

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4311—2023

动物骨中多糖含量的测定 液相色谱法

Content determination of polysaccharide in animal bones—
Liquid chromatography method

2023-02-17 发布

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部乡村产业发展司提出。

本文件由农业农村部农产品加工标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农产品加工研究所、山东海钰生物技术股份有限公司。

本文件主要起草人：张春晖、郭玉杰、张鸿儒、沈青山、李侠、韩东、许雄、刘成江、成晓瑜、张志强。



动物骨中多糖含量的测定 液相色谱法

1 范围

本文件规定了动物骨中多糖含量的液相色谱测定方法的原理、材料试剂、仪器设备、分析步骤、结果计算、精密度、检出限和定量限要求。

本文件适用于猪、牛、鸡等动物骨中多糖含量的测定。

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

试样经热压液化、酶解和膜分离得到骨多糖样品。骨多糖样品经硫酸软骨素 ABC 酶解后液相色谱分离,232 nm 波长进行定性检测;骨多糖样品液相色谱分离,192 nm 波长检测,外标法定量。

5 材料和试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 材料

5.1.1 纱布。

5.1.2 有机相微孔滤膜:0.22 μm 。

5.2 试剂

5.2.1 盐酸-乙酸钠缓冲溶液(0.05 mol/L):称取 0.410 g 乙酸钠(CH_3COONa ,CAS 号:127-09-3),溶于 50 mL 水中,用 1% 盐酸溶液调节 pH 至 6.2,定容至 100 mL,摇匀。

5.2.2 10% 乙腈溶液:量取 10 mL 乙腈($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$,CAS 号:75-05-8,色谱纯)至 100 mL 容量瓶中,用水定容,摇匀。

5.2.3 硫酸软骨素 ABC 酶母液(20U/mL):准确称取 10 g 硫酸软骨素 ABC 酶(纯度 $\geq 90\%$)用 20 mL 盐酸-乙酸钠缓冲溶液(5.2.1)溶解后,定容至 100 mL,摇匀。

5.2.4 戊烷磺酸钠溶液(10 mmol/L):称取 1.74 g 戊烷磺酸钠($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NaO}_3\text{S}$,CAS 号:22767-49-3,优级纯),溶于 100 mL 水中,定容至 1 000 mL,摇匀。

5.2.5 骨多糖标准储备溶液(0.5 mg/mL):准确称取 50.0 mg 的骨多糖标准品(纯度 $\geq 98\%$,其中 A 型硫酸软骨素含量 $> 70\%$),溶解于 20.0 mL 乙腈溶液(5.2.2),用水定容至 100 mL,摇匀。

5.2.6 骨多糖标准工作溶液:分别量取 5.0 mL、10.0 mL、20.0 mL、50.0 mL 骨多糖标准储备溶液(5.2.5)于相应的 100 mL 容量瓶中,用 10 % 乙腈溶液稀释定容,得到浓度为 0.025 mg/mL、0.050 mg/mL、0.100 mg/mL、0.250 mg/mL 的标准工作液,现用现配。

5.2.7 糖胺聚糖二糖标准品混合溶液(500 $\mu\text{g/mL}$):分别称取软骨素不饱和二糖($\Delta\text{DiO S}$)、A 型硫酸软

骨素不饱和二糖(Δ Di4 S)、B型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di2,4 diS)、C型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di6 S)、D型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di2,6 diS)、二硫酸基团酯化 E型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di4,6 diS)、三硫酸基团酯化 E型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di2,4,6 triS)各 125.0 mg 于 25 mL 容量瓶中,混合均匀后加水定容,涡旋振荡充分溶解配制成 5 mg/mL 的母液;吸取 100 μ L 母液加入 900 μ L 水进行稀释,配成 500 μ g/mL 的混合溶液。

6 仪器设备

- 6.1 高压灭菌锅。
- 6.2 高效液相色谱仪:配有紫外或二极管阵列检测器。
- 6.3 分析天平:感量 0.000 1 g 和 0.01 g。
- 6.4 离心机:转速 \geq 5 000 r/min。
- 6.5 pH 计:感量 0.01。
- 6.6 糖度计。
- 6.7 涡旋振荡器。
- 6.8 抽滤装置。
- 6.9 高速均质机:转速 \geq 1 500 r/min。
- 6.10 色谱柱:Spherisorb 5-SAX(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)。

注:非商业声明,此处列出的色谱柱仅供参考,不涉及商业目的,允许本文件使用者尝试不同厂家的色谱柱。

7 分析步骤

7.1 试样制备

对代表性动物骨(软骨)样品进行随机取样,剔除附着的肉及筋膜,分割成小于 2 cm \times 2 cm 小块, -20 $^{\circ}$ C 冻存。

7.2 试样处理

称取 50.0 g 试样(精确到 0.1g)于 500 mL 玻璃烧杯中,加入 125 mL 水后搅拌均匀;120 $^{\circ}$ C 条件下热压处理 1.5 h,1500 r/min 均质 20 s,用 6 层纱布过滤得到软骨液化液,加水稀释至 10 g/L。准确量取 50 mL 的软骨液化液(10 g/L),加入 45 mg 胰蛋白酶(\geq 250 U/mg),56 $^{\circ}$ C 酶解 2 h;再加入 5 mg 木瓜蛋白酶(\geq 800 U/mg)60 $^{\circ}$ C 继续酶解 2 h,煮沸 5 min 使酶失活,得到软骨酶解液。用 0.22 μ m 滤膜抽滤后,经截留相对分子量为 10 000 滤膜分离得到骨多糖待测溶液,4 $^{\circ}$ C 保存用于后续检测分析。

7.3 测定条件

7.3.1 定性测定

取 100 μ L 骨多糖溶液加入 2.5 μ L(20 U/mL)硫酸软骨素 ABC 酶,38 $^{\circ}$ C 孵育 8 h 充分酶解;待酶解结束后,沸水浴处理 2 min 使酶失活,5 000 r/min 离心 5 min 后取上清,得到骨多糖酶解液;经高效液相色谱进行骨多糖定性测定。详细条件如下:

- a) 色谱柱:Spherisorb 5-SAX(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)或相当者;
- b) 流动相:A 和 B 分别为 50 mmol/L 和 1 mol/L 的氯化钠溶液,梯度洗脱程序见表 1;
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 柱温:30 $^{\circ}$ C;
- e) 检测波长:232 nm;
- f) 进样量:10 μ L。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间,min	流动相 A,%	流动相 B,%
0.0	100.0	0.0

表 1（续）

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
5. 0	100. 0	0. 0
20. 0	0. 0	100. 0

7.3.2 定量测定

详细条件如下：

- a) 色谱柱: C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；
- b) 流动相: 乙腈+10 mmol/L 戊烷磺酸钠溶液, 比例为 1 : 9(V/V)；
- c) 流速: 0.8 mL/min；
- d) 柱温: 30 ℃；
- e) 检测波长: 192 nm；
- f) 进样量: 10 μL。

7.4 高效液相色谱测定

7.4.1 定性测定

动物骨多糖水解物经高效液相色谱分离, 记录骨多糖水解物样品中二糖分子的保留时间和峰面积, 与糖胺聚糖二糖标准品混合溶液的色谱峰保留时间相比较, 保留时间变化范围应在±2.5%, 统计计算骨多糖水解物中二糖分子的组成和分布情况(见附录 A)。糖胺聚糖二糖标准品混合溶液色谱图见附录 B。

7.4.2 定量测定

以骨多糖标准工作溶液(5.2.6)中骨多糖浓度为横坐标, 以峰面积(响应值)为纵坐标, 绘制标准曲线, 按照外标法进行定量。将试样溶液经高效液相色谱测定, 保留时间 1.8 min 时得到相应的响应值, 根据标准曲线计算试样中骨多糖浓度。待测试样溶液的响应值应在标准曲线范围内, 超过线性范围则应重新分析。重新分析时, 根据超出线性范围倍数估算稀释倍数, 用 10% 乙腈溶液(5.2.2)稀释使其浓度处于线性范围内。骨多糖特征色谱图见附录 C。

7.5 空白实验

除不加试样外, 采用 7.2~7.4 的步骤进行平行操作。

8 结果计算

试样中骨多糖含量按公式(1)计算。

$$X = n \times \frac{C \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X —— 试样中骨多糖含量的数值, 单位为毫克每克(mg/g)；
- n —— 待测试样溶液稀释倍数；
- c —— 根据标准曲线上计算得出的试样溶液中骨多糖浓度, 单位为毫克每毫升(mg/mL)；
- V —— 试样溶液体积的数值, 单位为毫升(mL)；
- m —— 试样质量的数值, 单位为克(g)。

计算结果应减去空白值, 测定结果用平行测定的算术平均值表示, 计算结果保留 2 位有效数字。

9 精密度

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

10 检出限和定量限

本方法检出限为 0.3 mg/g, 定量限为 1.8 mg/g。

附 录 A
(资料性)
不同畜禽骨多糖中二糖组成与含量

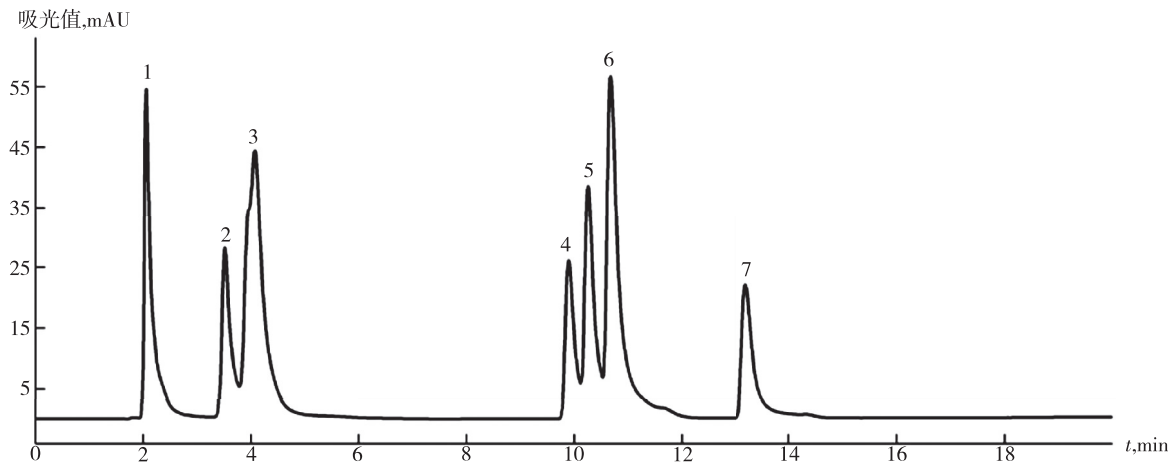
不同畜禽骨多糖中二糖组成与含量参考值见表 A.1。

表 A.1 不同畜禽骨多糖中二糖组成与含量参考值

序号	来源	$\Delta\text{Di}0\text{ S}$	$\Delta\text{Di}6\text{ S}$	$\Delta\text{Di}4\text{ S}$	$\Delta\text{Di}2,6\text{ diS}$	$\Delta\text{Di}4,6\text{ diS}$	$\Delta\text{Di}2,4\text{ diS}$	$\Delta\text{Di}2,4,6\text{ triS}$
1	猪骨	6.87 ± 0.09	19.35 ± 0.03	73.78 ± 0.08	ND	ND	ND	ND
2	牛骨	8.13 ± 0.11	19.93 ± 0.42	71.94 ± 0.27	ND	ND	ND	ND
3	鸡骨	10.55 ± 0.35	22.68 ± 1.00	66.56 ± 0.61	ND	ND	0.21 ± 0.09	ND
注:S表示硫酸基团;ND表示未检测到。表中结果表示为平均值±标准差(N=3)。								

附 录 B
(资料性)
糖胺聚糖二糖标准品混合溶液色谱图

糖胺聚糖二糖标准品混合溶液色谱图见图 B. 1。



- 标引序号说明：
- 1——软骨素不饱和二糖(Δ Di0 S)吸收峰；
 - 2——C 型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di6 S)吸收峰；
 - 3——A 型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di4 S)吸收峰；
 - 4——D 型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di2,6 diS)吸收峰；
 - 5——二硫酸基团酯化 E 型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di4,6 diS)吸收峰；
 - 6——B 型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di2,4 diS)吸收峰；
 - 7——三硫酸基团酯化 E 型硫酸软骨素不饱和二糖(Δ Di2,4,6 triS)吸收峰。

图 B. 1 糖胺聚糖二糖标准品混合溶液色谱图

附 录 C
(资料性)

骨多糖(以硫酸软骨素计)标准工作溶液色谱图

骨多糖(以硫酸软骨素计)标准工作溶液(0.115 mg/mL)色谱图见图 C.1。

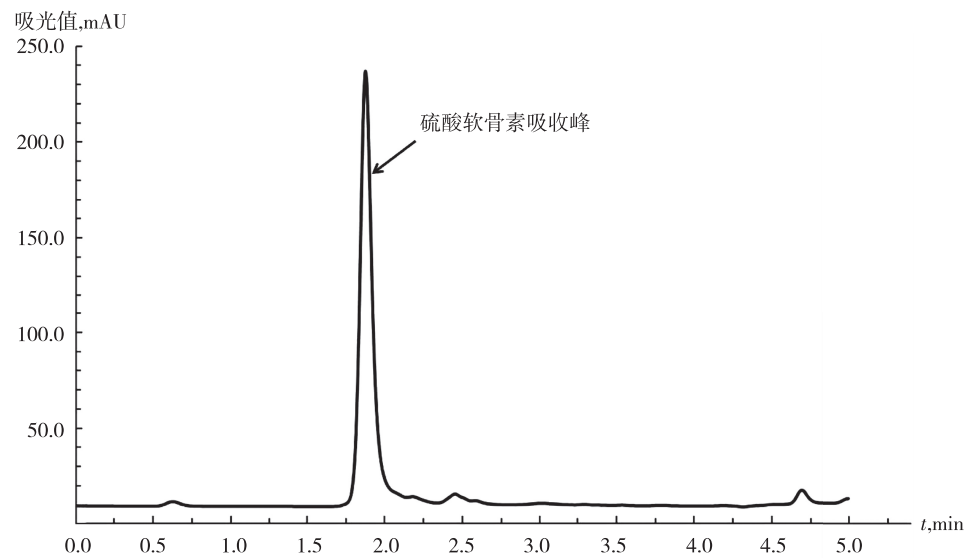


图 C.1 骨多糖(以硫酸软骨素计)标准工作溶液色谱图