准工作溶液。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

6.2 电子分析天平：感量为 0.00001 g。

6.3 超声波提取仪：功率≥800 W。

6.4 离心机：转速≥4000 r/min。

6.5 恒温水浴锅。

6.6 旋涡混合器。

7 试验步骤

7.1 样品水解

7.1.1 水解前样品溶液的制备 M₁：精密称取 0.5-2 g（木糖含量在 10-250 mg 之间，固体样品取有代表性的样品 20 g 粉碎均匀后取样测试，液体样品需摇匀后再取样测试）于 50 mL 离心管中，加水至 25 mL，超声提取 20 min，加入无水乙醇至刻度，摇匀后，继续超声 10 min，4000 r/min 离心 5min，准确移取上清液 25 mL 于烧杯中沸水浴蒸干，残渣准确加入 25 mL 水溶解，该溶液为水解前样品溶液 M₁；另取 1 mL 水解前样液过 0.45 μm 水相滤膜，滤液供衍生化反应使用。

（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 M₂：准确移取水解前样液 M₁ 10 mL 于 50 mL 水解管中，加入 1.8 mL 硫酸溶液（4 mol/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 % 氢氧化钠溶液中和水解液至 pH 值 6-7，转入 100 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，摇匀，即为水解后样品溶液 M₂，取 1 mL 水解后样液过 0.45 μm 水相滤膜，滤液供衍生化反应使用。

7.2 衍生化反应

分别取标准工作溶液（0.00、0.010、0.020、0.100、0.200、0.500、1.00 mg/mL 的标准溶液）、水解前、水解后样品溶液 M₁、M₂ 各 400 μL 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 氢氧化钠溶液各 400 μL，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 盐酸溶液 500 μL ，混匀；加入约 2 mL 三氯甲烷涡旋振荡 30 s，静止分层后，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 μm 有机滤膜，滤液供液相色谱仪测定使用。

7.3 色谱参考条件

C_{18} 色谱柱：4.6 mm \times 250 mm，粒径 5 μm 或等效；
 流动相：0.02 mol/L 乙酸铵-乙腈（76:24）；
 流速：1.0 mL/min；
 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；
 检测波长：250 nm；
 进样量：2 μL 。

7.4 测定

将衍生化后的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，色谱图见附录 A。

8 结果计算

试样中水解前样品中木糖含量 X_1 以质量分数计，数值以克每 100 克（g/100g），按式（1）计算：

$$X_1 = \frac{C_1 \times V}{m \times 10} \dots\dots\dots (1)$$

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，（50 mL）；

m —试样质量，单位为克（g）；

试样中水解后样品中木糖含量 X_2 以质量分数计，数值以克每 100 克（g/100g），按式（2）计算：

$$X_2 = \frac{C_2 \times V \times N}{m \times 10} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X_2 —水解后样品中木糖的含量（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 —样品水解过程中的稀释倍数，该方法为 10；

试样中各种低聚木糖（以木二糖计）含量，按式（3）计算：

$$X = (X_2 - X_1) \times F \dots\dots\dots (3)$$

X —样品中低聚木糖的含量（以木二糖计）（g/100g）；

X_2 —水解后样品中木糖的含量（g/100g）；

X_1 —水解前样品中木糖的含量（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

9.1 重复性

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

9.2 再现性

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

木糖标准溶液色谱图

木糖标准溶液色谱图见图 A.1

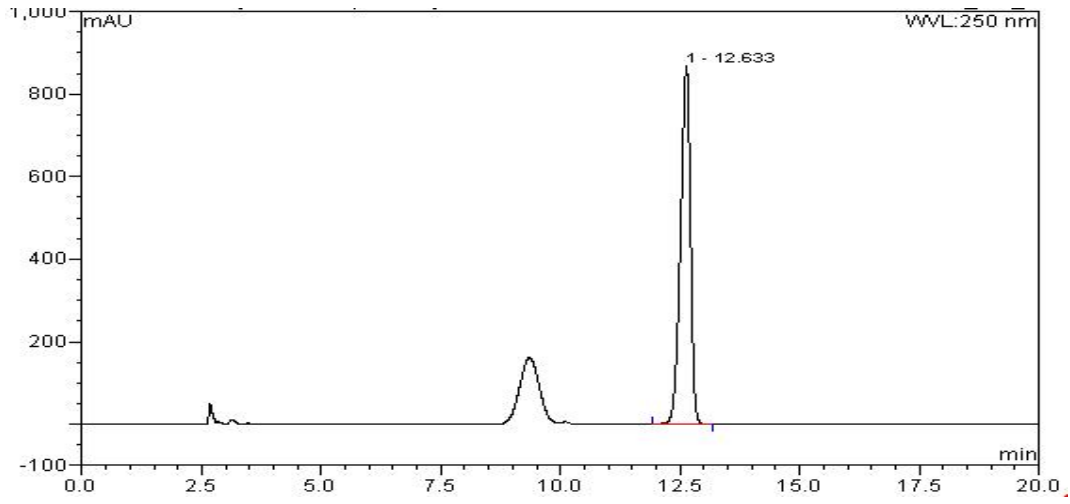


图 A.1.木糖标准溶液色谱图