

中国标准化协会标准

《褐藻酸寡糖含量的测定》（征求意见稿）编制说明

一、工作简况

1、任务来源

团体标准《褐藻酸寡糖含量的测定》由中国标准化协会于 2023 年 6 月份批准立项，计划编号：[2023]334 号。本团体标准由青岛和海生物科技有限公司提出，主要起草单位有中国海洋大学、青岛海之林科技开发有限公司、青岛海洋生物医药研究院、青岛达康海洋生物科技有限公司、中国农业科学院烟草所、山东省海洋科学研究院、威海迪普森生物科技有限公司、中国水产科学院黄海水产研究所、华东理工大学、青岛博智汇力生物科技有限公司等。

2、编制背景及目标

褐藻酸寡糖是由 α -L-古罗糖醛酸和 β -D-甘露糖醛酸, 通过 1 $\rightarrow$ 4 糖苷键连接成的聚合度主要为 2-10 的寡糖。褐藻酸寡糖具有调节动物消化道吸收功能、加快机体新陈代谢、促进畜禽快速生长、提高畜禽综合体质等作用, 已于 2011 年进入饲料添加剂目录。在农业上, 褐藻酸寡糖可打破种子休眠促进萌发, 促进根和茎叶生长, 保花保果, 促进果实成熟, 增强植物抗逆性。

由于抗生素的滥用带来严重的社会问题, 世界各国学者开展了能替代抗生素的绿色饲料添加剂研发。褐藻酸寡糖作为饲料添加剂, 具有提高动物免疫力、降低饲料用量、提高饲料转化率、提高动物生产性能和产品品质的功效, 具有良好的抗生素替代的应用前景。随着全球畜牧养殖技术的不断提高, 1999~2013 年世界动物保健产品的市场发展需求持续发展。从全球市场需求看, 各种动物的份额大致分为牛羊、猪禽、宠物及其它动物三大类, 各占 1/3。随着联合国对绿色养殖的倡导和对抗生素等药物的限制使用, 褐藻酸寡糖会越来越广泛地被应用到动物保健品和饲料工业中。

然而, 我国尚未确立统一的褐藻酸寡糖质量技术标准, 目前关于褐藻酸寡糖的含量测定标准, 只有辽宁省地方标准 DB21/T2598—2016《褐藻酸寡糖含量的检测》。该检测方法对照品采用的是半乳糖醛酸, 与褐藻酸寡糖的结构组成不一致, 对于褐藻寡糖产品检测存在巨大的误差, 严重制约了褐藻酸寡糖的应用和行

业发展。褐藻酸寡糖行业迫切需要建立相关的质量保障技术标准体系，统一规范产品质量和提高检测整体技术水平，保障产品的质量安全，规范市场秩序，维护有序竞争。

3、工作过程

（一）项目启动

为确保团体标准《褐藻酸寡糖含量的检测》编制工作的顺利开展，2023 年 1 月，青岛和海生物科技有限公司组建了项目编制组，并明确了工作职责，定期召开会议研究工作。项目课题组按 GB/T1.1 的要求，各编写小组人员开展了资料收集与分析、方法优化与调查等相关工作。从科研与生产实践两方面出发，进行前期广泛调查及数据收集，汇集各方面的资料，确定了编制时间进度安排，编写了《褐藻酸寡糖含量的检测》（标准初稿）。

（二）收集国内外相关资料

（1）相关研究资料

编制工作启动后，广泛收集同行相关研究报告，征求了相关院校、生产单位、国内同行和专家的意见，经汇总整理，形成了标准编制所需的基础资料。

（2）国内相关标准概况

根据检索，截止 2023 年 3 月，目前我国现行的国标及行业标准中，只有辽宁省地方标准 DB21/T2598—2016《褐藻酸寡糖含量的检测》。该检测方法，对照品采用的是半乳糖醛酸，与褐藻酸寡糖的结构组成不一致。经实际检测验证，发现对不同褐藻寡糖的产品进行检测存在明显误差，特别是对低浓度的褐藻酸寡糖产品误差巨大，严重制约了褐藻酸寡糖的应用和发展。

（3）国外相关标准概况

目前为止，暂未查询到关于褐藻酸寡糖含量测定方面的国际标准和国外标准等。

（三）标准立项会议及标准草稿修改

2023 年 5 月 22 日，中国标准化协会组织专家召开标准立项会。

2023 年 6 月至 2024 年 2 月，标准编写组通过与参与单位多次交流和讨论，扩大调研范围，充分征求相关院校、国内同行和专家对《褐藻酸寡糖含量的测定》的意见进行修改和完善，组织座谈会，在此基础上，形成标准征求意见稿。

4、主要起草单位及起草人所做的工作

主要参加单位	成员	主要工作
青岛和海生物科技有限公司	张斌、王丽丽	全面负责团体标准的整体工作。参与两个检测方法的验证。寡糖生产企业。
中国海洋大学	赵峡、周晖	赵峡教授是起草组的组长，全面负责团体标准的技术问题。
青岛海之林科技开发有限公司	陈宏、刘兴勇	寡糖生产企业，参与两个检测方法的验证。
青岛海洋生物医药研究院	胡婷、吕友晶	建立分光光度法，并负责方法的验证、改进和完善。
青岛达康海洋生物科技有限公司	李全才、邵萌	建立羧基转化滴定法，并负责方法的验证、改进和完善，寡糖生产企业。
中国农业科学院烟草所	荆常亮、邹平	参与两个检测方法的验证。
山东省海洋科学研究院	王颖、刘天红	参与两个检测方法的验证。
威海迪普森生物科技有限公司	牟海津、朱琳	寡糖生产企业，参与两个检测方法的验证。
中国水产科学院黄海水产研究所	盛军、王海英	参与两个检测方法的验证。
华东理工大学	赵黎明、王宜冰	参与两个检测方法的验证。
青岛博智汇力生物科技有限公司	管昶、徐小龙	寡糖生产企业，参与两个检测方法的验证。

二、标准编制原则和主要内容

1、标准制定原则

1) 编制原则：标准制定以保证适用的前提下，内容力求完整、准确、易于理解，并充分注重标准的科学性、先进性、适用性、经济合理性、安全可靠性的基本原则。编制本标准遵循如下依据：GB/T1.1-2020《标准化工作导则第1部分：

标准化文件的结构和起草规则》。

2) 适应性：本标准规定了褐藻酸寡糖含量的测定方法，适用于以褐藻酸盐为原料，经加工制成的寡糖产品中褐藻酸寡糖含量的测定。

3) 可行性：通过收集相关领域的文献，并结合参与单位的科研情况和实践经验，建立了适合褐藻酸寡糖含量检测的方法。方法经过了系统的方法学考察和多家单位检测验证，无需特殊设备，操作简单，可行性好。

4) 可重复性（试验、数据、方法等的可重复性）：经过方法学和多家单位检测验证，羧基转化滴定法和分光光度法重复性试验 RSD 均低于 2%，试验结果精密度高，方法重复性好，能够满足褐藻酸寡糖的含量测定要求。

2、标准主要技术内容

本标准规定了褐藻酸寡糖含量的测定方法。适用于以褐藻酸盐为原料，经加工制成的寡糖产品中褐藻酸寡糖含量的测定。本标准包含两个检测方法，分别为羧基转化滴定法和分光光度法。

羧基转化滴定法：褐藻酸寡糖分子中单糖残基为C6位含有羧基（ C_6-OOR ）的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸，一般情况下R为Na和/或H。将褐藻酸寡糖用氢氧化钠溶液转化为钠盐后，进行灰化可使单糖残基上的羧酸钠转化成碳酸盐，可用盐酸标准溶液进行滴定，通过消耗的盐酸摩尔数计算褐藻酸寡糖的含量。

分光光度法：褐藻酸寡糖在浓硫酸作用下加热水解脱羧，生成糠醛或糠醛衍生物，可与呋唑发生缩合反应生成紫红色化合物。该类化合物在 530 nm 左右有最大吸收，在一定范围内，吸光度值与糖醛酸浓度呈线性关系。

3、标准解决的主要问题

当前市场上含褐藻寡糖产品众多，效果良莠不齐，缺乏简便且行之有效的含量测定方法。我国尚未确立统一的褐藻酸寡糖质量技术标准，严重制约了褐藻酸寡糖的应用和发展。褐藻酸寡糖行业迫切需要建立相关的质量保障技术标准体系，统一规范产品质量和提高检测技术水平，保障产品的质量安全，规范市场秩序，维护有序竞争。本标准的制定，有效解决了褐藻酸寡糖含量测定方法的技术瓶颈，为当前市售的众多宣传含褐藻酸寡糖产品的含量测定提供了可靠的检测方法，对提升褐藻酸寡糖的质量和促进整个行业的发展具有重要作用，并填补了褐藻酸寡糖含量检测方法的空白。

三、主要试验（或验证）情况分析

（一）羧基转化滴定法

原理：褐藻酸寡糖分子中单糖残基为 C6 位含有羧基（C₆-OOR）的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸，一般情况下 R 为 Na 和/或 H。将褐藻酸寡糖用氢氧化钠溶液转化为钠盐后，进行灰化可使单糖残基上的羧酸钠转化成碳酸盐，用盐酸标准溶液进行滴定，通过消耗的盐酸摩尔数可计算褐藻酸寡糖的含量。

检测方法：

1、仪器及试剂：真空干燥箱、分析天平、pH 计、电子调温万用电炉、高温炉，氢氧化钠、0.01 mol/L 盐酸标准溶液、甲基橙指示剂、纯水。

2、操作方法：称取恒重后的褐藻酸寡糖样品 500 mg（精确至 1 mg）（m1）于坩埚中，用 20 mL 纯水溶解后，使用 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液将样品溶液 pH 调至 10。待溶液 pH 稳定后，再使用 0.2 mol/L 盐酸溶液将样品溶液 pH 调至 8.0。待溶液 pH 稳定至 8.0 后，置电子调温万用电炉上缓慢加热蒸干（需避免温度过高和溶液喷溅），炭化，得到黑色炭化物。将含有炭化物的坩埚转入高温炉中，在 650 °C±25 °C 下灰化 4 小时。灰化结束后冷却至室温，将灰化物用煮沸冷却至室温的纯水溶解，定容至 1000 mL。准确量取 50.0 mL 灰化物溶液于 250 mL 三角瓶中，加入甲基橙溶液 5-6 滴，用 0.01 mol/L（c1）盐酸标准溶液滴定到溶液由黄色突变为橙色（滴定至溶液 pH 为 4.0），记录消耗盐酸标准溶液的毫升数为 V。

3、结果计算

$$\text{褐藻酸寡糖含量 (\%)} = \frac{c1 \times V \times 198 \times 1000}{m1 \times 50} \times 100\%.$$

对不同来源的褐藻酸寡糖，采用羧基转化滴定法的检测结果如表 1 所示：

表 1 羧基转化滴定法样品检测结果

	取样量 (mg)	盐酸标准 溶液浓度 (mol/L)	盐酸标准 溶液消耗 体积 (V)	含量 (%)	平均值 (%)
样品 1	499.7	0.01011	11.2	89.73	89.98±0.43
	499.7		11.2	89.73	
	500.0		11.3	90.48	
样品 2	500.5	0.01011	11.90	95.19	95.13±0.11
	500.5		11.90	95.19	
	501.5		11.90	95.00	
样品 3	501.5	0.01011	10.6	84.62	84.11±0.44
	501.3		10.5	83.86	
	501.3		10.5	83.86	

（二）分光光度法

原理：褐藻酸寡糖在浓硫酸作用下加热水解脱羧，生成糠醛或糠醛衍生物，可与呋唑发生缩合反应生成紫红色化合物。该类化合物在 530 nm 左右有最大吸收，在一定范围内，吸光度值与糖醛酸浓度呈线性关系。

检测方法：

1、仪器及试剂：紫外分光光度计、分析天平、漩涡混合振荡器、 恒温干燥箱。浓硫酸、十水合四硼酸钠、呋唑、褐藻酸钠对照品： $\geq 98\%$ 、纯水、无水乙醇。

2、样品及试剂配制

褐藻酸钠对照品溶液（0.1 mg/mL）：精密称取烘干至恒重的褐藻酸钠对照品 50 mg（精确到 0.1 mg），用适量纯水溶解，充分溶胀至溶液澄清透亮，定容至 500 mL，即得。

待测样品配制（0.06 mg/mL）：精密称取 60 mg（精确到 0.1 mg）(m2) 烘干至恒重的待测样品，纯水定容至 1000 mL，即得。

硫酸-硼砂溶液：称取硼砂 3.6 g，加入纯水 40 mL，浓硫酸 36 mL，硼砂溶解后避光静置过夜。

呋唑溶液：称取 0.25 g 呋唑，加入无水乙醇溶解，定容至 250 mL。

3、标准曲线的制定

分别精密吸取褐藻酸钠对照品溶液 0 mL, 0.05 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL 置具塞试管中，用纯水补至 0.5 mL。分别加入硫酸-硼砂试剂（10.2.2）3 mL，振荡均匀后于沸水浴中加热反应 10 min，快速冷却至室温。加入呋唑试剂（10.2.3）0.1 mL，振荡均匀后于沸水浴中反应 10 min，快速冷却至室温。以纯水为空白对照，530 nm 下测吸光度值。以褐藻酸钠对照品浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。

4、试样的测定

移取 0.5 mL 待测样液，分别加入硫酸-硼砂试剂（10.2.2）3 mL，振荡均匀后于沸水浴中反应 10 min，快速冷却至室温。加入呋唑试剂（10.2.3）0.1 mL，振荡均匀后于沸水浴中反应 10 min，快速冷却至室温。以纯水为空白对照，530 nm 下

测吸光度值，按照上述标准曲线测定方法进行测定，并根据标准曲线计算含量。

5、结果计算

以褐藻酸钠对照品溶液的浓度对其相应的吸光度值作直线回归（相关系数应不低于0.99），由直线回归方程计算待测样品的浓度（c2），再按公式计算待测样品中褐藻酸寡糖含量。

褐藻酸寡糖含量（%）= $\frac{C2 \times 1000}{m2} \times 100\%$

对不同来源的褐藻酸寡糖，采用分光光度法的检测结果如表 2 所示：

表 2 分光光度法标准曲线

编号	浓度 mg/mL	吸光度
1	0	0.011
2	0.01	0.076
3	0.02	0.1404
4	0.04	0.2758
5	0.06	0.4185
6	0.08	0.5574
7	0.1	0.6976
回归曲线	$y = 6.7138x + 0.0059$	
相关系数	$R^2 = 0.9998$	

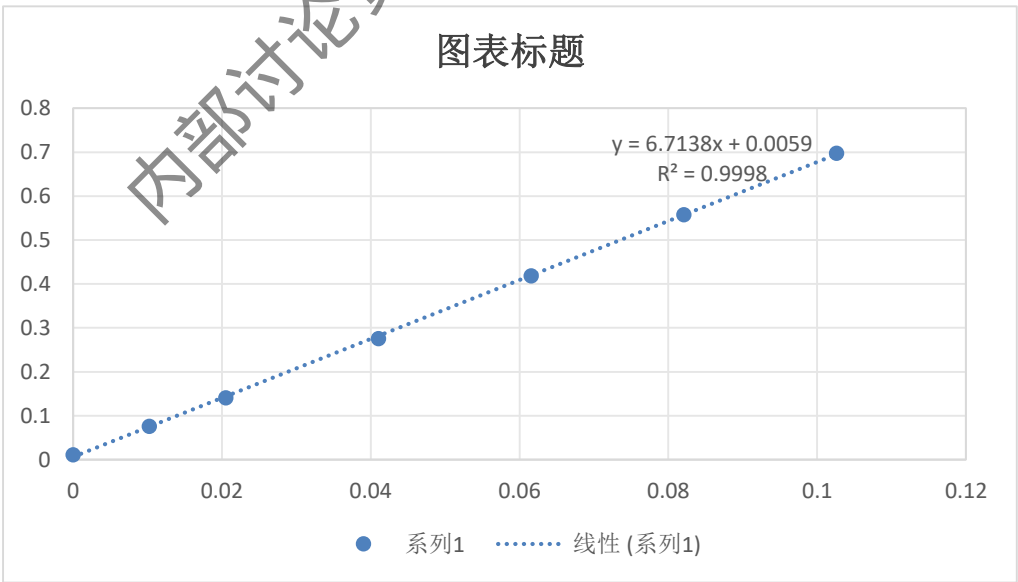


图 1 分光光度法标准曲线图

表 3 分光光度法样品检测结果

	取样量 (mg)	吸光度	含量 (%)	平均值(%)
样品 1	60.8	0.3749	90.75	91.08±0.39
	60.2	0.3743	91.51	
	60.6	0.3746	90.99	
样品 2	60.3	0.3961	96.68	96.51±0.48
	60.7	0.3996	96.89	
	60.3	0.3932	95.97	
样品 3	60.5	0.3511	85.41	85.40±0.13
	60.8	0.3522	85.26	
	60.2	0.3498	85.52	

四、标准中涉及专利的情况

本标准中没有涉及专利的情况。

五、预期达到的社会效益、对产业发展的作用的情况

褐藻酸寡糖作为饲料添加剂，具有提高动物免疫力、降低饲料用量、提高饲料转化率、提高动物生产性能和产品品质的功效，具有良好的抗生素替代的应用前景。随着全球畜牧养殖技术的不断提高，1999～2013 年世界动物保健产品的市场发展需求持续发展。从全球市场需求看，各种动物的份额大致分为牛羊、猪禽、宠物及其它动物三大类，各占 1/3。随着联合国对绿色养殖的倡导和对抗生素等药物的限制使用，褐藻酸寡糖会越来越广泛地被应用到动物保健品和饲料工业中。

然而，我国尚未确立统一的褐藻酸寡糖质量技术标准，目前关于褐藻酸寡糖的含量测定标准，只有辽宁省地方标准 DB21/T2598—2016《褐藻酸寡糖含量的检测》。该检测方法对照品采用的是半乳糖醛酸，与褐藻酸寡糖的结构组成不一致，对于褐藻寡糖产品检测存在巨大的误差，严重制约了褐藻酸寡糖的应用和行业发展。褐藻酸寡糖行业迫切需要建立相关的质量保障技术标准体系，统一规范产品质量和提高检测整体技术水平，保障产品的质量安全，规范市场秩序，维护有序竞争。

六、采用国际标准和国外先进标准情况，与国际、国外同类标准水平的对比情况，国内外关键指标对比分析或与测试的国外样品、样机的相关数据对比情况

目前为止，暂未查询到褐藻酸寡糖含量检测方面的国际及国外标准，属于国际领先水平。

七、在标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性

本标准属于团体标准，与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和相关标准不矛盾。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准未产生重大分歧意见。

九、标准性质的建议说明

本标准为中国标准化协会标准，属于团体标准，供协会会员和社会自愿使用。

十、贯彻标准的要求和措施建议

本标准为首次发布。

十一、废止现行相关标准的建议

本标准为新起草的团体标准，无废止现行标准。

十二、其他应予说明的事项

无

内部讨论资料，严禁非授权使用