

ICS 65.120
CCS B 46

团 标 准

T/CFIAS 6001—2022

天然植物饲料原料及其提取物中 多糖的测定 分光光度法

Determination of polysaccharides of natural plants and their extracts
as feed material — Spectrophotometry

2022-04-13 发布

2022-05-13 实施

中国饲料工业协会 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。

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专利的责任。

本文件由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

本文件主要起草单位：河南全印检测技术有限公司、西南民族大学、广西壮族自治区畜牧站、四川省三星堆乾鲲生物科技有限公司、河南牧业经济学院、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量检验检测中心（北京）]、四川省饲料工作总站、中国农业科学院饲料研究所、天津中医药大学、河南科技大学、安徽聚睿达管理咨询有限公司、河南省九一中医药创新研究有限公司、颖河（焦作）中药生物工程有限公司、四川恒瑞通达生物科技有限公司、洛阳蓝斯利科技有限公司、河南华牧生物科技有限公司、河南中大恒源生物科技股份有限公司、驻马店华中正大有限公司、郑州福源动物药业有限公司、河南金杜仲农业科技有限公司、禹州市合同泰药业有限公司、桂林华艺健康科技有限公司、河南金尔康生物科技有限公司、河南普尼尔生物科技有限公司、河南省农业科学院畜牧兽医研究所、安阳市食品安全监督中心、桂林莱茵生物科技股份有限公司、四川众检四方检验检测技术有限公司、石家庄市畜产品和兽药饲料质量检测中心、安徽省兽药饲料监察所。

本文件主要起草人：陶亚飞、柏雪、卢丽枝、杨善发、樊克锋、宋荣、赵立军、李俊、陈智阳、白东英、赵小阳、常选妞、杜红鸽、付立亭、段海涛、伍念荣、陆静、陈青、梁海瑞、胡依凡、卜发玉、袁江华、王新炎、文雁君、李书至、袁宝青、盘红霞、郑红初、江红格、张磊、杜雪莉、严义梅、王中荣、甄文瑞、白军、温长印、马改云、李海利、李金荣、刘占通、张崇威、陈桂军、刘作涛、何跃、欧道英、杨巧玲、许舒娅、谷稳亮、韩洛利、张利娜、李永芳、易永基、李云、宋瑞、张梦雪、陈文、吴蕾、张春霞。

天然植物饲料原料及其提取物中多糖的测定

分光光度法

1 范围

本文件规定了天然植物饲料原料及其提取物中多糖的分光光度测定方法。

本文件适用于天然植物饲料原料及其提取物中多糖的测定。

本文件的定量限为 500 mg/kg。

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 5009.88-2014 食品中膳食纤维的测定

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

天然植物饲料原料 natural plant as feed material

以植物学纯度不低于95%的天然植物为原料制得的单一型、复配型或混合型干燥物、粉碎物或粗提物产品。

3.2

天然植物饲料原料提取物 extract of natural plant as feed material

天然植物经提取、纯化、浓缩、干燥，获得的液态、膏状和固态产品。

3.3

多糖 polysaccharides

经过葡萄糖淀粉酶酶解后，以 β -D-葡聚糖或其他聚糖为主链的一系列非淀粉水溶性高分子碳水化合物。

4 原理

试样用热水提取，经葡萄糖淀粉酶酶解去除淀粉、糊精等物质，再用乙醇沉淀法提取多糖，多糖在浓硫酸作用下水解成单糖，并脱水生成糖醛衍生物，糖醛衍生物与苯酚生成橙黄色化合物，用分光光度法测定。

5 试剂或材料

警示——浓硫酸有腐蚀性，需小心操作；苯酚蒸汽有腐蚀性和毒性，重蒸馏需在通风橱内进行。除非另有规定，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。

5.1 水：GB/T 6682，三级。

5.2 浓硫酸。

5.3 无水乙醇。

5.4 碘化钾。

5.5 碘。

5.6 盐酸。

5.7 苯酚：重蒸馏，取适量苯酚置于蒸馏烧瓶，于80 °C水浴融化。放入玻璃珠数粒，于182 °C油浴蒸馏，弃去最初2 min～3 min蒸馏液，收集剩余蒸馏液，冷却后，于棕色瓶中密闭保存，备用。

5.8 碘溶液：称取3.6 g碘化钾溶于20 mL水中，加入1.3 g碘，溶解后加水稀释至100 mL，混匀，于棕色瓶中密闭保存。

5.9 苯酚溶液I（800 g/L）：称取80 g重蒸馏苯酚（5.7）于100 mL烧杯中，加水溶解，定容至100 mL，混匀，于棕色瓶中2 °C～8 °C密闭保存。

5.10 苯酚溶液II（50 g/L）：移取5 mL苯酚溶液I（5.9），用水稀释至80 mL，混匀。临用现配。

5.11 75%乙醇溶液：移取无水乙醇（5.3）75 mL，加水稀释至100 mL，混匀。

5.12 稀盐酸：取盐酸（5.6）234 mL，加水稀释至1 000 mL，混匀。

5.13 葡萄糖淀粉酶储备溶液（CAS：9032-08-0）：酶活力为100 000 U/mL±10 000 U/mL，2 °C～8 °C保存，酶活力测定及判定标准应符合GB 5009.88-2014（附录A）规定。

5.14 葡萄糖淀粉酶工作溶液（1 000 U/mL）：准确移取1 mL葡萄糖淀粉酶储备溶液（5.13），加水稀释至100 mL，2 °C～8 °C保存，有效期为7天。

5.15 葡萄糖标准储备溶液（1.0 g/L）：称取0.1 g（精确至0.1 mg）经105 °C烘至恒重的无水葡萄糖（CAS：50-99-7，纯度≥99.0%）标准品于100 mL容量瓶，加水溶解、定容，混匀，2 °C～8 °C密闭保存，有效期为7天。

5.16 葡萄糖标准工作溶液（0.1 g/L）：准确移取5 mL葡萄糖标准储备溶液（5.15），用水稀释至50 mL，混匀。临用现配。

6 仪器设备

6.1 分光光度计：490 nm±1 nm。

- 6.2 分析天平：感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 6.3 漩涡混合器。
- 6.4 pH 计。
- 6.5 超声波清洗器。
- 6.6 恒温水浴锅：温度范围 20 °C~100 °C。
- 6.7 恒温干燥箱：温度范围 10 °C~250 °C。
- 6.8 冷冻离心机：转速不低于 8 000 r/min。
- 6.9 旋转蒸发仪。

7 样品

按 GB/T 20195 规定制备试样。固态样品至少 200 g，粉碎过 0.42 mm 孔筛，密闭保存，充分混匀，备用。液态或膏状样品，充分混匀，密闭保存，备用。

8 试验步骤

8.1 试样溶液制备

8.1.1 植物提取物

平行做两份试验。准确称取试样 1 g，精确至 0.1 mg，置于 50 mL 离心管中，加入热水 35 mL，约 80 °C 超声 30 min，放至室温，4 000 r/min 离心 5 min，取全部上清液用稀盐酸（5.12）调节 pH 值为 5.0±0.2，用水定容至 50 mL，漩涡混匀，备用。

8.1.2 植物原料

平行做两份试验。准确称取 5 g~25 g 试样，精确至 0.01 g，置于烧杯中，加入约 10 倍量的水，约 80 °C 超声 30 min，重复提取一次，合并两次提取液。过滤，滤液用蒸发皿或旋转蒸发仪蒸发浓缩到约 10 mL~20 mL，转移至离心管中，加入提取液三倍体积的无水乙醇（5.3），使溶液中乙醇体积分数达到 75%，混匀，于 2 °C~8 °C 静置 12 h。4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，残渣用 10 mL 75% 乙醇溶液（5.11）洗涤，4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 5 min，再重复洗涤、离心 2 次。加热水 15 mL，超声 10 min，冷却至室温，用稀盐酸（5.12）调节 pH 为 5.0±0.2，用水定容至 25 mL，备用。

8.2 酶解

准确移取 5 mL 试样溶液（8.1）于 25 mL 具塞试管中，加入 0.2 mL 葡萄糖淀粉酶工作溶液（5.14），盖好瓶塞，置于 50 °C~60 °C 水浴中酶解 80 min，冷却至室温，加入 1 滴碘溶液（5.8），颜色应无明显变化，若有变化则需继续酶解。将酶解完全的试样溶液置于沸水浴中，反应 20 min，取出，冷却至室温，转移至离心管中，8 000 r/min 离心 5 min，转移全部上清液，再加入上清液三倍体积的无水乙醇（5.3），使溶液中乙醇体积分数达到 75%，混匀，于 2 °C~8 °C 静置 12 h，4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液。残渣用 75% 乙醇溶液（5.11）10 mL 洗涤，4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，再重复洗涤、离心 2 次，残渣用 15 mL 80 °C 水溶解，4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 5 min，取全部上清液用水定容至 25 mL，混匀，备用。

8.3 测定

8.3.1 标准曲线绘制

准确移取0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL葡萄糖标准工作溶液(5.15)，分别置于25 mL具塞比色管中，加水补至2 mL，准确加入1 mL苯酚溶液II(5.10)，混匀，立即准确加入浓硫酸(5.2)5 mL，边加边振摇，在漩涡混合器上混匀，静置5 min，沸水浴中反应15 min后，立即置于冰水浴中冷却5 min，取出，冷却至室温，用分光光度计在490 nm处测定吸光度。以葡萄糖浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，相关系数应不低于0.99。

8.3.2 试样溶液测定

准确移取2 mL酶解后的试样溶液(8.2)于25 mL具塞比色管中，准确加入1 mL苯酚溶液II(5.10)，混匀，立即准确加入浓硫酸(5.2)5 mL，边加边振摇，在涡旋混合器上混匀，静置5 min，沸水浴中反应15 min后，立即置于冰水浴中冷却5 min，取出，冷却至室温，用分光光度计在490 nm处测定吸光度。试样溶液中待测物的响应值应在标准溶液线性范围内，如超出线性范围，应将酶解后的试样溶液(8.2)用水稀释至线性范围内，重新测定。

8.3.3 空白溶液测定

准确移取5 mL水，按照8.2和8.3.2规定测定空白溶液的吸光度。

9 试验数据处理

试样中多糖的含量以质量分数 w 计，单位以毫克每千克(mg/kg)表示。按公式(1)计算：

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_2 \times n \times 0.9 \times 1000}{m \times V_3 \times V_4 \times 1000} \quad (1)$$

式中：

- ρ ——扣除空白溶液吸光度后从标准曲线中查得的试样溶液中葡萄糖的量，单位为微克(μg)；
- V_1 ——试样定容体积，单位为毫升(mL)；
- V_2 ——酶解后醇沉淀容的体积，单位为毫升(mL)；
- V_3 ——移取试样溶液稀释定容后的体积，单位为毫升(mL)；
- V_4 ——比色测定时移取试样测定液的体积，单位为毫升(mL)；
- m ——试样质量，单位为克(g)；
- n ——超出线性范围，试样溶液的稀释倍数；
- 0.9——葡萄糖换算为葡聚糖的校正系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

10 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15%。

