ICS 65.120
CCS B46

NY

中 华 人 民 共 和 国 农 业 行 业 标 准

NY/T XXXX-20XX

饲料原料 酵母水解物和酿酒酵母细胞壁中甘露聚糖的测定

Feed materials Determination of mannan in yeast hydrolysate and yeast cell wall from *Saccharomyces cerevisiae*

（征求意见稿）

20XX-XX-XX 发布 20 XX -XX-XX 实施

中华人民共和国农业农村部 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》给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：中国农业科学院饲料研究所，安琪酵母股份有限公司。

本文件主要起草人：

饲料原料 酵母水解物和酿酒酵母细胞壁中甘露聚糖的测定

1 范围

本文件描述了饲料原料酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）水解物和酿酒酵母细胞壁中甘露聚糖含量测定的离子色谱和高效液相色谱法。

本文件适用于饲料原料酵母水解物和酿酒酵母细胞壁中甘露聚糖的测定。

本文件中离子色谱法的检出限为0.02%，定量限为0.06% ，高效液相色谱法的检出限为0.05%，定量限为0.15%。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中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，仅注日期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 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 离子色谱法

4.1 原理

试样中的甘露聚糖经盐酸水解得到甘露糖，经离子色谱柱分离和脉冲安培检测器检测，外标法得到甘露糖浓度，将其乘以单糖与聚糖含量间的换算系数，获得样品中甘露聚糖的含量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定，本方法所使用试剂均为分析纯。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 盐酸：优级纯。

4.2.3 氢氧化钠：优级纯。

4.2.4 氢氧化钠溶液（4 mol/L）：准确称取160 g氢氧化钠（4.2.3）于烧杯中，加适量水溶解后，用水转移至1 L容量瓶中，并定容，混匀后储于塑料瓶，室温保存，有效期为两周。

4.2.5 氢氧化钠溶液（0.2 mol/L）：准确称取8 g氢氧化钠（4.2.3）于烧杯中，加水溶解后，用水移入1 L容量瓶中并定容，混匀后转移至塑料瓶，室温保存，有效期为两周。

4.2.6 甘露糖标准储备溶液（1 mg/mL）：称取甘露糖标准品（CAS：3458-28-4，纯度不低于99 %）0.1 g(精确0.0001 g)于 100 mL容量瓶中，用水溶解定容。该溶液于0℃~4℃冷藏保存，有效期为两周。

4.2.7 甘露糖标准中间溶液（50 μg/mL）：准确吸取甘露糖标准储备溶液（4.2.6）0.5 mL,置于10 mL容量瓶中，加水至刻度，摇匀。临用现配。

4.2.8 甘露糖标准系列溶液：准确移取适量甘露糖标准中间溶液（4.2.7），用水稀释配成浓度分别为:0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、8 μg/mL、12 μg/mL标准系列溶液。临用现配。

4.2.9 微孔滤膜：0.45 μm，水系。

4.3 仪器设备

4.3.1 离子色谱仪：配有脉冲安培检测器。
4.3.2 分析天平：感量为0.0001 g。
4.3.3 水浴锅。
4.3.4 压力蒸汽灭菌器。
4.3.5 旋涡混合器。
4.3.6 pH计，精度±0.01。
4.3.7 水解瓶：耐高温带盖玻璃瓶，250 mL。

4.4 样品

按GB/T 20195制备试样，粉碎过0.42 mm孔径的筛，充分混匀，装入磨口瓶中，避光保存，备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样水解

平行做两份试验。称取试样0.4 g，准确至0.0001 g，置于 20 mL的带螺帽玻璃试管中，准确加入6 mL盐酸(4.2.2)，加盖后涡旋1 min。将试管放入30℃水浴中，温浴45 min，其间每15 min涡旋混合一次，每次1 min。然后将内容物全部转移到250 mL水解瓶中，用100 mL的水，分几次冲洗试管，洗涤液并入水解瓶中。将水解瓶封口后放入高压灭菌锅，121℃下热压60 min。取出后冷却，用氢氧化钠溶液(4.2.4)将水解液调pH到6.5±0.2。将水解液用水全部转移到200 mL（V）容量瓶并定容，摇匀后，精确移取2 mL（V_1）定容后水解液，用水稀释定容至100mL（V_2），摇匀，取约4 mL过0.45 μm滤膜备离子色谱检测用。此溶液需在12 h内完成分析检测。

4.5.2 离子色谱参考条件

（a）色谱柱：阴离子树脂，柱长150 mm，内径3.0 mm，粒度6 μm ，如Dionex CarboPac™ PA20[1]，或性能相当者；
（b）柱温：30℃；
（c）检测器：脉冲安培检测器；Au工作电极；Ag/AgCl参比电极；
（d）流动相：A：水，B：氢氧化钠溶液（4.2.5）；
（e）梯度洗脱：洗脱程序见表1；
（f）流速：0.40 mL/min；
（g）进样量：25 μL。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.00	98	2
15.00	98	2
15.01	70	30
21.00	70	30
21.01	98	2
30.00	98	2

4.5.3 测定

[1] Dionex CarboPac™ PA20是由Thermo Fisher Scientific Inc.公司提供的产品的商品名。给出这一信息，是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可，如果其他等效产品，具有相同的效果，则可使用这些等效的产品。

4.5.3.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取甘露糖标准系列溶液（4.2.8）和试样检测备用液（4.5.1）上机测定。甘露糖标准溶液的离子色谱图参见附录A 中图 A.1。

4.5.3.2 定性

以保留时间定性，在对标准系列溶液进行检测的12h内，所检测试样溶液中甘露糖的保留时间应与标准系列溶液中与其浓度相当的标准溶液中甘露糖的保留时间一致，其相对偏差应在±2.5%之内。

4.5.3.3 定量

以甘露糖的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于0.99。试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内，如超出线性范围，应调整试样调节pH后水解液的定容体积后，重新测定。

4.6 试验数据处理

试样中甘露聚糖的含量以质量分数w 计，数值以百分含量（%）表示。按公式（1）计算：

$$w = \frac{C \times V \times V_2 \times 100}{V_1 \times m \times 1000} \times 0.9 \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

C ——从标准曲线查得的试样溶液甘露糖的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——试样水解首次定容的体积，单位为升（L）；

V_1 ——从定容后的水解液分取的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——水解液分取后再次定容的体积，单位为毫升（mL）；

0.9 —将甘露糖换算成甘露聚糖的系数；

m ——试样质量，单位为克（g）；

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

5 高效液相色谱法

5.1 原理

试样中的甘露聚糖经盐酸水解得到甘露糖后，用液相色谱柱分离和示差折光检测器检测，外标法得到甘露糖浓度，将其乘以单糖与聚糖含量间的换算系数，计算获得样品中甘露聚糖的含量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定，本方法所使用试剂均为分析纯。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 盐酸：优级纯。

5.2.3 氢氧化钠：优级纯。

5.2.4 氢氧化钠溶液（4 mol/L）：准确称取 160 g 氢氧化钠（5.2.3）于烧杯中，加适量水溶解后，用水转移至 1L 容量瓶中，并定容，混匀后储于塑料瓶，室温保存，有效期为两周。

5.2.5 甘露糖标准储备溶液（1 mg/mL）：称取甘露糖标准品（CAS：3458-28-4，纯度不低于 99%）0.1 g(精确 0.0001 g)于 100 mL 容量瓶中，用水溶解定容。该溶液于 0℃~4℃冷藏保存，有效期为两周。

5.2.6 甘露糖标准系列溶液：准确移取适量甘露糖标准储备溶液（5.2.5），用水稀释配成浓度分为:200 μg/mL、400 μg/mL、600 μg/mL、800 μg/mL、1000 μg/mL 的标准系列溶液。临用现配。

5.2.7 硫酸溶液（0.005 mol/L）：在 2 L 水中加入 0.55 mL 浓硫酸，混合均匀；

5.2.8 微孔滤膜：0.45 μm，水系。

5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪：带示差折光检测器。

5.3.2~5.3.7 同4.3.2~4.3.7。

5.4 样品

同4.4。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样水解

平行做两份试验。称取试样0.4 g，准确至0.0001g，置于20 mL的带螺帽玻璃试管中，准确加入6 mL盐酸(5.2.2)，盖紧螺帽后用涡旋1 min。将试管放入30℃水浴中，温浴45 min，其间每15 min涡旋混合一次，每次1 min。然后将试管内的混浊溶液转移到250 mL水解瓶中，用100 mL的水，分几次洗涤试管，洗涤液并入水解瓶中。将水解瓶封口后放入高压灭菌锅，121℃下热压 60 min。取出后冷却，用氢氧化钠溶液(5.2.4)将水解液调pH到6.5±0.2。调节pH后水解液用水转移至 200 mL容量瓶并定容至刻度，摇匀，取约4 mL过0.45 μm滤膜备液相色谱检测用。此溶液需在12h内完成检测。

5.5.2 色谱参考条件

（a）色谱柱：Aminex HPX-87H[2]离子排阻色谱，柱长 300 mm，内径 7.8，或性能相当者；

（b）流动相：硫酸溶液（5.2.7）；

（c）检测器：示差折光检测器；

（d）柱温：65℃；

（e）流速：0.6 mL/min；

（f）进样量：20 μL。

5.5.3 测定

5.5.3.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取甘露糖标准系列溶液（5.2.6），和试样检测备用溶液（5.5.1）上机测定。甘露糖标准溶液的液相色谱图参见附录A中图 A.2。

5.5.3.2 定性

以保留时间定性，在对标准系列溶液进行检测的12小时内，所检测试样溶液中甘露糖的保留时间应与标准系列溶液中与其浓度相当的标准溶液中甘露糖的保留时间一致，其相对偏差应在±2.5%之内。

5.5.3.3 定量

以甘露糖的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于0.99。试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内，如超出线性范围，应调整试样调节pH后水解液的定容体积后，重新测定。

5.6 试验数据处理

试样中甘露聚糖的含量以质量分数w 计，数值以百分含量（%）表示。按公式（2）计算：

$$w = \frac{C \times V \times 100}{m \times 1000} \times 0.9 \qquad \cdots\cdots(2)$$

式中：

C——从标准曲线查得的试样溶液甘露糖的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

[2] Aminex HPX-87H 是由 BIO-RED Laborationes Inc.公司提供的产品的商品名。给出这一信息，是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可，如果其他等效产品，具有相同的效果，则可使用这些等效的产品。

V——试样处理稀释后定容的体积，单位为升（L）；

0.9—将甘露糖换算成甘露聚糖的系数；

m——试样质量，单位为克（g）；

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

附录 A
（资料性附录）
甘露糖标准溶液色谱图

A.1 甘露糖标准溶液的离子色谱图见图 A.1。

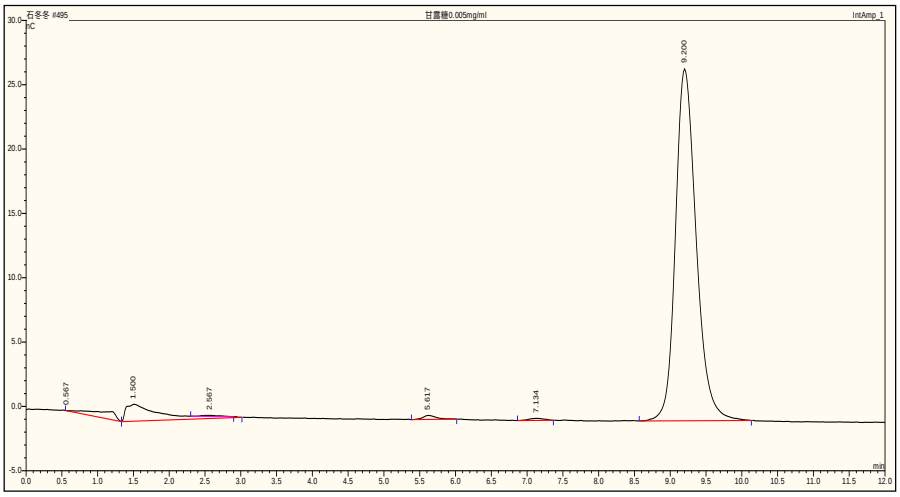

图 A.1甘露糖标准溶液（5 μg/mL）的离子色谱图

A.2 甘露糖标准溶液的液相色谱图见图 A.2。

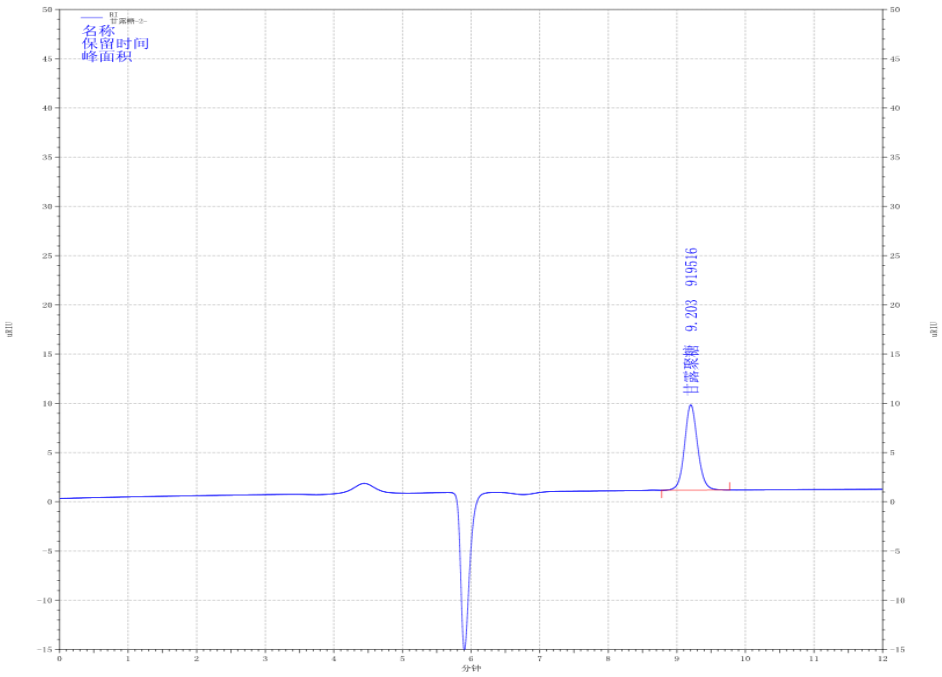

图 A.2甘露糖标准溶液（400 μg/mL）的液相色谱图