

团 体 标 准

T/QBAA 001-2023

酿酒酵母培养物中甘露聚糖的测定 反相高效液相色谱法

Determination of Mannan Content in Brewery Yeast Culture

Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

(征求意见稿)

2023-××-××发布

2023-××-××实施

中关村量子生物农业产业技术创新战略联盟 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。

本标准由中关村量子生物农业产业技术创新战略联盟标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：北京农学院、北京中农弘科生物技术有限公司、河北弘科荣达生物技术有限公司、安琪酵母股份有限公司、安徽东方新新生物技术有限公司、北京大北农科技集团股份有限公司、中国农业大学、铁骑力士食品有限责任公司。

本标准主要起草人：刘明、王文欢、覃先武、谢申猛、赵学军、白秀梅、陆文清、周建川、王宗义、夏冰、庞远祥、刘茹、刘运平、赵莉莉。

引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到与《一种酵母培养物中甘露聚糖的检测方法》（ZL 2017 1 0219300.2）相关的专利的使用。

本文件的发布机构对该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就该专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：北京中农弘科生物技术有限公司

地址：北京市昌平区生命科学园北清创意园 3-1-207

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

酿酒酵母培养物中甘露聚糖含量的测定

反相高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了酿酒酵母培养物中甘露聚糖含量的反相高效液相色谱测定方法。
本文件适用于酿酒酵母培养物中甘露聚糖的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过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 6682-2008 《分析实验室用水规格和试验方法》

T/CSWSL 003-2018 《饲料原料 酿酒酵母培养物》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 甘露聚糖 Mannan

甘露聚糖是高度分支的多聚体，以 α -1,6-甘露糖为骨架链，大部分甚至全部的残基具有 α -1,2或 α -1,3连接的含有2~5个甘露糖残基的侧链。

3.2 反相高效液相色谱法 Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography/ RP-HPLC

液相色谱法是具有下述特征的物理和化学分离分析方法，使用液体为流动相，每种分析物在色谱柱的固定相和流动相间的相互作用存在差异，这种差别被利用来分离混合物。反相高效液相色谱法是固定相的极性小于流动相，并且流动相被加压传送以取得短时间内的高效分离的液相色谱分析方法。

反相高效液相色谱法是固定相的极性小于流动相，并且流动相被加压传送以取得短时间内的高效分离的液相色谱分析方法。

4 原理

将酵母培养物进行预处理后充分破坏酵母细胞壁释放酵母细胞壁中甘露聚糖，然后在酸性/碱性条件下水解为单糖——甘露糖，甘露聚糖水解后的甘露糖与糖类常用的衍生试剂 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）发生衍生化反应生成稳定、紫外吸收强的衍生物；同时甘露糖标准溶液、甘露聚糖标准溶液在相同条件下进行衍生化反应；衍生化后的样品、甘露糖和甘露聚糖标准品溶液经 RP-HPLC 进行分析检测。根据样品、甘露糖标准品和甘露聚糖得到的色谱数据，计算样品中甘露糖的质量，再换算后获得甘露聚糖的含量。

5 试剂和材料

以下试剂除非另有规定，仅使用色谱纯试剂及以上，实验室用水符合 GB/T 6682-2008 规定的一级水要求。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇
- 5.1.2 乙腈
- 5.1.3 氯仿（分析纯）
- 5.1.4 盐酸（分析纯）
- 5.1.5 硫酸（分析纯）
- 5.1.6 乙酸（分析纯）
- 5.1.7 氢氧化钠（分析纯）
- 5.1.8 乙酸铵（分析纯）
- 5.1.9 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）（分析纯）
- 5.1.10 甘露糖标准品（98%）
- 5.1.11 甘露聚糖标准品（98%）
- 5.1.12 β -葡聚糖酶（ ≥ 3000 u/mg）
- 5.1.13 酸性蛋白酶（ $\geq 700,000$ u/g）
- 5.1.14 纤维素酶（50,000 u/g）

5.2 标准溶液

5.2.1 甘露糖标准溶液

准确称取甘露糖标准品 0.05 g 于 100 mL 烧杯中，加水溶解后定容至 100 mL 容量瓶中，作为标准储备溶液（0.5 mg/mL）。用前取 10 mL 储备溶液定容至 100 mL 容量瓶中作为标准溶液（0.05 mg/mL）。

5.2.2 甘露聚糖标准溶液

准确称取甘露聚糖标准品 0.03 g 于 100 mL 烧杯中，加水溶解后定容至 100 mL 容量瓶中，作为标准储备溶液（0.3 mg/mL）。用前取 10 mL 储备溶液定容至 100 mL 容量瓶中作为标准溶液（0.03 mg/mL）。

5.2.3 NaOH 溶液

5.2.3.1 6 mol/L NaOH 溶液

称取 240 g（精确至 0.01 g）NaOH，加入到盛有 500-800 mL 水的烧杯中，使其完全溶解，待溶液冷却后，再转移至 1000 mL 容量瓶中，将烧杯用水冲洗两次，将洗液一并转移至容量瓶中，再加水稀释至刻度，备用。

5.2.3.2 0.3 mol/L NaOH 溶液

称取 12 g（精确至 0.01 g）NaOH，加入到盛有 500-800 mL 水的烧杯中，使其完全溶解，待溶液冷却后，再转移至 1000 mL 容量瓶中，将烧杯用水冲洗两次，将洗液一并转移至容量瓶中，再加水稀释至刻度，备用。

5.2.4 盐酸溶液

5.2.4.1 0.3 mol/L 盐酸溶液

量取 25 mL 盐酸(5.1.4), 缓缓加入到盛有 500-800 mL 水的烧杯中, 待溶液冷却后, 再转移至 1000 mL 容量瓶中, 将烧杯用水冲洗两次, 将洗液一并转移至容量瓶中, 再加水稀释至 1000 mL, 制得 0.3 mol/L 盐酸溶液备用。

5.2.4.2 0.1 mol/L 盐酸溶液

量取 8.3 mL 盐酸(5.1.4), 缓缓加入到盛有 500-800 mL 水的烧杯中, 待溶液冷却后, 再转移至 1000 mL 容量瓶中, 将烧杯用水冲洗两次, 将洗液一并转移至容量瓶中, 再加水稀释至 1000 mL, 制得 0.1 mol/L 盐酸溶液备用。

5.2.4.3 2 mol/L 盐酸溶液

量取 166.67 mL 盐酸(5.1.4), 缓缓加入到盛有 500-800 mL 水的烧杯中, 待溶液冷却后, 再转移至 1000 mL 容量瓶中, 将烧杯用水冲洗两次, 将洗液一并转移至容量瓶中, 再加水稀释至 1000 mL, 制得 2 mol/L 盐酸溶液备用。

5.2.5 PMP 溶液

称取 43.11g 的 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP), 充分溶解于少量甲醇溶液中, 使用甲醇溶液定容至 500 mL, 制得 0.5 mol/L PMP 溶液备用, 试验前配制。

5.2.6 酶解液

将 β -葡聚糖、酸性蛋白酶和纤维素酶各称取 0.4 g (精确至 0.01 g), 按照 1:1:1 混合, 溶于 90 mL 水中, 使用 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 5-5.5, 定容至 100 mL, 制备得 pH 值 5-6 的酶解液备用, 随用随配, 暂放于 4℃ 保存待用。

5.2.7 72%硫酸溶液

量取 652 mL 硫酸(5.1.5), 缓缓加入到盛有 500-800 mL 水的烧杯中, 待溶液冷却后, 再转移至 1000 mL 容量瓶中, 将烧杯用水冲洗两次, 将洗液一并转移至容量瓶中, 再加水稀释至 1000 mL, 制得 72% 硫酸溶液备用。

6 仪器

- 6.1 高效液相色谱仪 配有紫外检测器
- 6.2 高速均质机 (转速>10000 rpm)
- 6.3 pH计
- 6.4 台式离心机 (离心力>3000 g)
- 6.5 超声波破碎仪 (频率20-25 KHz, 功率650 W)
- 6.6 电子分析天平 感量0.0001 g, 0.01g (0.0001g -120 g)
- 6.7 恒温水浴锅

7 测定步骤

7.1 酵母培养物样品预处理

根据自身实验室条件选择采用以下预处理方式之一。

7.1.1 超声预处理

准确称取酵母培养物样品 4.5 g（精确至 0.001g）于三角瓶中，加水 25.5 mL，在超声功率 100 W 条件下超声 35 min 得预处理液。

7.1.2 酶解预处理

准确称取酵母培养物样品 4.5 g（精确至 0.001g）于三角瓶中，量取 25.5 mL 酶解液，在 pH 值 5-6，温度 60°C 的条件下，酶解 3-5 h，得预处理液。

7.1.3 匀质预处理

准确称取酵母培养物样品 4.5 g（精确至 0.001g）于烧杯中，加水 25.5 mL，然后采用高速均质机 10000 r/min 条件下处理 10 min 得预处理液。

7.2 预处理液的水解

根据自身实验室条件选择采用以下水解方式之一。

7.2.1 硫酸水解

分别量取样品预处理液、甘露聚糖标准品溶液 0.5 mL 作为试样，放入两个 25 mL 耐压反应管中，在每个反应管中加入 72%硫酸 2.5 mL，摇匀静置 1~3 h，加超纯水 18 mL 后，密封耐压反应管在 100°C 下搅拌水解 5 h，水解完成后将反应管用冰水冷却，然后将水解液移入容量瓶中，定容至 100 mL；接着分别量取 10 mL 试样溶液用 6 mol/L NaOH 溶液调为中性，再定容至 100 mL，作为待测样品水解溶液、甘露聚糖标准品水解溶液。

7.2.2 盐酸水解

分别量取样品预处理液、甘露聚糖标准品溶液中的 0.5 mL 作为试样，放入两个 100 mL 耐压反应管中，在每个反应管中加入 2 mol/L 盐酸 50 mL，混合均匀后，密封耐压反应管在 100°C 下搅拌水解 4 h，水解完成后将反应管用冰水冷却，然后将水解液移入容量瓶中，定容至 100 mL；接着取其中 10 mL 试样溶液用 6 mol/L NaOH 溶液调为中性，再定容至 100 mL，作为待测样品水解溶液、甘露聚糖标准品水解溶液。

7.3 衍生化

分别量取甘露糖标准品溶液、甘露聚糖标准品水解溶液和待测样品水解溶液 400 μ L，置于三个 10 mL 具塞离心管中，每个试管分别添加 0.5 mol/L PMP 溶液（须现配现用）、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 30 min，放冷后加入 0.3 mol/L 盐酸溶液 500 μ L，混匀，用三氯甲烷萃取出过量的 PMP，每次用 2.5 mL 三氯甲烷洗涤 4 次，最后将水层液离心后，取上清液待测。

7.4 测定

7.4.1 色谱条件

色谱柱：填料 C18，300 mm×4.9 mm，粒径 5 μm；

流动相：0.1 mol/L 乙酸铵缓冲液 pH5.5-乙腈（V/V，70 : 30）；

流速：1.0 mL/min；

柱温：35℃；

检测波长：250 nm；

进样量：20 μL。

7.4.2 绘制标准曲线

按照本标准测定方法及色谱条件下，测定一系列浓度梯度的甘露糖标准品色谱图。以甘露糖标准溶液浓度（mg/L）为横坐标 x ，以对应的色谱峰面积为纵坐标 y ，绘制标准曲线。

7.4.3 甘露聚糖含量计算

在同样的色谱条件下，将样品、甘露糖标准品分别注入色谱仪中，记录各色谱峰的峰面积，每份样品重复 2 次结果取平均值。

试样中甘露聚糖的含量按式（I）计算：

$$x = \frac{A2 \times M1 \times P1 \times 0.9 \times F}{A1 \times M2} \times 100 \quad (\text{I})$$

式（I）中：

x ：甘露聚糖含量，%；

$A1$ ：衍生化反应后的标样溶液中，甘露糖峰面积的平均值；

$A2$ ：衍生化反应后的样品溶液中，甘露糖峰面积的平均值；

$M1$ ：甘露糖标样的质量，g；

$M2$ ：样品溶液中酵母培养物的质量，g；

$P1$ ：甘露糖标样中甘露糖的质量百分含量，%；

F ：样品酸水解过程中甘露糖被破坏造成结果偏低的补偿系数；

0.9：甘露糖转化为甘露聚糖的系数（甘露糖在甘露聚糖中残基分子量与水解后得到的甘露糖分子量比值是 0.9）。

式（I）中的 F 值按照式（II）计算：

$$F = \frac{p \times M \times 1000}{X1 \times 0.9} \quad (\text{II})$$

式（II）中：

T/QBAA 001-2023

P : 甘露聚糖标样中甘露聚糖的质量百分含量, %;

X_1 : 通过甘露糖标准曲线计算出的甘露聚糖质量, mg;

M : 甘露聚糖标样的质量, g。

7.4.4 精确度

在重复条件下获得两次测定结果的绝对差值应不超过算术平均值的 10%。

附录 A

甘露糖标准溶液的 HPLC 色谱图

按照 5.2 制得的标准溶液经 7 所得的高效液相色谱图见图 A.1

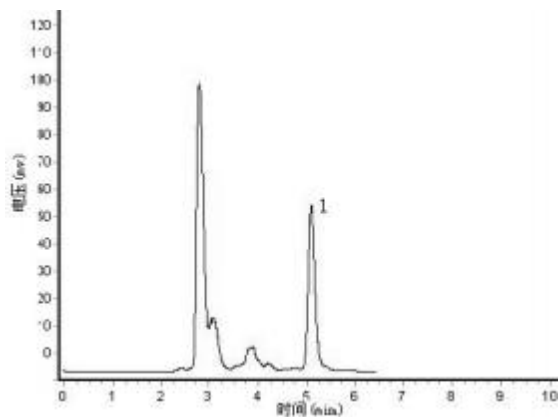


图 A.1 甘露糖标准溶液高效液相色谱图

按 7 所得样品甘露糖 PMP 衍生物的高效液相色谱图见图 A.2

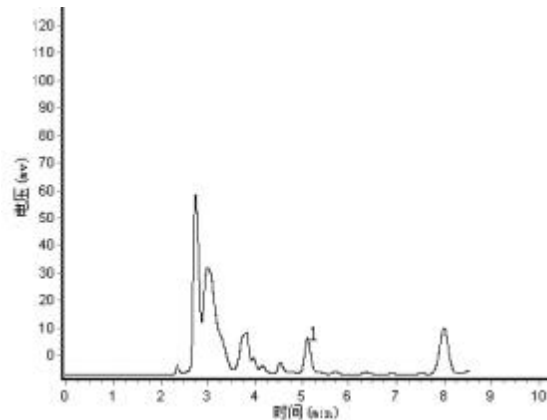


图 A.2 样品甘露糖 PMP 衍生物的高效液相色谱图

甘露糖标准曲线见图 A.3

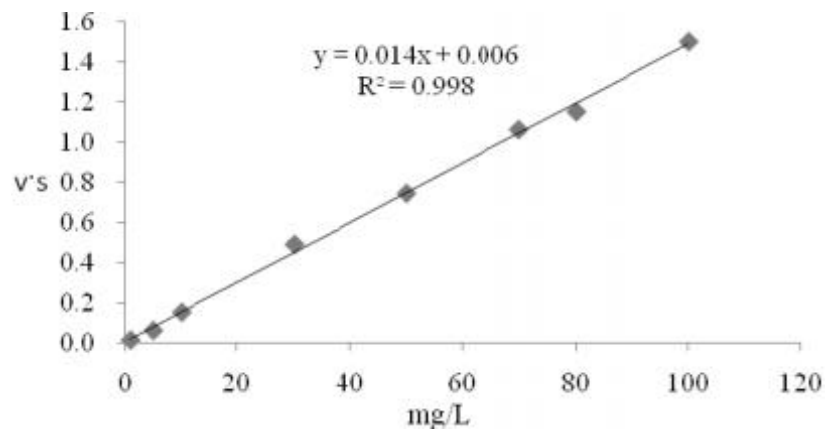


图 A.3 甘露糖标准曲线