

《海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法》国家标准

编制说明

中国海洋大学
二零二一年二月

目 录

1 任务来源.....	4
2 标准目的和意义.....	4
2.1 海参相关产品质量控制的需要.....	4
2.2 完善国家标准的需要.....	5
2.3 维护消费者权益的需要.....	5
2.4 应对国际贸易的需要.....	5
2.5 统一检测方法的需要.....	5
2.6 完善国家标准的需要.....	5
3 海参多糖研究现状.....	5
4 标准主要起草过程.....	7
4.1 标准制定工作组的成立.....	7
4.2 工作计划和标准制定原则的确定.....	7
4.3 国内外相关标准和文献的检索.....	7
4.4 标准方法的建立.....	8
4.5 标准草案的形成.....	8
4.6 标准讨论稿和标准说明的形成.....	9
4.7 标准征求意见稿和编制说明的形成.....	9
4.8 方法验证.....	9
5 本标准与国内外分析方法的关系.....	9
6 本标准主要技术指标的依据与说明.....	10
6.1 标准名称.....	10
6.2 前言.....	10
6.3 主体内容.....	10
6.4 “范围”的界定.....	10
6.5 检测方法的原理.....	11
6.6 方法主要技术参数确定依据.....	11
6.6.1 海参硫酸软骨素分离方法的确定.....	11
6.6.2 水解条件的确定.....	11
6.6.3 色谱条件的确定.....	13

6.6.4 质量转换系数 K 的确定.....	14
6.6.5 样品测定.....	16
6.7 方法验证.....	17
6.7.1 实验室内试验数据分析.....	17
6.7.2 实验室间验证数据分析.....	19
7 采用国际标准和国外先进标准程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况.....	21
8 与现行法律、法规和强制性标准的关系.....	22
9 标准作为强制性或推荐性标准的意见.....	22
10 实施标准的建议.....	22
11 废止或替代现行有关标准文件的建议.....	22
12 参考文献.....	22

国家标准

《海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法》

编制说明

1 任务来源

本国家标准的制定任务是根据国家标准化管理委员会下达的国家标准制定计划《海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法》项目（计划号为 20205073-T-424）起草。本项目为 2017 年国家重点研发计划 NQI 项目《主要农业废弃物提取加工与功效评价标准研究》

（2017YFF0207800）中一个任务。国家标准计划《海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法》由中国海洋大学上报，中国标准化研究院归口上报及执行，主管部门为国家市场监督管理总局。本标准由中国海洋大学、中国标准化研究院、大连棒棰岛海产股份有限公司、山东好当家海洋发展股份有限公司、大连獐子岛渔业集团股份有限公司、山东东方海洋科技股份有限公司、中国水产科学院黄海水产研究所共同起草。本标准主要起草人：王静凤、薛长湖、樊燕。

2 标准目的和意义

2.1 海参相关产品质量控制的需要

海参(sea cucumber)，属棘皮动物门(Echinodermata)，海参纲(Holothurioider)，是棘皮动物中经济价值最大的一纲。全世界海参约有 1100 多种，我国有 100 多种，可供食用的有 20 多种，其中以仿刺参的品质和口感最佳。海参含有蛋白质、多糖、微量元素和维生素等多种营养物质，已经作为功能食品而被引起关注。更重要的是，它们含有大量的生物活性物质如海参皂甙、粘多糖和胶原蛋白等，具有潜在的医药应用价值。

随着人们生活水平的提高，与海参相关的食品、保健品和药品日益成为市场消费的热点和主流。2019 年海参产值达 600 亿元。市售海参产品种类繁多，干海参（淡干、盐干、冻干）、海参口服液、海参胶囊、海参酒、海参牛奶充斥市场，名产品牌效应日益突显。为改善产品良莠不齐，避免以次充好的现象出现，保证海参产品安全，建立控制体系显得尤为必要。

海参多糖作为主要的活性成分，其含量对其食用及药用价值影响很大，是不可或缺的海参营养评价指标。海参中多糖类化合物结构复杂，且因海参种类和生长环境的不同而有差别。不同种类海参中的多糖结构不同，而不同产地的同种海参中海参岩藻聚糖硫酸酯（SC-FUC）和海参硫酸软骨素（SC-CHS）的含量也不尽相同。另外，海参中蛋白质、多糖、脂肪、微量元素等复杂成分的存在，会给海参多糖的测定带来很多困难，采用简单的分光光度法或称重

法很难满足以海参多糖为评价指标建立海参制品质量标准的要求。因此，制订简单可信的海参多糖的检测方法标准具有十分重要的现实意义和紧迫性。

2.2 完善国家标准的需要

经查询，目前 ISO、AOAC 的相关标准中都没有海参与其制品中海参多糖含量测定方法的相关标准。而我国行业标准中有一项与之相关，为《刺参及其制品中海参多糖的测定 高效液相色谱法》(SC/T 3049-2015)，该标准针对刺参及其制品中海参多糖含量给出了明确的测定方法，并对该方法对刺参及其制品中海参多糖的检出限和定量限进行了说明。

2.3 维护消费者权益的需要

海参富含糖蛋白、酸性多糖、海参皂甙、神经节苷酯等多种生物活性物质，因具有抗肿瘤、抗凝血、降血脂、消除疲劳，提高免疫力等功效，已成为一种深受大众喜爱的时尚消费品。目前市场上的海参，每斤少则 1000 多元，多则数千元不等，价格差异较大。由于检验方法标准的滞后，海参的优劣只能从一些外观指标上评判。目前市场上销售的各类海参制品，往往不能从外观判断其中海参含量到底有多少。为了维护消费者的合法权益，制订有效的海参多糖检测方法标准是非常必要的。

2.4 应对国际贸易的需要

海参是全球华人喜爱的食品，东南亚是海参的主要市场，消费量占全球的 90% 左右。海参由于其品种和生长水域的不同，其营养成分和活性成分的含量也大不相同，黄渤海域出产的日本刺参品质优良，我国亦是海参生产和进出口大国，为了保证进出口产品的质量，制订与国际标准水平相当的检测方法标准是非常必要的。

2.5 统一检测方法的需要

我国尚未确定对海参多糖的检测方法的国家标准或行业标准，目前多糖的检测方法，无法实现对海参与其制品中海参多糖准确的定性和定量分析，为了做到科学、准确地测定海参多糖的含量，制订一个统一的检测方法标准是非常必要的。

2.6 完善国家标准的需要

中国海参市场已经全面成型，海参消费正在从北方扩展到南方，直至到全国市场。但海参品种之间、营养价值之间均有较大差别，而我国现有的海参多糖检测方法存在较大的局限性，也不能满足复杂海参制品中海参多糖的检测需要。因此，制订海参多糖的检测方法也是完善食品检测方法国家标准的需要。

3 海参多糖研究现状

海参多糖是海参体内一种重要的生物活性物质。研究发现存在于海参体壁的多糖主要分

两类：一类为岩藻糖基化的海参硫酸软骨素（SC-CHS），是由 D-N-乙酰氨基半乳糖、D-葡萄糖醛酸和 L-岩藻糖组成的分支杂多糖，相对分子质量为 4 万-5 万；另一类为海参岩藻多糖（SC-FUC），是由 L-岩藻糖所构成的直链多糖，相对分子质量为 8 万-10 万。两者的组成糖基虽不同，但糖链上都有部分羟基发生硫酸酯化，并且硫酸酯基类多糖含量均在 32%左右，两种海参多糖的特殊结构，均为海参所特有。

海参中多糖类化合物结构复杂，且因海参种类和生长环境的不同而有差别。不同种类海参中的多糖结构不同，而同种海参中海参硫酸软骨素（SC-CHS）和海参岩藻聚糖硫酸酯（SC-FUC）的含量也不尽相同。另外，海参中还含有大量的蛋白质、脂肪、微量元素等复杂成分，必然会给海参中总多糖的测定带来很多困难。随着人们生活水平的提高，与海参相关的食品、保健品和药品日益成为市场消费的热点和主流。海参多糖作为主要的活性成分，其含量对其食用及药用价值影响很大，是不可或缺的海参营养评价指标。市面上目前的海参品种复杂，而采用简单的分光光度法或称重法很难满足以海参多糖为评价指标建立海参制品质量标准的要求。因此迫切需要建立一种简便可信的海参多糖测定方法。

已有的关于多糖含量的测定方法，如“测定海参多糖含量的方法”，对于海参样品经碱溶，超声提取，二次醇沉等步骤，最后对样品干燥至恒重后测得多糖含量，该方法对目标测定物的选择性不强，样品中的杂质如盐、微量元素、蛋白质等成分易引起较大的测定误差，易给测定结果带来进一步的误差，且不适合添加了海参或海参酶解物的样品中海参多糖含量的测定；“测定芦荟多糖的新方法”采用了分光光度法测定了芦荟多糖，具有较好的重复性和精密性，然而因为海参多糖中含有葡萄糖醛酸和氨基糖，二者在该种方法中不显色，所以也不适合海参多糖含量的测定；董平等采用以岩藻聚糖硫酸酯（Fucoidan）作为标准品，采用次甲基兰法测定了海参多糖的含量，结果表明，该法能够应用于测定海参多糖的含量，但是由于海参多糖同时含有岩藻聚糖硫酸酯和硫酸软骨素，而且两者与次甲基兰结合后的显色强度不同，因此难以以单一多糖作为显色标准品，且分光光度法本身存在一定的误差，易受溶液中色素、皂苷等其他杂质的影响，只适合比较纯的样品的多糖含量测定，不适合成分较复杂的海参制品中的多糖含量的测定。

近年来以高效液相色谱为基础的多糖的定量方法发展较快，如“一种多糖定量检测方法系统”灵敏准确，但对设备要求较高，且通常该方法适用于糖组成以中性糖含量为主的多糖。海参多糖中有较高含量的糖醛酸和氨基糖，用该方法不能够柱后显色。另外，海参多糖中两种糖的种间差异大，无法确定具体以何种多糖作为标准品进行分光光度或者液相色谱测定。文献表明，1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）可以修饰糖环的还原端，使其具有高度紫外吸

收，修饰糖能在反相高效液相色谱柱上得到很好的分离，并且衍生过程简便快捷，用于单糖组成测定非常有效，目前已有许多相关报道。

本方法采用 PMP-柱前衍生高效液相色谱法和岩藻糖对不同海参制品中海参总糖进行定量。岩藻糖是 SC-CHS 和 SC-FUC 中都存在的一种单糖，且同一种海参中岩藻糖占多糖总量的百分含量一定，因此同种海参中的多糖含量和岩藻糖含量之间存在固定的转换系数。岩藻糖衍生物在 254nm 有强吸收，并且能够与其他种类单糖较好分离，高效液相可以达到很好的分析定量效果。而葡萄糖醛酸亦可以作为海参鉴定海参多糖的一个重要指标。因此能够以本方法为基础，建立以海参多糖为指标的海参产品的质量评价体系。

4 标准主要起草过程

4.1 标准制定工作组的成立

国家重点研发项目立项后，2017 年 11 月 10 日在北京市西藏大厦召开了国家标准《海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法》第一次工作会。参加单位有中国海洋大学、中国标准化研究院、中国热带农业科学院分析测试中心等。会议成立了由中国海洋大学、中国标准化研究院、中国热带农业科学院分析测试中心等单位参加的标准工作组，主要由从事标准制修订、仪器分析、具有丰富技术经验的专业研究人员组成，工作组制定了初步的标准编制工作计划。

4.2 工作计划和标准制定原则的确定

按照工作任务要求，标准编制工作组制定了标准起草工作计划和任务分工。在充分研究与讨论的基础上，制定了标准制定原则：

- (1) 先进性：其准确度、精密度和灵敏度达到较高水平。
- (2) 适用性：要适应我国植物提取物产业发展的要求，满足植物提取物现代化的需要。
- (3) 可操作性：符合我国目前检测仪器设备和试剂、材料的供应条件。
- (4) 实用性：符合检测从业人员的技术水平，能被国内主要的环境分析实验室所使用并达到所规定的要求。要有利于提高农业废弃物综合利用，为植物提取物质量控制部门、有关企业 and 三农服务。

4.3 国内外相关标准和文献的检索

目前，CAC、AOAC、ISO 的相关标准中都没有海参与其制品中海参多糖测定方法的相关标准。现有的行业标准为“刺参及其制品中海参多糖的测定 高效液相色谱法（SC/T 3049-2015）”。在本行业标准中，仅仅标明了刺参中海参多糖的含量测定方法，未能有海参其他种类的测定方法。目前，市场中存在海地瓜、梅花参、黄海参、石参、黑参等产品，因而

不能满足现行标准的要求。现有的行业标准为“刺参及其制品中海参多糖的测定 高效液相色谱法（SC/T 3049-2015）”是本单位制定，具有操作较为简便、灵敏度高、稳定性好、分离效果好、适用范围广的优点。本方法可同时测定海参制品中葡萄糖醛酸的含量及各单糖的比例，可同时用于海参制品中海参多糖存在及实际添加量的辅助判定。但是，在本行业标准中，仅仅标明了刺参中海参多糖的含量测定方法，未能有海参其他种类的测定方法。目前，市场中存在海地瓜、梅花参、黄海参、石参、黑参等产品，因而不能满足现行标准的要求，迫切需要扩大本标准的适用范围和适用对象。本标准将适用范围和适用对象扩大升级后，将有利于维护消费者健康的需求、统一监测方法的需求、完善国家标准的需要、应对国际贸易的需求。

高效液相色谱-质谱法具有准确度高、精密度高、检出限与定量限低、操作简单等优点，因此确定采用液相色谱法检测海参中的海参多糖。以海参及其制品为样品，经过初步试验，证明方法是可行的。而后对方法进行优化，对方法进行验证，结果表明方法的准确性、回收率、精密度等方面都能达到国家可标准的要求，并且基本符合制定国家标准的条件，并于 2019 年向国家标准化管理委员会提出立项申请。

4.4 标准方法的建立

标准工作组按照计划任务书的要求，结合制定标准的要求，研究建立标准方法的实验方案，并进行方法前处理条件的选择、仪器条件的确定和方法精密度、准确度及检出限的测定等试验。

2018 年 3 月开始，标准起草工作组针对不同海域地区进行海参主产地进行调研，获取了大量相关信息与数据。原料样品采集后，开始开展实验室验证工作，建立海参及其制品中海参多糖的测定高效液相色谱法，包括线性范围、相关系数、加标回收率、准确度、精密度、检出限、定量限等，以及样品中海参多糖的提取条件的优化，如提取溶剂种类、提取溶剂体积、超声提取时间等。

4.5 标准草案的形成

标准起草工作组查阅、收集和整理了国内外有关研究进展和专利、标准、法规等文献资料，掌握了相关标准的现状；对文献中海参多糖测定方法进行了对比和总结，为标准文本的编制奠定理论基础。在《海参及其制品中海参多糖的测定 高效液相色谱法》国家标准第一次起草工作会议的基础上，起草工作组相关单位共同讨论起草形成了《海参及其制品中海参多糖的测定 高效液相色谱法》国家标准的技术框架和主要内容，初步形成了《海参及其制品中海参多糖的测定 高效液相色谱法》标准草案。

4.6 标准讨论稿和标准说明的形成

2019 年 7 月 5 日，起草工作组组织相关单位和专家，在山东青岛中国科学院兰州化学物理研究所召开第二次标准起草工作会。参会单位包括中国海洋大学、中国标准化研究院、中国科学院兰州化学物理研究所、浙江大学、中国热带农业科学院分析测试中心等。

与会专家对《海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法》标准草案的英文名称、范围、术语和定义、基本要求、主要技术指标、附录等章条逐一进行了修改，会后根据修改意见形成了《海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法》标准讨论稿及其编制说明。

4.7 标准征求意见稿和编制说明的形成

在前期工作的基础上，起草工作组组织相关单位和专家于 2019 年 10 月 22 日在北京中国标准化研究院召开第三次标准起草工作会。参会单位包括中国海洋大学、中国热带农业科学院、中国标准化研究院、浙江大学等。与会成员认真讨论《海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法》标准讨论稿后，根据讨论结果修改形成了《海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法》征求意见稿及编制说明。会议同时讨论了下一阶段征求意见的单位和专家名单。

4.8 方法验证

2020 年 9~11 月，对“海参及其制品中海参多糖的测定 高效液相色谱法”进行验证。参加本标准征求意见稿方法验证的三个实验室，分别属于国家水产品质量监督检验中心（中国水产科学研究院黄海水产研究所）、农业部渔业产品质量监督检验测试中心（烟台）、青岛市产品质量监督检验所，均通过了“双认证（计量认证/审查认可）”评审或复审，具备进行本标准项目验证工作的条件。通过统计检验技术确认外部实验室试验结果的准确性。

5 本标准与国内外分析方法的关系

本标准研究旨在建立一项满足我国海参及其制品中海参多糖检测的要求，在质量控制目标和技术手段上，适应我国大部分质控实验室仪器设备和技术能力的检测方法标准。通过查阅国内外相关文献资料，制定条件优化方案，确保本方法前处理所采用的装置操作简便，能够满足国内实验室的条件要求。本标准拟采用高效液相色谱法测定海参多糖。样品的前处理，即对提取时间、提取溶剂种类、提取次数等因素进行优化。检测方法在稳定、可靠和实用的基础上，达到国际先进水平，以适应我国海参及其制品中海参多糖含量检测、质控与管理的需要。

目前已有很多关于多糖含量测定方法的专利申请及文献报道，如专利申请号为 200410036250.7 的“测定海参多糖含量的方法”，该方法对于海参样品经碱溶，超声提取，二次醇沉等步骤，最后将样品干燥至恒重后测得多糖含量，但该方法对目标测定物的选择性不

强，样品中的杂质如盐、微量元素、蛋白质等成分易引起较大的测定误差，且不适合海参制品中海参多糖含量的测定；专利申请号为 200410052907.9 的“一种多糖定量检测方法与系统”，该方法灵敏准确，但对设备要求较高，而且该方法通常适用于以中性糖含量为主的多糖，海参多糖中含有较高含量的糖醛酸和氨基糖，用该方法不能够柱后显色。另外，也有文献报道采用分光光度法测定海参多糖含量，以岩藻聚糖硫酸酯作为标准品，采用次甲基兰显色法测定了海参多糖的含量，结果表明，该法能够应用于测定海参多糖的含量，但是由于海参多糖同时含有海参岩藻聚糖硫酸酯和海参硫酸软骨素两种组分，而且两者与次甲基兰结合后的显色强度不同，因此难以以单一多糖作为显色标准品，且分光光度法本身存在一定的误差，易受溶液中色素等其他杂质的影响，只适合比较纯的样品的多糖含量测定，不适合成分较复杂的海参制品中的多糖含量的测定。最重要是以上方法都不能很好排除市场上的掺假掺杂现象，因此准确性难以保证。

本标准方法的优点在于：（1）灵敏度高，岩藻糖衍生物在 254 nm 有很强的吸收，浓度为 8.0×10^{-4} mg/mL 时即可实现定量检测。（2）稳定性好，24 小时内岩藻糖衍生物峰面积稳定， $RSD \leq 5\%$ 。（3）分离效果好，在此高效液相色谱条件下，岩藻糖能够与其它单糖明显分离，有效避免其它单糖对岩藻糖的检测带来的干扰，实现准确定量。（4）适用范围较广，可应用于固态、液态等多种刺参制品中海参多糖含量的测定。（5）本方法能有效排除市场上向刺参制品中掺入其它来源多糖而干扰海参多糖准确定量的问题。

6 本标准主要技术指标的依据与说明

6.1 标准名称

本标准主要解决海参及其制品中海参多糖含量测定的技术问题，所以将本标准的名称定为：《海参中海参多糖的含量测定 高效液相色谱法》，翻译为“Determination of sea cucumber polysaccharides in sea cucumber -High performance liquid chromatography”。

6.2 前言

明确了本标准的归口单位及主要起草单位、起草人。

6.3 主体内容

标准的主体内容包括：范围、规范性引用文件、原理、试剂、仪器和设备、测定步骤、结果计算与表示、精密度和回收率等。

6.4 “范围”的界定

本标准规定了海参与以海参为原料加工而成的干海参、即食海参、胶囊、浆液等深加工制品中海参多糖含量的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于海参与以海参与其制品中海参多糖含量的测定。

6.5 检测方法的原理

海参多糖(sea cucumber polysaccharides)包含海参岩藻聚糖硫酸酯(sea cucumber fucoidan, SC-FUC)和海参硫酸软骨素(sea cucumber chondroitin sulfate, SC-CHS)两种成分。在同一种海参与海参岩藻聚糖硫酸酯和海参硫酸软骨素的比例基本恒定。海参硫酸软骨素,是一种具有岩藻糖支链的硫酸化多糖,主要由 D-乙酰氨基半乳糖、D-葡萄糖醛酸和 L-岩藻糖构成。同一海参与海参多糖组成的特定性以及海参硫酸软骨素结构的特定性,决定了海参多糖与海参硫酸软骨素中含有的岩藻糖之间存在固定的质量转换系数,通过高效液相色谱法测定得到海参硫酸软骨素中岩藻糖含量后可按照公式 $C=C_{\text{Fuc}}\times K$ (K 为质量转换系数)计算得出海参多糖的含量。

海参硫酸软骨素与其它来源硫酸软骨素结构存在明显差异,其具备岩藻糖基化的特定结构。本标准利用乙酸钾沉淀法沉淀得到供试样品中海参硫酸软骨素组分,有效避免各种掺假掺杂干扰,可准确的测定出刺参及其相关制品中海参多糖含量。1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)可以修饰糖环的还原端,使其具有高度紫外吸收,修饰糖能在反相高效液相色谱柱上得到很好的分离,并且衍生过程简便快捷,用于单糖组成测定非常有效。岩藻糖衍生物在 254 nm 有强吸收,并且在实验色谱条件下能够与其他种类单糖较好分离,高效液相可以达到很好的分析定量效果。

6.6 方法主要技术参数确定依据

6.6.1 海参硫酸软骨素分离方法的确定

本方法通过测定供试样品所含有的海参硫酸软骨素中岩藻糖的含量,经质量转换系数 K 换算得到海参多糖含量。乙酸钾可专一沉淀出供试样品多糖酶解液中的硫酸软骨素组分,使其与岩藻聚糖硫酸酯分离。J.E.Scott 曾经用乙酸钾沉淀出哺乳动物的肝素。衡阳医学院生化教研室的萧惠连证明类肝素也可用乙酸钾沉淀得到。因肝素或非海参来源的类肝素物质中并不含有岩藻糖,故其沉淀后并不影响海参硫酸软骨素中岩藻糖的定量。通过实验证明,乙酸钾浓度达到 2.5 mol/L 时可保证样品中海参硫酸软骨素组分的完全沉淀,而不影响岩藻聚糖硫酸酯等其它多糖的溶解性。故本标准中分离供试样品海参硫酸软骨素组分的条件确定为 2.5 mol/L 乙酸钾溶液。

6.6.2 水解条件的确定

将鲜参去肠腺,灰嘴,剪成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,70 °C 烘干 12 h,小型粉碎机粉碎,混匀。准确称取 (1.00 ± 0.05 g) 刺参粉,置于 50mL 三角瓶中,加入 25 mL 0.1 mol/L pH6.0

乙酸钠缓冲液、100 mg 木瓜蛋白酶、37 mg 乙二胺四乙酸和 22 mg 半胱氨酸盐酸盐，涡旋混合，60 °C 恒温水浴振荡反应 24 h，将酶解液转移入 50 mL 离心管，于 9 000 rpm 离心 10 min。弃去沉淀，上清液转移至另一 50 mL 离心管中，加入 1.6 mL 10 % 的氯化十六烷基吡啶溶液，涡旋混合，室温放置 24 h，于 9 000 rpm 离心 10 min。弃去上清液，沉淀溶解于 25 mL 蒸馏水中，再加入 6.13 g 乙酸钾，涡旋混合，超声至乙酸钾完全溶解，4 °C 放置 24 h，于 9 000 rpm 离心 10 min。沉淀分别用 25 mL 80 % 乙醇溶液和 95 % 乙醇溶液洗两次，最后将沉淀于 60 °C 干燥 2 h，用适量蒸馏水溶解，用截流分子量为 6 kDa 的真空纤维膜超滤并脱盐，浓缩，冻干，得到刺参海参硫酸软骨素。

准确称取 2 mg 海参硫酸软骨素样品于 5 mL 安培瓶中，分别加入 1 mL 2 mol/L 三氟乙酸溶液，1 mL 2 mol/L 硫酸溶液，1 mL 2 mol/L 三氟乙酸和 2 mol/L 硫酸等体积混合溶液，充氮封管，分别于 110 °C 水解反应 4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h，70 °C 下氮气吹干，以 2 mL 超纯水超声溶解残余物，用 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液调节单糖水解液至 pH 为 7.0 后转移入 5 mL 容量瓶，稀释至刻度，即得刺参硫酸软骨素水解液。准确移取海参硫酸软骨素水解液 400 μ L 于 10 mL 具塞试管中，加入 50 μ L 2 mmol/L 乳糖溶液，450 μ L 0.5 mol/L 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP)-甲醇溶液和 450 μ L 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液，涡旋混合均匀后于 70 °C 水浴反应 30 min，取出冷却至室温，加入 450 μ L 0.3 mol/L 盐酸溶液，涡旋混合。加 1 mL 三氯甲烷，充分振荡，静置分层，吸弃下层三氯甲烷层，按上述方法用三氯甲烷重复萃取 3 次。将上层水相过 0.45 μ m 滤膜，供高效液相色谱分析。

不同酸与不同水解时间对刺参海参硫酸软骨素水解程度及单糖检测的影响结果见图 1，图 2，图 3。

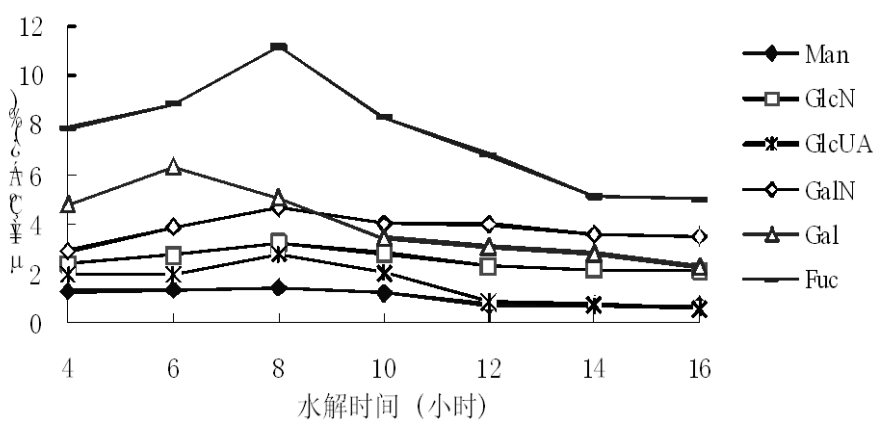


图 1 刺参海参硫酸软骨素 2 mol/L 三氟乙酸水解作用图

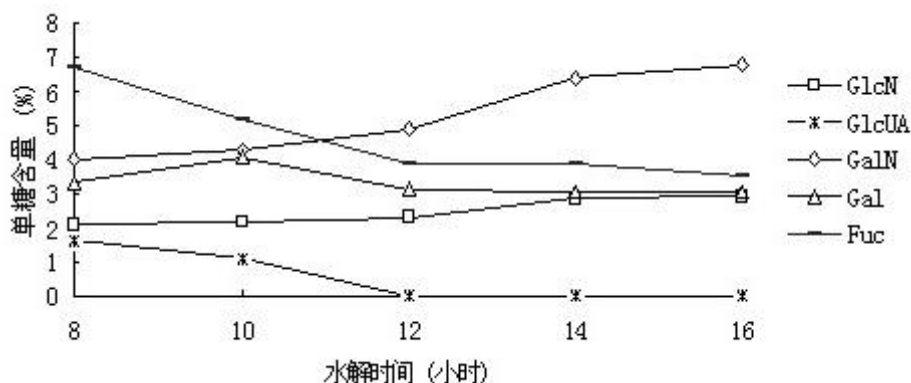


图 2 刺参海参硫酸软骨素 2 mol/L 硫酸水解作用图

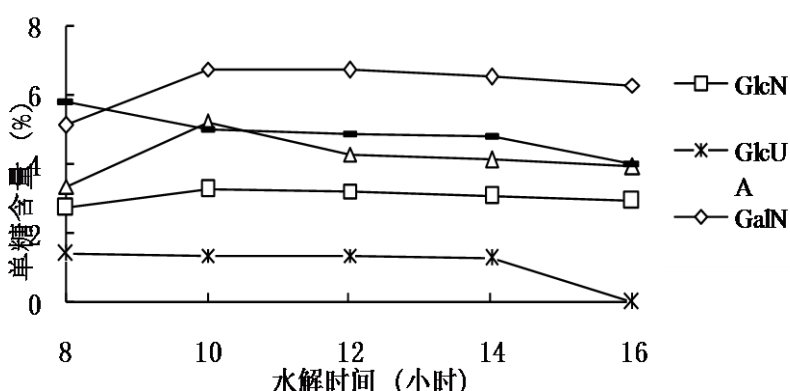


图 3 刺参海参硫酸软骨素 2 mol/L 混酸水解作用图

不同条件下，单糖水解情况变化很大。氨基葡萄糖（GlcN）、葡萄糖醛酸（GlcUA）、氨基半乳糖（GalN）、半乳糖（Gal）和岩藻糖（Fuc）在三种条件下都能水解释放出来，而甘露糖（Man）只能在 2 mol/L 三氟乙酸溶液的作用条件下水解释放出来。除半乳糖（Gal）在 2 mol/L 三氟乙酸溶液作用 6 h 后达到最大值外，其余单糖都是在 2 mol/L 三氟乙酸溶液作用 8 h 后达到最高含量。故确定水解条件为：2 mol/L 三氟乙酸溶液，110 °C，8 h。

6.6.3 色谱条件的确定

在实验中发现用水和乙腈做流动相不能达到完全分离，而且峰拖尾、谱带扩展严重，这是因为经 PMP 衍生化后的糖类是易离解的弱碱性有机物，C₁₈ 柱固定相中的键合相表面残存的硅羟基与碱的阴离子有亲和力，所以会引起峰形拖尾并干扰分离。当加入了磷酸盐缓冲液后，盐效应减弱了残存的硅羟基的干扰作用，抑制峰形拖尾并改善分离效果，使用 pH6.9 的磷酸盐缓冲液，单糖衍生物的峰形和分离效果良好。乙腈比例影响分离效果，乙腈比例降低，出峰时间延长。实验确定色谱条件为：色谱柱：XDB-C₁₈，5 μm，250 mm×4.6 mm（内径）或相当者；柱温：25 °C；检测波长：254 nm；进样量：20 μL；流速：1.0 mL/min；流动相：A：0.05 mol/L pH6.9 磷酸盐缓冲液磷酸盐-乙腈（85:15，v/v）溶液，B：0.05 mol/L pH6.9 磷

酸盐缓冲液磷酸盐-乙腈（60:40，v/v）溶液；梯度洗脱程序：0→10 min→40 min→45 min， B 0→8 %→37 %→0。

在实验确定梯度洗脱条件下，溶剂峰与 PMP 的出峰时间均超前于单糖衍生物峰，不会对分析结果造成影响，同时，各单糖可以得到有效分离，有效避免其它单糖对岩藻糖的检测带来的干扰，见图 4。

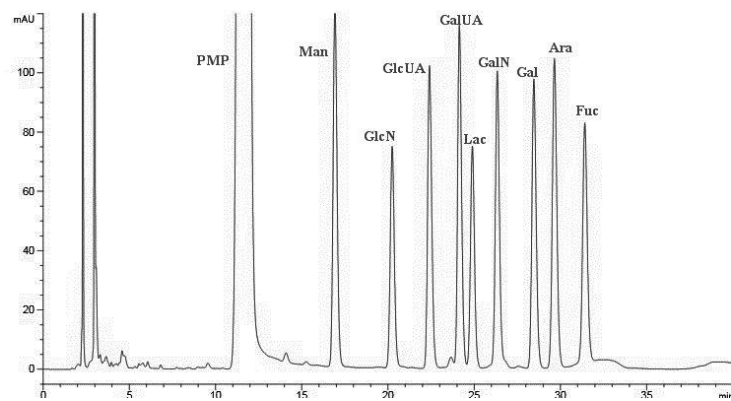


图 4 单糖混合标准溶液衍生物液相色谱图

6.6.4 质量转换系数K的确定

6.6.4.1 不同产地海参中海参多糖含量的测定

选取中国沿海 6 个不同产地的刺参作为研究对象，每个产地采样 8 个。将鲜刺参去肠腺，灰嘴，剪成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块，70 °C 烘干 12 h，小型粉碎机粉碎，混匀。准确称取（1.00 ± 0.05 g）刺参粉，置于 50 mL 三角瓶中，加入 25 mL 0.1 mol/L pH6.0 乙酸钠缓冲液、100 mg 木瓜蛋白酶、37 mg 乙二胺四乙酸和 22 mg 半胱氨酸盐酸盐，涡旋混合，60 °C 恒温水浴振荡反应 24 h，将酶解液全部转移至 50 mL 离心管中，于 9 000 rpm 离心 10 min。弃去沉淀，上清液转移至另一 50 mL 离心管中，加入 1.6 mL 10 % 的氯化十六烷基吡啶溶液，涡旋混合，室温放置 24 h，于 9 000 rpm 离心 10 min。弃去上清液，沉淀溶解于 25 mL 蒸馏水中，再加入 75 mL 无水乙醇，涡旋混合，4 °C 放置 24 h，于 9 000 rpm 离心 10 min。沉淀分别用 25 mL 80 % 乙醇溶液和 95 % 乙醇溶液洗两次，最后将沉淀于 60 °C 干燥 2 h，蒸馏水溶解，用截流分子量为 6 kDa 的真空纤维膜超滤并脱盐，浓缩，冻干，得到海参多糖并称重，详见表 1。

6.6.4.2 不同产地刺参海参硫酸软骨素中岩藻糖含量的测定

准确称取（1.00 ± 0.05 g）试样，置于 50 mL 三角瓶中，加入 25 mL 0.1 mol/L pH6.0 乙酸钠缓冲液，加入 100 mg 木瓜蛋白酶、37 mg 乙二胺四乙酸和 22 mg 半胱氨酸盐酸盐，涡旋混合，60 °C 恒温水浴振荡酶解 24 h，将酶解液全部转移至 50 mL 离心管中，于 9 000 rpm 离心 10 min。

弃去沉淀，上清液转移至50 mL烧杯中，加入6.13 g乙酸钾，涡旋混合，超声至乙酸钾完全溶解，于4 ℃静置12 h后转移至另一50 mL离心管，于9 000 rpm离心10 min，弃去上清液，沉淀用5 mL蒸馏水超声溶解后转移至10 mL容量瓶，用蒸馏水稀释至刻度，即得海参硫酸软骨素溶液。取1 mL海参硫酸软骨素溶液于5 mL安培瓶中，加入1 mL 4 mol/L三氟乙酸溶液，充氮封管，110 ℃水解8 h后，于70 ℃氮气吹干，加2 mL蒸馏水超声溶解残余物，用0.3 mol/L氢氧化钠溶液调节水解液pH至6.5~7.5后转移入5 mL容量瓶中，用蒸馏水稀释至刻度，即得海参硫酸软骨素水解液。准确移取400 μ L海参硫酸软骨素水解液于10 mL具塞试管中，加入50 μ L 2 mmol/L乳糖溶液，450 μ L 0.5 mol/L 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮-甲醇溶液，450 μ L 0.3 mol/L氢氧化钠溶液，涡旋混合，70 ℃水浴反应30 min，取出冷却至室温，加450 μ L 0.3 mol/L盐酸溶液，涡旋混合。加1 mL三氯甲烷，充分振荡，静置分层，吸弃下层三氯甲烷层，按上述方法用三氯甲烷重复萃取3次。将上层水相过0.45 μ m滤膜，经高效液相色谱法测定得到刺参中海参硫酸软骨素所含岩藻糖含量，详见表1。

6.6.4.3 质量转换系数K的确定

根据6.6.3.4.1和6.6.4.2测定的刺参中海参多糖含量及其海参硫酸软骨素中岩藻糖的含量计算得到质量转换系数K=20.0，详见表1。

表 1 质量转换系数K的确定

刺参取 样地	序号	海参多糖含量 mg/g	HPLC法测定海参硫酸软骨素 中岩藻糖含量 mg/g	质量转换 系数 K	平均值	质量转换 系数 K
辽宁 盘锦	1	105.932	5.395	19.64	19.43	20.00
	2	113.665	5.914	19.22		
	3	108.697	5.509	19.73		
	4	111.313	5.716	19.47		
	5	112.451	5.925	18.98		
	6	108.805	5.635	19.31		
	7	110.394	5.590	19.75		
	8	114.287	5.907	19.35		
山东 烟台 牟平	1	98.932	4.965	19.93	20.06	
	2	101.665	5.063	20.08		
	3	98.697	5.019	19.66		
	4	98.313	4.896	20.08		
	5	97.451	4.927	19.78		
	6	97.805	4.935	19.82		
	7	98.394	4.851	20.28		
	8	102.287	4.907	20.85		

山东 蓬莱	1	89.534	4.345	20.61	19.85
	2	87.528	4.368	20.04	
	3	91.904	4.731	19.43	
	4	84.575	4.219	20.05	
	5	90.254	4.605	19.60	
	6	88.033	4.515	19.50	
	7	95.265	4.773	19.96	
	8	87.381	4.452	19.63	
辽宁 大连	1	104.382	5.229	19.96	19.94
	2	105.137	5.313	19.79	
	3	97.603	4.787	20.39	
	4	100.731	5.174	19.47	
	5	96.467	4.890	19.73	
	6	98.756	4.973	19.86	
	7	103.320	5.102	20.25	
	8	101.952	5.085	20.05	
山东 威海	1	94.425	4.801	19.67	20.09
	2	91.391	4.532	20.17	
	3	95.718	4.766	20.08	
	4	96.486	4.839	19.94	
	5	92.753	4.664	19.89	
	6	95.052	4.605	20.64	
	7	90.968	4.475	20.33	
	8	94.316	4.715	20.00	
浙江 温州	1	73.532	3.485	21.10	20.61
	2	83.951	4.118	20.39	
	3	74.808	3.617	20.68	
	4	75.860	3.689	20.56	
	5	76.204	3.806	20.02	
	6	83.795	3.975	21.08	
	7	79.630	3.862	20.62	
	8	81.417	3.990	20.41	

6.6.5 样品测定

6.6.5.1 试样制备

鲜参去肠腺，灰嘴，剪成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小块，70 ℃ 烘干 12 h，粉碎，过 10 目筛，混匀备用；干刺参，粉碎，过 10 目筛，混匀备用；即食刺参，剪成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小块，

70 °C烘干 12 h, 粉碎, 过 10 目筛, 混匀备用; 胶囊, 取内容物混匀备用; 浆液, 混匀备用。

6.6.5.2 鲜参、干参、即食参、海参粉及参胶囊等固体制品

依照6.6.4.2所述方法对鲜刺参、干刺参、即食刺参及刺参胶囊等固体制品进行前处理。

6.6.5.3 海参原浆液、海参口服液、海参酒、海参乳饮料等液体制品

准确移取25 mL试样, 加入25 mL 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液, 加入100 mg木瓜蛋白酶、73 mg 乙二胺四乙酸和44 mg半胱氨酸盐酸盐, 涡旋混合, 60 °C恒温水浴振荡酶解24 h, 将酶解液转移至50 mL离心管中, 于9 000 rpm离心10 min。弃去沉淀, 上清液经0.45 μm水膜过滤后转移至100 mL烧杯中, 加入12.27 g乙酸钾, 涡旋混合, 超声至乙酸钾完全溶解, 以下按6.6.4.2自“于 4 °C静置12 h.....”起依法操作。

6.7 方法验证

6.7.1 实验室内试验数据分析

6.7.1.1 线性关系及精密度

在实验确定色谱检测条件下, 以岩藻糖 (Fuc) 衍生物的峰面积与乳糖 (Lac) 衍生物的峰面积之比 (Y) 对岩藻糖 (Fuc) 相应浓度 (X) 绘制标准工作曲线, 线性良好。标准曲线方程: $Y=6.032X+0.2084$, $R^2 \geq 0.9984$, 线性范围为 5.0×10^{-3} mmol/L~6.0 mmol/L。

吸取1.8 mmol/L岩藻糖标准品溶液, 衍生后, 连续进样6次, 利用内标校正, 岩藻糖衍生物RSD=2.19%, 表明仪器精密度良好, 方法精密度符合要求。

6.7.1.2 重复性

六组岩藻糖标准品平行样 (1.2 mmol/L) 用同样的仪器和试剂于当天进行衍生测定。岩藻糖-PMP 衍生物 RSD=3.80%, 表明该方法对岩藻糖衍生物的检测重复性良好。

6.7.1.3 检出限和定量限

方法的检出限一般是根据信噪比外推得到, 然而由于基质干扰等因素的影响, 在进行实际样品测定时, 检出限通常很难实现。方法的测定低限是指在保证具有一定可靠性(准确度和精密度)的前提下, 分析方法能够测定出的样品中目标物的最低浓度。经测定得该方法岩藻糖衍生物的检出限 (R/N=3) 和定量限 (R/N=10) 分别为 1.0×10^{-3} mmol/L和 4.8×10^{-3} mmol/L。

6.7.1.4 稳定性

测定的24 h内, 岩藻糖衍生物的峰面积稳定, 其相对标准偏差 (RSD) 小于2.5%。表明该测定方法在24 h内是稳定的。

6.7.1.5 回收率

选取刺参粉和刺参口服液作为研究对象以考察低浓度 (0.05 mmol/L)、中浓度 (0.9

mmol/L) 和高浓度 (6.0 mmol/L) 三个水平的方法回收率。各浓度水平的加标回收率和相对标准差, 详见表 2 和表 3。

表 2 刺参粉加标回收率测定结果

样品	添加量 mmol/L	检测值 mmol/L	回收率%	平均回收率%	相对标准偏差%
1.	0.05	0.0415	83.0	78.9	4.50
2.		0.0390	77.9		
3.		0.0412	82.3		
4.		0.0369	73.7		
5.		0.0404	80.8		
6.		0.0382	76.4		
1.	0.9	0.824	91.5	92.2	4.31
2.		0.892	99.1		
3.		0.840	93.3		
4.		0.791	87.9		
5.		0.829	92.1		
6.		0.804	89.3		
1.	6.0	5.27	87.8	87.0	4.98
2.		5.08	84.6		
3.		4.78	79.7		
4.		5.41	90.2		
5.		5.51	91.8		
6.		5.27	87.9		

表 3 刺参口服液加标回收率测定结果

样品	添加量 mmol/L	检测值 mmol/L	回收率%	平均回收率%	相对标准偏差%
1	0.05	0.0423	84.5	88.9	4.95
2		0.0459	91.8		
3		0.0434	86.7		
4		0.0415	82.9		
5		0.0460	91.9		
6		0.0478	95.6		
1	0.9	0.832	92.4	94.8	4.82
2		0.845	93.9		
3		0.896	99.6		
4		0.781	86.8		
5		0.878	97.5		
6		0.888	98.7		
1	6.0	5.56	92.6	92.3	4.88
2		5.71	95.2		
3		5.56	92.6		
4		5.95	99.1		

5		5.39	89.8		
6		5.08	84.7		

6.7.1.6 变异系数

批内变异系数在 4.31 %~4.98 %之间；批间变异系数在 5.22 %~6.71 %之间，证明该方法精确性良好。

6.7.1.7 市售刺参制品中海参多糖的测定

对市售的具有代表性的刺参制品进行了方法适用性验证，色谱图见图 5~图 8，该方法能够实现对刺参制品中海参多糖的准确定量。

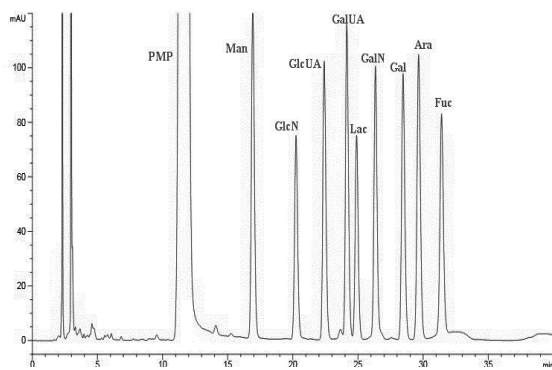


图 5 单糖混合标准溶液衍生液相色谱图

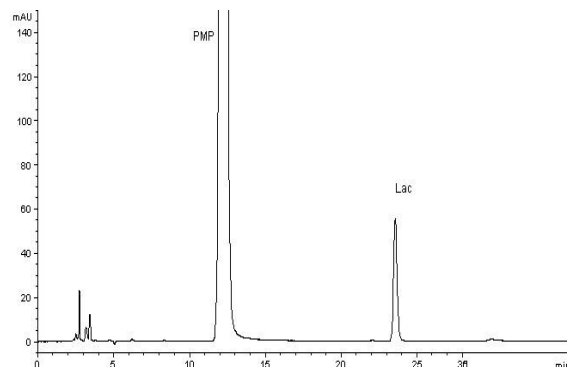


图 6 空白试样液相色谱图

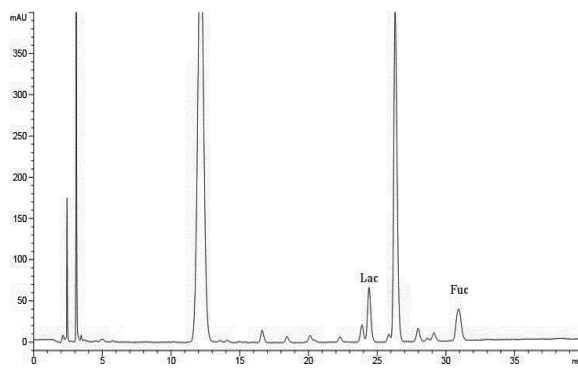


图 7 刺参口服液液相色谱图

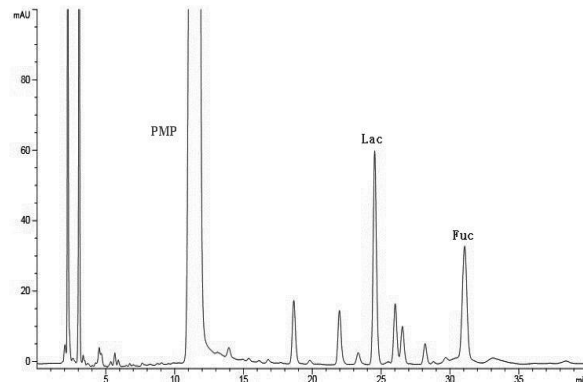


图 8 刺参粉液相色谱图

6.7.2 实验室间验证数据分析

国家水产品质量监督检验中心、农业部渔业产品质量监督检验测试中心（烟台）、青岛市产品质量监督检验所三家单位的液相色谱检测技术人员，按照上述测定步骤，参照上述色谱条件，用配有紫外检测器的高效液相色谱仪，分别进行了验证试验。验证结果见各自的验证试验报告，四个实验室的主要试验结果归纳如下：

6.7.2.1 线性范围

四家实验室测定岩藻糖的浓度线性范围见表 4，从表中可知，呈线性的浓度最低可至本

方法规定的 5.0×10^{-3} mmol/L，最高能达到本方法规定的 6.0 mmol/L。

表 4 岩藻糖测定的浓度线性范围、线性方程和相关系数

实验室	线性范围(mmol/L)	线性方程	相关系数	相关显著性水平	浓度点数
本实验室	$5.0 \times 10^{-3} \sim 6.0$	$Y=6.032X+0.21$	0.9984	< 0.01	10
国家水产品质量监督检验中心	$5.0 \times 10^{-3} \sim 6.0$	$Y=5.595X-0.17$	0.9995	< 0.01	10
农业部渔业产品质量监督检验测试中心（烟台）	$5.0 \times 10^{-3} \sim 6.0$	$Y=5.639X-0.28$	0.9986	< 0.01	10
青岛市产品质量监督检验所	$5.0 \times 10^{-3} \sim 6.0$	$Y=5.529X-0.34$	0.9998	< 0.01	10

6.7.2.2 检出限和定量限

高效液相色谱法一般以信噪比 ≥ 3 作为检出限，以信噪比 ≥ 10 作为定量限。四家实验室用本标准规定方法测定时，岩藻糖检出限均达到 1.2×10^{-3} mmol/L，定量限均达到 5.0×10^{-3} mmol/L（见表 5），符合本方法标准规定的检出限和定量限。

表 5 岩藻糖的检出限和定量限

实验室	检出限（mmol/L）	定量限（mmol/L）
本实验室	1.2×10^{-3}	5.0×10^{-3}
国家水产品质量监督检验中心	1.2×10^{-3}	5.0×10^{-3}
农业部渔业产品质量监督检验测试中心（烟台）	1.2×10^{-3}	5.0×10^{-3}
青岛市产品质量监督检验所	1.2×10^{-3}	5.0×10^{-3}

6.7.2.3 方法回收率

用刺参口服液做为本底，进行加标回收试验，添加三个水平的岩藻糖，即 0.05 mmol/L、0.9 mmol/L 和 6.0 mmol/L，每种试样每个添加量测六份。根据各实验室试验报告统计的加标回收率见表 6。从表 6 可见，用本方法测定岩藻糖三个加标水平的回收率最低为 71.9 %，最高为 104.7 %，符合检测方法标准的制定要求。

表 6 岩藻糖加标回收率（%）范围和平均值

实验室	加标水平（mmol/L）		
	0.05	0.9	6.0
本实验室	82.9~95.6 (88.9)	86.8~99.6 (94.8)	84.7~99.1 (92.3)
国家水产品质量监督 检验中心	71.9~83.6 (78.4)	87.9~104.7 (96.0)	76.1~91.5 (85.2)
农业部渔业产品质量 监督检验测试中心(烟 台)	74.9~84.2 (80.1)	90.0~96.0 (93.3)	81.7~90.4 (85.6)
青岛市产品质量监督 检验所	74.2~83.7 (78.7)	89.3~97.3 (93.2)	85.2~91.1 (86.7)

表 6 注：括号外为回收率范围，括号内为平均值。

6.7.2.4 变异系数

根据各实验室试验报告统计的变异系数见表 7。从表 7 可见，四个实验室采用本标准方法测定刺参口服液中海参与多糖含量的批内变异系数在 3.51 %~5.69 %之间，批间变异系数在 4.24 %~7.12 %之间，符合检测方法标准的制定要求。

表 7 样品测定的批内变异系数和批间变异系数

实验室	批内变异系数（%）	批间变异系数（%）
本实验室	4.31~4.98	6.71
国家水产品质量监督检验中心	3.82~4.72	4.24
农业部渔业产品质量监督检验测试 中心（烟台）	3.51~5.69	6.28
青岛市产品质量监督检验所	3.91~4.72	7.12

7 采用国际标准和国外先进标准程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况

目前海参与多糖含量测定方法无国际标准和国外先进标准可参照。本标准在制订过程中对以多种海参与其制品为原料的质量、检测和市场进行了充分的调查研究，并广泛征求和采纳了国内相关领域专家的意见和建议，所制定的标准适合我国国情，具有先进性、科学性、实用性和可操作性。该标准确定的方法岩藻糖检出限低，灵敏度好，精确度高，优于国内外报道的其他检测方法。

8 与现行法律、法规和强制性标准的关系

标准所确定的各项技术指标和内容符合我国现行的有关方针、政策，并与相关法律、法规、标准吻合。本标准的编制依据为现行的法律、法规，按照 GB/T1.1—2009《标准化工作导则》、GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》的要求进行编写制订。

本标准颁布实施后，填补我国海参及其制品中海参多糖的测定方法的空白，更有利于行业应用；与现行的法律、法规及其他国家标准没有矛盾。

9 标准作为强制性或推荐性标准的意见

建议本标准作为推荐性国家标准发布。

10 实施标准的建议

如果本标准被批准并发布，为了贯彻好本标准，使其有效发挥作用，建议在标准发布后，在相关企业和检测机构进行宣传和贯彻，并组织有关部门和人员进行学习和培训。在贯彻该标准时应严格遵守实验室规范（包括试验条件和人员操作等因素），保证标准执行的规范性和权威性。标准批准、正式发布后，由中国海洋大学等标准起草单位举办标准宣贯会，讲解分析方法的技术要领和关键步骤。

11 废止或替代现行有关标准文件的建议

本标准自实施之日起替代 SC/T 3049-2015《刺参及其制品中海参多糖的测定-高效液相色谱法》。

12 参考文献

- [1] GB/T 191 包装储运图示标志
- [2] GB 2733 食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品
- [3] GB 2762 食品安全国家标准 食品中污染物限量
- [4] GB 5009.3 食品安全国家标准 食品中水分的测定
- [5] GB 5009.44 食品安全国家标准 食品中氯化物的测定
- [6] GB 2721 食用盐
- [7] GB 5749 生活饮用水卫生标准
- [8] GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则
- [9] GB 10136 食品安全国家标准 动物性水产制品
- [10] GB 14881 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范

- [11] GB/T 30891—2014 水产品抽样规范
- [12] JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则
- [13] 农业部渔业渔政管理局.中国渔业统计年鉴[G].北京:中国农业出版社, 2016.
- [14] 王远红, 吕志华, 郭少媛.测定海参多糖含量的方法.ZL 200410036250.7
- [15] 杜海燕, 孙家跃, 庚梅.测定芦荟多糖的新方法.ZL 200410048001.X
- [16] 陈士国. 几种海洋动物酸性多糖的结构和活性研究: 博士学位论文, 2010
- [17] 林晓, 徐德生, 冯怡, 沈岚.一种多糖定量检测方法与系统.ZL200410052907.9
- [18] 尹利昂.不同海参多糖的分离纯化及生化性质分析: 硕士学位论文, 2009

《海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法》标准起草小组

二零二一年二月