



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法

Determination of sea cucumber polysaccharides in sea cucumber-High performance  
liquid chromatography

（征求意见稿）

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中华人民共和国国家市场监督管理总局 发  
中国国家标准化管理委员会 布



# 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国海洋大学提出。

本标准由中国标准化研究归口。

本标准起草单位：中国海洋大学

本标准主要起草人：王静凤、樊燕



# 海参中海参多糖的测定 高效液相色谱法

## 1 范围

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的范围、规范性引用文件、原理、试剂和材料、仪器和设备、结果计算与表示、精密度。

本标准适用于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

GB/T 8855 水果和蔬菜 取样方法

## 3 原理

样品经酶解、乙酸钾沉淀、酸解后制备得到海参硫酸软骨素水解液，水解液中岩藻糖与 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）进行衍生反应，XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱分离，经配有紫外检测器的高效液相色谱仪测定岩藻糖衍生物的含量，内标法定量，以岩藻糖含量为基准计算出样品中海参多糖的含量。

## 4 试剂和材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

- 4.1 标准物质：L-岩藻糖（Fuc），纯度 $\geq 99\%$ 。
- 4.2 内标物：乳糖（Lac），纯度 $\geq 99\%$ 。
- 4.3 甲醇（CH<sub>3</sub>OH）：色谱纯。
- 4.4 乙腈（C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N）：色谱纯。
- 4.5 三氯甲烷（CHCl<sub>3</sub>）。
- 4.6 冰乙酸（C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>）。
- 4.7 盐酸（HCl）。

- 4.8 三氟乙酸 ( $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$ )。
- 4.9 木瓜蛋白酶：食品级。
- 4.10 乙酸钠 ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ )。
- 4.11 乙二胺四乙酸 ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ )。
- 4.12 半胱氨酸盐酸盐 ( $\text{H-Cys-OH}\cdot\text{HCl}$ )。
- 4.13 乙酸钾 ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$ )。
- 4.14 氢氧化钠 ( $\text{NaOH}$ )。
- 4.15 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )。
- 4.16 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) ( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ )。
- 4.17 乙酸钠缓冲液 (0.1 mol/L)：准确称取 8.20 g 无水乙酸钠，用水溶解并定容至 1000 mL，用冰乙酸调节 pH 至 5.9~6.1。
- 4.18 三氟乙酸溶液 (4 mol/L)：准确移取 30 mL 三氟乙酸，用水稀释至 100 mL。
- 4.19 氢氧化钠溶液 (0.3 mol/L)：准确称取 1.20 g 氢氧化钠，用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.20 盐酸溶液 (0.3 mol/L)：准确移取 2.5 mL 盐酸，用水稀释至 100 mL。
- 4.21 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮-甲醇溶液 (0.3 mol/L)：准确称取 174 mg 重结晶的 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮，用 2mL 甲醇溶解。
- 4.22 岩藻糖标准储备液：准确称取经真空干燥至恒重的 L-岩藻糖 (4.1) 164 mg，用水溶解并稀释至 100 mL。该溶液浓度为 10 mmol/L，4℃密封避光存放，有效期 15d。
- 4.23 岩藻糖标准工作液：准确移取适量岩藻糖标准储备液 (4.22)，用水稀释成浓度为 0.10 mmol/L、0.25 mmol/L、0.50 mmol/L、0.75 mmol/L、1.00 mmol/L、1.25 mmol/L 的岩藻糖系列标准工作液，当天配制。
- 4.24 乳糖内标工作液 (2 mmol/L)：准确称取经真空干燥至恒重的乳糖 (4.2) 68 mg，用水溶解并稀释至 100 mL。该溶液浓度为 2 mmol/L，4℃密封避光存放，有效期 15d。
- 4.25 磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L)：准确称取 6.80 g 磷酸二氢钾，用水溶解并稀释至 100 mL，用 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 (4.19) 调节 pH 至 6.8~7.0。使用前，用 0.15  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。
- 4.26 磷酸盐-乙腈溶液 1：取乙腈 150 mL，用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (4.25) 稀释至 1000 mL。
- 4.27 磷酸盐-乙腈溶液 2：取乙腈 400 mL，用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (4.25) 稀释至 1000mL。
- 4.28 滤膜：0.22  $\mu\text{m}$  水系滤膜。
- 4.29 广口瓶：500 mL。

4.30 容量瓶：10 mL，50 mL，1000 mL。

## 5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器。

5.2 天平：感量 0.01 g。

5.3 分析天平：感量 0.0001 g。

5.4 离心机：15000 r/min。

5.5 电热恒温鼓风干燥箱。

5.6 超声波清洗仪。

5.7 涡旋混合器。

5.8 恒温水浴锅。

5.9 恒温水浴振荡器。

5.10 氮吹仪。

5.11 pH 计。

5.12 微量移液枪及配套枪头。

5.13 小型粉碎机。

## 6 测定步骤

### 6.1 样品的前处理

鲜海参去肠腺、灰嘴，剪成 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；干海参，粉碎，过 10 目筛，混匀备用；即食海参，剪成 0.5cm×0.5cm 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。

### 6.2 试样海参硫酸软骨素的提取与水解液的制备

#### 6.2.1 鲜海参、干海参、即食海参、海参粉及胶囊等固体制品

准确称取  $(1.00 \pm 0.05)$  g 试样，置于 50 mL 三角瓶中，加入 25 mL 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液（4.17），加入 100 mg 木瓜蛋白酶、37 mg 乙二醇四乙酸和 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 1000 r/min 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 °C 静置 12 h 后转移至另一 50 mL

离心管，于9000 r/min离心10 min，弃去上清液，沉淀用5 mL水超声溶解后转移至10 mL容量瓶，用水稀释至刻度，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（4.18），充氮封管，110 °C水解8 h后，于70 °C氮气吹干，加2 mL水超声溶解残余物，用0.3 mol/L氢氧化钠溶液（4.19）调节水解液pH至6.5~7.5后转移入5 mL容量瓶，用水稀释至刻度，即得海参硫酸软骨素水解液。

#### 6.2.2 海参原浆液、口服液、海参酒、海参乳饮料等液体制品

准确移取25 mL试样，置于100 mL烧杯中，加入25 mL 0.1mol/L乙酸钠缓冲液（4.17），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9000 r/min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。

#### 6.3 试样衍生及净化

准确移取6.2制备的海参硫酸软骨素水解液400 μL，于10 mL具塞试管中，加入50 μL 2mmol/L乳糖溶液（4.24）、450 μL 0.5mol/L 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮-甲醇溶液（4.21）和450 μL 0.3mol/L 氢氧化钠溶液（4.19），涡旋混合，70°C水浴反应30 min，取出冷却至室温，加450 μL 0.3 mol/L 盐酸溶液（4.20），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 μm滤膜，供高效液相色谱分析。

#### 6.4 岩藻糖系列标准工作溶液衍生

分别准确移取浓度为0.1 mmol/L、0.25 mmol/L、0.50 mmol/L、0.75 mmol/L、1.00 mmol/L、1.25 mmol/L的岩藻糖标准工作液（4.23）400 μL于6个10 mL具塞试管中，分别加入50 μL 2 mmol/L乳糖溶液（4.24）、450 μL 0.5 mmol/L 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮-甲醇溶液（4.21）和450 μL 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液（4.19），涡旋混合均匀后，制备岩藻糖系列标准溶液衍生物。以岩藻糖衍生物的峰面积与乳糖峰衍生物的峰面积之比为纵坐标，以相应的岩藻糖浓度为横坐标绘制标准工作曲线。

#### 6.5 测定

##### 6.5.1 色谱参考条件

以下分析条件可供参考，采用其他条件应验证其适用性：

—色谱柱：XDB-C<sub>18</sub>，5 μm，250 mm×4.6 mm（内径）或性能相当者。



- 柱温：25 ℃
- 检测波长：254 nm
- 进样量：20 μL
- 流速：1.0 mL/min
- 流动相：A：磷酸盐-乙腈溶液 1（4.26），B：磷酸盐-乙腈溶液 2（4.27）；梯度洗脱程序见表 1。

表1 流动相洗脱程序

时间，min	A， %	B， %
0	100	0
10	92	8
40	63	37
45	100	0

6.5.2 色谱分析

分别注入 20 μL 岩藻糖系列标准衍生液（6.4）和试样衍生液（6.3）与高效液相色谱仪中。按 6.5.1 规定的色谱条件进行分析，记录峰面积，试样中岩藻糖衍生物的响应值均应在标准曲线范围之内。根据标准品的保留时间定性，内标法定量。岩藻糖标准溶液衍生物和试样液衍生物液相色谱图参见附录 A。

7 结果计算与表示

7.1 结果计算

海参多糖的含量（以岩藻糖计）按式（1）计算。

$$X = \frac{C \times 146 \times 5 \times 10}{A \times 1000}$$

..... (1)

式中：

- X---试样中海参多糖的含量，单位为毫克每克或毫克每毫升（mg/g或mg/mL）；
- C---由标准曲线计算得到的试样中岩藻多糖的浓度，单位为毫摩尔每升（mmol/L）；
- 164---岩藻糖的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）；
- 5---试样海参硫酸软骨素水解液定容体积，单位为毫升（mL）；

10---试样海参硫酸软骨素定容体积与海参硫酸软骨素溶液水解体积的比值；

A---试样质量或试样体积，单位为克或毫升（g或mL）；

计算结果保留三位有效数字。

## 7.2 结果表示

测定结果以平均测定的算术平均值表示，计算结果保留两位有效数字。两次平行测定结果的相对平均偏差不应超过10%。

## 7.3 海参多糖与岩藻糖的换算参照附录 B。

## 8 灵敏度、准确度和精密度

### 8.1 灵敏度

应按照GB/T 17823和NY 5031执行。本方法中岩藻糖的检出限为 $1.0 \times 10^{-3}$  mmol/L，定量限为 $4.8 \times 10^{-3}$  mmol/L。

### 8.2 准确度

本方法岩藻糖在0.01 mmol/L~6.00 mmol/L，添加浓度范围内回收率为70 %~110 %。

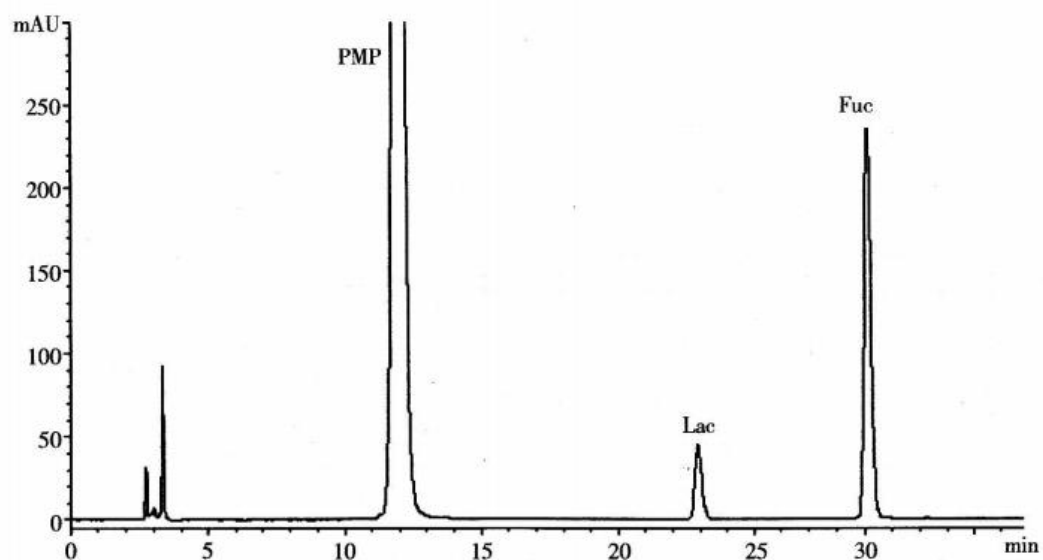
### 8.3 精密度。

本方法批内相对标准偏差 $\leq 10\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

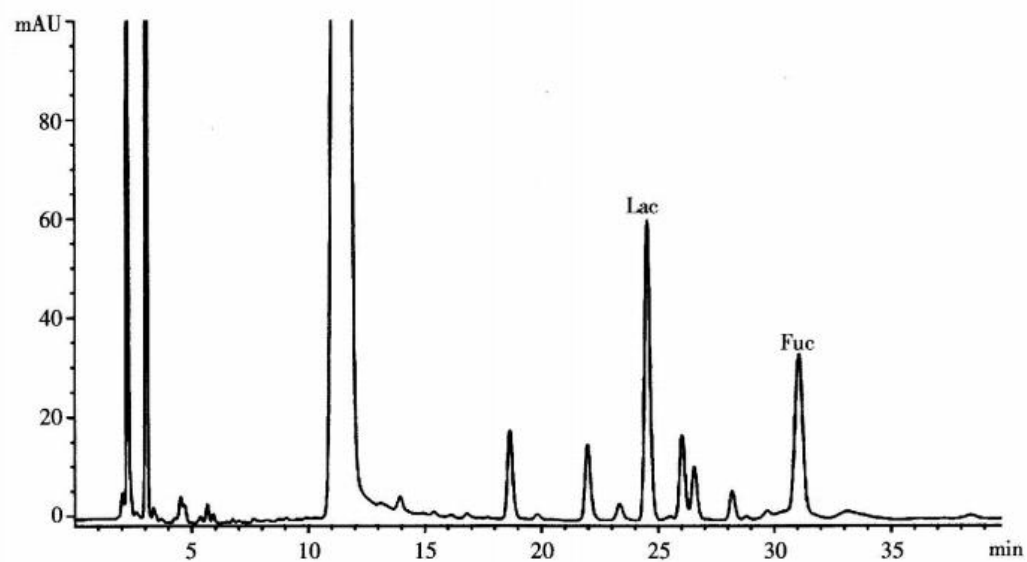
## 附录 A 岩藻糖标准溶液及典型样品的液相色谱图

(规范性附录)

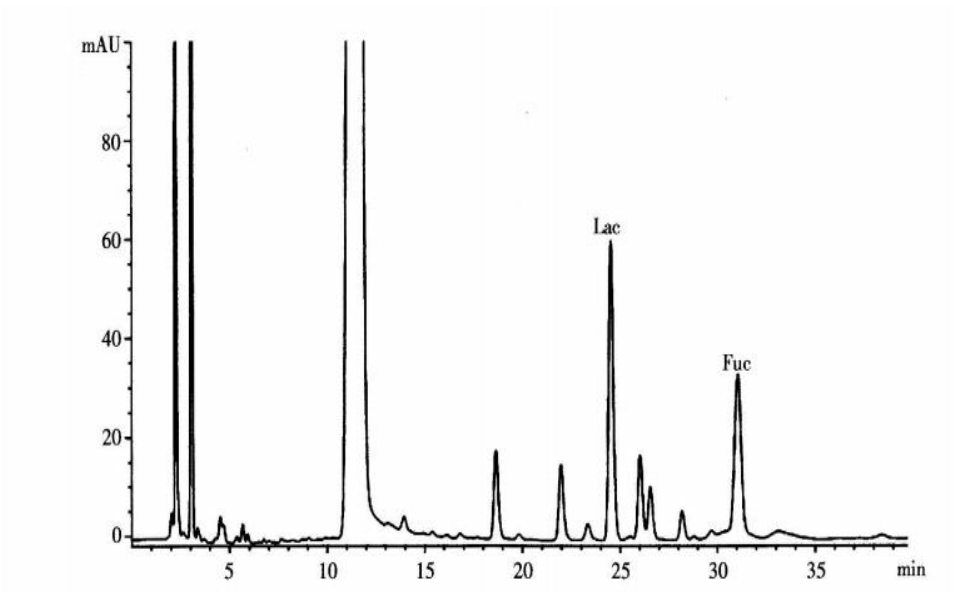
岩藻糖标准溶液及典型样品的色谱图示例见图 A.1-A.3。



A.1 岩藻糖标准溶液衍生物液相色谱图 (1 mmol/L)



A.2 淡干刺参液相色谱图



A. 3 刺参口服液液相色谱图

