

ICS 65.020.01

B 00

T/CAI

中国农业国际合作促进会团体标准

T/CAI 002—2018

生物刺激素 甲壳寡聚糖

Biostimulant—Chitin/Chitosan Oligosaccharides



中国农业国际合作促进会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由生物刺激剂发展联盟提出。

本标准由中国农业国际合作促进会归口。

起草单位名单：山东卫康生物医药科技有限公司、青岛博智汇力生物科技有限公司、湛江市博泰生物化工科技实业有限公司、大连东岩技术开发有限公司、金正大生态工程集团股份有限公司、山东申达作物科技有限公司、河北嘉和生物科技有限公司、中国科学院海洋研究所、中国科学院大连化学物理研究所、中国海洋大学、北京市营养源研究所。

起草人名单：李鹏程、赵峡、尹恒、崔亚娟、邢荣娥、周晖、刘启顺、刘玉峰、李克成、王宗继、张斌、王荣辉、刘东辉、陈德清、赵士明、张连勇、李进国、王丽丽、姜成功、张广金、颀文林、赵莉。

生物刺激素 甲壳寡聚糖

1 范围

本标准规定了生物刺激素甲壳寡聚糖的术语和定义、产品质量符合性要求、试验方法、检验规则、标志、包装、运输和贮存。

本标准规定的产品适用于农作物。

本标准适用于以甲壳质(chitin)或壳聚糖(chitosan)为原料,经过降解、分离或干燥等工艺制成的生物刺激素甲壳寡聚糖原液或原粉产品的生产、检验和销售。

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 5009.3 食品安全国家标准 食品中水分的测定
- GB 5009.4 食品安全国家标准 食品中灰分的测定
- GB 18382 肥料标识 内容和要求
- GB/T 191 包装储运图示标志
- GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备
- GB/T 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备
- GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- NY 884 生物有机肥
- NY 1110 水溶肥料 汞、砷、铅、铬、镉的限量要求
- NY/T 1973 水溶肥料 水不溶物含量和 pH 的测定
- NY/T 1978 肥料 汞、砷、铅、铬、镉含量的测定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 生物刺激素 biostimulant

源于生物的产品,可以促进或有利于植物体内的生理过程,包括有益于营养吸收,提高营养利用效率以及作物品质,通过生物作用诱导植物抗病、抗胁迫力,并可提高肥料有效成分利用率且无害于生态环境的一类相关物质。

3.2 甲壳寡聚糖 chitin/chitosan oligosaccharides

由氨基葡萄糖和/或N-乙酰氨基葡萄糖经 β -1,4-糖苷键连接而成的平均相对分子质量小于6000 Da(按2007年国际原子量表)的寡聚糖及其盐。

4 产品质量要求

4.1 感官指标要求

应符合表1的规定。

表1 感官要求

项 目	原粉产品要求	原液产品要求
色 泽	淡黄色至黄褐色	黄褐色至褐色
状 态	粉末	液体
杂 质	无正常视力可见外来杂质	无正常视力可见外来杂质
气 味	无明显刺激性气味	无明显刺激性气味

4.2 理化指标要求

应符合表2的规定。

表2 理化要求

项 目		指 标	
		原粉	原液
甲壳寡聚糖含量（原粉以质量分数计/%，原液以g/L计/g/L）	≥	80	80
单糖含量（原粉以质量分数计/%，原液以g/L计/g/L）	≤	1	0.5
平均相对分子质量/Da	≤	6000	6000
水分/%	≤	10.0	—
灰分/%	≤	3	—
水不溶物/%	≤	1.0	0.5
pH		4.5~7.0	4.0~7.0

4.3 安全性指标要求

重金属限量指标应符合NY 1110的要求。

蛔虫卵死亡率和粪大肠菌群数指标应符合 NY 884 的要求。

5 试验方法

5.1 基本要求

本方法中所用的水，在未注明其他要求时，应符合GB/T 6682中水的规格，所用试剂，在未注明其他规格时，均指分析纯（AR）。分析中所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其它要求时，均按GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603的规定制备。

5.2 感官检验

取适量样品，在自然光线下，观察样品的色泽，性状，有无杂质，有无明显刺激性气味，并做记录。

5.3 甲壳寡聚糖含量的测定

5.3.1 原理

甲壳寡聚糖经浓盐酸水解生成氨基葡萄糖盐酸盐,根据氨基葡萄糖盐酸盐在流动相和固定相之间具有不同的分配系数,将水解后的试样注入液相色谱,经氨基柱进行色谱分离、蒸发光散射检测器检测,以保留时间定性、外标法定量测定。

5.3.2 仪器和设备

- a) 分析天平: 精度0.1 mg;
- b) 高效液相色谱仪: 带蒸发光散射检测器;
- c) 旋转蒸发仪。

5.3.3 试剂和溶液

- a) 水: 符合GB/T 6682一级水的要求;
- b) 氨基葡萄糖盐酸盐($\geq 99\%$);
- c) 浓盐酸;
- d) 乙腈: 色谱纯。

5.3.4 色谱条件

- a) 色谱柱: 氨基柱(4.6 mm \times 250 mm)或其他同等分析效果的色谱柱;
- b) 流动相: 乙腈: 水=80: 20 (体积比);
- c) 流速: 1.0 mL/min;
- d) 柱温: 30 $^{\circ}$ C;
- e) 蒸发光检测器: 蒸发温度60 $^{\circ}$ C, 雾化温度30 $^{\circ}$ C;
- f) 进样量: 20 μ L。

注: 待仪器基线平稳后再进样。

5.3.5 分析步骤

a) 试样的制备

准确称取甲壳寡聚糖试样 50 mg (精确到 0.1 mg) 至水解管中, 加入 0.5 mL 蒸馏水溶解 (或量取原液 0.5 mL 于水解管中), 加入 3 mL 浓盐酸, 于 100 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C 条件下水解 3 h~4 h (可根据情况适当调整水解时间, 以确保样品全部水解), 冷却, 用旋转蒸发仪蒸发除酸, 然后转移至 50 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 通过水系滤膜 (0.22 μ m) 过滤, 弃初滤液约 0.5 mL, 取滤液, 进样。

b) 标准曲线的绘制

准确称取氨基葡萄糖盐酸盐对照品 50 mg (精确到 0.1 mg), 按试样项方法处理后, 用水定容到 25 mL 容量瓶中作为储备液, 分别用水配制成 0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、1.5 mg/mL、2.0 mg/mL 系列标准溶液。在色谱条件下进样, 以色谱峰面积为纵坐标, 标准物质浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

c) 试样含量测定

在相同色谱条件下,将处理后的试样溶液注入色谱仪中,记录色谱峰的保留时间和峰面积。用氨基葡萄糖盐酸盐的峰面积来定量,根据标准曲线得到待测液中氨基葡萄糖盐酸盐的浓度。

5.3.6 结果计算

甲壳寡聚糖原粉含量(以质量分数计)按公式(1)计算:

$$w_3 = \frac{c \times 50}{m_1 \times (1 - w_0)} \times 100\% - w_1 \dots\dots\dots (1)$$

甲壳寡聚糖原液含量(以g/L计)按公式(2)计算:

$$w_4 = \frac{c \times 50}{0.5} - w_2 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

w_3 ——甲壳寡聚糖原粉的含量,以氨基葡萄糖盐酸盐计,以干基计,单位为质量百分数(%);

w_4 ——甲壳寡聚糖原液的含量,以氨基葡萄糖盐酸盐计,单位为g/L;

c ——由标准曲线查得的氨基葡萄糖盐酸盐的浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

50——样品体积,单位为毫升(mL);

m_1 ——称取待测甲壳寡聚糖原粉试样的质量,单位为毫克(mg);

w_0 ——待测甲壳寡聚糖样品的含水量,单位为质量百分数(%);

w_1 ——待测甲壳寡聚糖原粉样品中的单糖含量,单位为质量百分数(%);

w_2 ——待测甲壳寡聚糖原液样品中的单糖含量,单位为g/L;

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,结果保留二位有效数字。

5.3.7 允许差

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5%。

5.4 单糖含量的测定

5.4.1 原理

甲壳寡聚糖经溶解后,根据氨基葡萄糖盐酸盐、N-乙酰氨基葡萄糖与甲壳寡聚糖在流动相和固定相之间具有不同的分配系数,将溶解后的试样注入液相色谱,经氨基柱进行色谱分离,蒸发光散射检测器检测,以保留时间定性,外标法定量测定。

5.4.2 仪器和设备

- a) 分析天平:精度0.1 mg;
- b) 高效液相色谱仪:带蒸发光散射检测器。

5.4.3 试剂和溶液

- a) 水:符合GB/T 6682一级水的要求;
- b) 氨基葡萄糖盐酸盐($\geq 99\%$);
- c) N-乙酰氨基葡萄糖($\geq 99\%$);
- d) 乙腈:色谱纯。

5.4.4 色谱条件:

参考 5.3.4 方法。

5.4.5 分析方法

a) 对照品溶液制备

取氨基葡萄糖盐酸盐和 N-乙酰氨基葡萄糖各 20 mg (精确到 0.1mg), 用 80%乙腈溶解定容于 50 mL 容量瓶中, 摇匀, 用有机系滤膜 (0.22 μm) 过滤, 弃初滤液约 0.5 mL, 取滤液, 待测。

b) 样品溶液制备

称取甲壳寡聚糖原粉试样 200 mg (精确到 0.1mg), 或量取原液 2 mL。用 80%乙腈溶解定容于 50 mL 容量瓶中, 用有机系滤膜 (0.22 μm) 过滤, 弃初滤液约 0.5 mL, 取滤液, 待测。

5.4.6 结果计算

甲壳寡聚糖原粉单糖含量 (以质量分数计)按公式(3)计算:

$$w_1 = \left(\frac{C_D \times r_u}{r_D} + \frac{C_N \times r_s}{r_N} \right) \times \frac{V}{M_T} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

甲壳寡聚糖原液单糖含量 (以g/L计)按公式(4)计算:

$$w_2 = \left(\frac{C_D \times r_u}{r_D} + \frac{C_N \times r_s}{r_N} \right) \times D \dots\dots\dots (4)$$

式中:

w_1 ——甲壳寡聚糖原粉单糖含量, 单位为质量百分数 (%)

w_2 ——甲壳寡聚糖原液单糖含量, 单位为g/L

C_D ——对照品溶液中氨基葡萄糖盐酸盐的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

C_N ——对照品溶液中 N-乙酰氨基葡萄糖的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

M_T ——称取甲壳寡聚糖原粉试样的质量, 单位为毫克 (mg);

r_u ——样品溶液中氨基葡萄糖的峰面积;

r_s ——样品溶液中 N-乙酰氨基葡萄糖的峰面积;

r_D ——对照品溶液中氨基葡萄糖的峰面积;

r_N ——对照品溶液中 N-乙酰氨基葡萄糖的峰面积;

V ——原粉试样的定容体积;

D ——原液的稀释倍数。

5.4.7 允许差

平行样检测结果绝对差值 ≤ 0.3%。

5.5 平均相对分子质量的测定 (高效液相色谱法)

5.5.1 原理

试样用 0.1mol/L 硫酸钠溶液溶解后, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 采用凝胶排阻色谱测定, 根据色谱峰保留时间测定甲壳寡聚糖的平均相对分子质量。

5.5.2 仪器和设备

除常规实验室仪器设备外, 还包括以下仪器设备:

- a) 分析天平: 精度0.1 mg;
- b) 高效液相色谱仪: 示差折光检测器。

5.5.3 试剂和溶液

- a) 水: 符合GB/T 6682一级水的要求;
- b) 硫酸钠;
- c) 相对分子质量对照品: 相对分子质量 (M_w) 1000, 2700, 5250, 9750, 13050, 36800Da 或具有相对分子质量相近的右旋糖酐对照品系列。

5.5.4 色谱条件

- a) 色谱柱: TSK G3000-PW_{XL} 色谱柱, 250 \times 4.6 mm或相同性质的填充柱, 柱温35 $^{\circ}\text{C}$;
- b) 流动相: 0.1mol/L硫酸钠溶液;
- c) 流速: 0.5 mL/min;
- d) 检测器: 示差折光检测器, 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.5.5 操作步骤

a) 对照品溶液的配制

分别称取右旋糖酐对照品约 5 mg, 精确到 0.1 mg, 加 0.1 mol/L 硫酸钠溶液溶解并稀释至 1 mL, 混匀, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液备高效液相色谱分析用。

b) 供试品溶液的配制

称取试样约 50 mg (或取原液 0.5 mL), 加 0.1mol/L 硫酸钠溶液溶解并稀释至 10 mL, 混匀, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液备高效液相色谱分析用。

c) 测定

将对照品溶液注入液相色谱仪, 进行高效液相色谱分析, 测定各对照品组分的色谱保留时间, 以对照品相对分子质量的对数值和保留时间绘制标准曲线。在色谱分析条件下, 取供试品溶液 (b) 注入高效液相色谱仪分析, 测定试样保留时间, 按对照品相对分子质量标准曲线, 计算甲壳寡聚糖平均相对分子质量。

5.6 水分的测定

按 GB 5009.3 规定的直接干燥方法测定。

5.7 灰分的测定

按GB 5009.4规定的方法测定。

5.8 水不溶物的测定

按 NY/T 1973 规定的方法测定。

5.9 pH 的测定

原粉用水配制成 1%（质量百分比）的溶液，原液用水稀释 10 倍，按 NY/T 1973 规定的方法测定。

5.10 砷、镉、铅、铬、汞的测定

应符合 NY/T 1978 的限量规定。

6 检验规则

6.1 组批

同原料、同工艺生产的，同一包装线同一天包装出厂（或入库的），质量均一的产品为一批。

6.2 取样与抽样

6.2.1 采用适宜的方法保证取样具有代表性，保证取样部位和取样瓶的清洁。

6.2.2 产品按批抽样。批量少于 600 件时，从不少于 3 件最小规格包装中，抽取 200 g 样品。批量大于 600 件时，按包装件数的 0.5% 比例的最小规格包装中，抽取 200 g 样品。

6.2.3 将所取样品混匀后，分为二份，一份检验，一份封存备查。密闭保存于包装袋或磨口瓶中，粘贴标签，并注明生产厂名、产品名称、批号、数量、取样日期。

6.3 出厂检验

出厂检验项目为甲壳寡聚糖含量、平均相对分子质量、水分、灰分、水不溶物和 pH。

6.4 型式检验

检验项目为本标准要求中规定的全部项目。一般情况下，型式检验半年进行一次。有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

- a) 原辅材料有较大变化时；
- b) 更改关键工艺或设备时；
- c) 新试制的产品或正常生产的产品停产 3 个月后，重新恢复生产时；
- d) 出厂检验与上次型式检验结果有较大差异时；
- e) 国家质量监督检验机构按有关规定需要抽检时。

6.5 判定规则

指标有不合格项时，应在同批产品中加倍抽样进行复检，以复检结果为准；若复检结果仍有不合格项时，则判定整批产品不合格。

7 标志、标签、包装、贮存、运输

7.1 标志、标签

甲壳寡聚糖标志、标签应符合 GB 18382 的规定，同时注明贮运条件、毒性和防护措施。

7.2 包装

包装应符合GB 18382和GB/T 191的规定。

7.3 贮存

应储存在阴凉、干燥、清洁的仓库内。防止日晒雨淋，远离火源。常温下避光密封储存。不得露天存放，不得与有毒有害易污染的物品或其他杂物混存。

甲壳寡聚糖原粉保质期为3年，原液保质期3个月。

7.4 运输

运输的工具应便于运输，运输过程中有遮盖物，防止雨淋、日晒及高温。轻装轻卸，避免包装破损。不得与有的有害物质混装、混运。
