

国家标准
《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》
(征求意见稿)

编制说明

《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》标准起草组

2025 年 03 月

目录

（一）工作简况.....	3
（二）国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据），修订国家标准时，还包括修订前后技术内容的对比.....	4
（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益.....	21
（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况.....	26
（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因.....	26
（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系	26
（七）重大分歧意见的处理经过和依据.....	26
（八）涉及专利的有关说明.....	26
（九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议.....	26
（十）其他应予说明的事项.....	26

国家标准《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》编制说明

(一) 工作简况，包括任务来源、协作单位、起草过程、国家标准主要起草人及其所做的工作等

1、任务来源

本标准根据国标委公布的2024年第一批国家标准计划项目(国标委发[2024] 16 号)，本项目计划编号为20240204-T-469，名称为生化制品中还原糖的测定 柱前衍生高效液相色谱法 (GB/T 40980-2021)。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会 (SAC/TC 387) 提出并归口。

本标准由中国测试技术研究院生物研究所、上海市质量监督检验技术研究院、安徽皖仪科技股份有限公司联合起草。

2、目的和意义

已有国家标准主要是对糖的总量和较大含量糖的测定，涉及到糖的参数较少，现实中对生化制品中糖的质控有局限性，本标准起草的目的是针对糖的多样性和不同基质的条件下，建立一个检测方法通用性较强的还原糖含量测试办法，进行多参数同时进行测试的，为第三方检测实验室和理化实验室质量控制建立一套合理、高效的还原糖含量测定的办法。

本标准的建立扩大了检测还原糖糖的个数、操作简单、灵敏度高、准确性好、线性范围宽、减少毒性试剂使用等，本标准可用于指导还原糖的生产、使用企业优化产品、改善配方，同时保证各级市场监督管理机构检测工作的快速展开，更为相关科研院校提供了简单易行的科研检测方法，促进其开展各项科学研究，丰富和发展还原糖类物质科研成果，从而以科学完善的理论成果促进行业的健康发展。

3、协作单位

本标准的协作单位有： xxxxx 。

4、标准编制过程和主要工作过程

(1) 2022年3月至2022年12月，标准起草单位组织相关技术人员对《生化制品中还原

糖的测定 柱前衍生高效液相色谱法》标准项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外糖类物质离子色谱检测技术相关标准、文献，了解了国内外相关技术动态，并且明确了工作思路和进程安排。

(2) 2023年4月标准起草单位在收到全国生化检测标准化技术委员会生检标[2023] 8号文件《关于召开生化检测领域2023年国家标准宣贯培训暨生物实验室自动化技术标准交流研讨会的通知》后，提交了项目建议书以及国家标准草案。

(3) 2024年4月收到全国生化检测标准化技术委员会生检标[2024] 5号文件以及该标委会转发的国标委发[2024] 16号《国家标准化管理委员会关于下达2024 年第一批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》立项文件，计划编号：20240204-T-469。

(4) 2025 年 3 月，起草小组对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》标准的起草工作，与会专家就《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》（草案）进行了讨论，提出了宝贵的意见和建议。标准起草小组根据专家意见进行了修改和完善。

(5) 2025 年 3 月至 2025 年 6 月，进行《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》标准的起草研制工作。完成了《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》标准的编制说明，并对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》（草案）进一步完善和修改情况，向全国生化检测标准化技术委员会提交了《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》标准（征求意见稿）和编制说明。

5、国家标准主要起草人及其所做的工作

本标准主要起草人有：

(二) 国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据），修订国家标准时，还包括修订前后技术内容的对比

1、标准编制原则

本标准的编制依据GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》，并参照GB/T 6379.1-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第1部分 总则与定义》和GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第2部分 确定

标准测量方法重复性与再现性的基本方法》。

2、确定国家标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据）

国家标准《生化制品中还原糖的测定 柱前衍生高效液相色谱法》（GB/T 40980-2021）采用高效液相色谱紫外检测法对生化制品中 D-甘露糖、D-核糖、D-鼠李糖、D-半乳糖、D-阿拉伯醛糖、D-木糖、D-岩藻糖、D-葡萄糖、D-麦芽糖、D-乳糖 10 种还原糖进行测定，由于糖类物质没有紫外吸收，检测前需要进行衍生化反应，会用到有毒试剂，且实验操作步骤繁琐，耗时较长，延续第一法的参数，第二法已然进行 10 中还原糖的标准研究。

近年来，离子色谱被广泛用于糖的检测，这是由于糖类分子具有高的电化学生活性，且在强碱溶液中全部或部分电离成阴离子形式，可以在阴离子交换柱上被保留并得到分离。由于糖在金电极上易发生氧化还原反应产生信号，离子色谱法检测糖主要使用金电极的脉冲安培检测器。该检测器灵敏度高，操作简便，检测限低，而且不需衍生反应和复杂的样品处理。

本项目拟修订国家标准《生化制品中还原糖的测定 柱前衍生高效液相色谱法》（GB/T 40980-2021），增加生化制品中还原糖的测定离子色谱法为第二法。

本标准的项目团队在糖的检测技术研究、产品标准和检测方法标准的制修订方面具有丰富的工作基础。主持完成了计划项目包括《生化制品中还原糖的测定 柱前衍生高效液相色谱法》（GB/T 40980-2021）《婴幼儿配方奶粉中低聚果糖的检测研究》《奶粉中功能性低聚糖的离子色谱检测研究》，参与了 GB 1903.40-2022《食品安全国家标准营养强化剂低聚果糖》、GB/T 23528.2-2021《低聚糖质量要求第 2 部分：低聚果糖》、GB 5009.8-2016《食品安全国家标准食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定》、氨基寡糖素 第 1 部分：氨基寡糖素母药 NY/T 2889.1-2016 等国家标准的制修订工作，为本标准的顺利开展打下了坚实基础。

2.1 检测器的选择

由于糖类分子具有高的电化学生活性，且在强碱溶液中全部或部分电离成阴离子形式，可以在阴离子交换柱上被保留并得到分离。由于糖在金电极上易发生氧化还原反应产生信号，离子色谱法检测糖主要使用金电极的脉冲安培检测器。

2.2 色谱柱和流动相的优化

2.2.1 色谱柱

调研文献和标准方法中，常用的糖柱为：PA1 糖分析柱,2X250 mm，PA1 糖柱保护柱,2X50 mm； PA10 糖分析柱,4X250 mm，PA10 糖柱保护柱,4X50 mm； PA20 阴离子分析柱,2X250 mm，PA20 阴离子保护柱,2X50 mm； MA1 糖分析柱,4X250 mm，糖柱保护柱,4X50MM； AS11 阴离子分析柱,4X250MM，AG11 阴离子保护柱； 4X50 mm； IonPac SCS1(4×250 mm)， IonPac SCG1(4×50 mm)。查阅应用文献，其中 PA20 和 MA1 色谱柱对于多参数糖的分离有着较好的分离。由于两根色谱柱的使用方式有较大的差异（碱浓度差距较大），本研制标准采用如上的两根色谱柱进行方法的开发，结果显示两种型号的色谱柱，糖的出峰较大的差异，结果见下面论述。

2.2.2 流动相洗脱条件优化

在阴离子色谱中，常见的流动相包括氢氧化钠（NaOH）或氢氧化钾（KOH）溶液、碳酸盐或碳酸氢盐溶液以及有机溶剂。这些流动相的选择需要考虑样品的性质、色谱柱的类型、检测器的灵敏度以及分离目标等因素。

2.2.2.1 氢氧化钠（NaOH）或氢氧化钾（KOH）溶液

这些强碱性溶液可以作为流动相，用于分离和洗脱阴离子。它们可以与阴离子形成离子对，从而改变阴离子在色谱柱上的保留行为。但是，这些溶液的 pH 值较高，可能会对色谱柱和检测器造成损害。

2.2.2.2 碳酸盐或碳酸氢盐溶液

这些盐类溶液也可以作为流动相，用于分离阴离子。它们具有较高的电导率，有助于提高检测的灵敏度。但是，这些溶液的 pH 值较低，可能会对色谱柱和检测器造成损害。

2.2.2.3 有机溶剂

在某些情况下，可以使用有机溶剂作为流动相的一部分，以改善分离效果或提高检测的灵敏度。然而，需要注意的是，有机溶剂的使用可能会增加色谱柱的污染和堵塞的风险。

综合以上的分析，结合色谱柱厂家指导意见，我们均选择氢氧化钠（NaOH）作为洗脱溶剂，且由于两种色谱柱在使用上的差别，本标准中分别开发了两种色谱柱优化的常见使用条件。

两种色谱柱下的优化条件结果如下：

仪器配置		戴安 ICS5000 离子色谱仪	
色谱条件			
色谱柱	Dionex CarboPac PA20, 3mm×150mm		

	PA20 保护柱 3mm×30mm				
淋洗液	B:200mM NaOH+A:H ₂ O;梯度淋洗				
流速	0.4ml/min				
柱温	20℃		检测区温	30℃	
安培检测器	脉冲积分	滤波时间常数	10s	手动增益	0
进样量	满环进样, 10μL				

表 1 PA20 色谱柱洗脱条件

时间/min	淋洗液A/%	淋洗液B/%
0.0	97.0	3.0
20.0	97.0	3.0
20.1	70.0	30.0
35.0	70.0	30.0
35.1	0.0	100
40.0	0.0	100
40.1	97.0	3.0
45.0	97.0	3.0

仪器配置	IC6300 多功能离子色谱仪				
	色谱条件				
色谱柱	Dionex CarboPac MA1, 4mm×250mm				
淋洗液	B:600mM NaOH+A:H ₂ O;梯度淋洗				
流速	0.6mL/min				
柱温	30℃		检测区温	30℃	
安培检测器	脉冲积分	滤波时间常数	10s	手动增益	0
进样量	满环进样, 25μL				

表 2 MA1 色谱柱洗脱条件

时间/min	淋洗液A/%	淋洗液B/%
0.0	85.0	15.0
87.0	85.0	15.0
87.1	0	100.0
110.0	0	100.0
110.1	85	15.0
135.0	85	15.0

2.3 分离温度和流速的优化

2.3.1 PA20 条件优化

2.3.1.1 PA20 色谱柱条件下采用不同的温度下对分离度的影响。

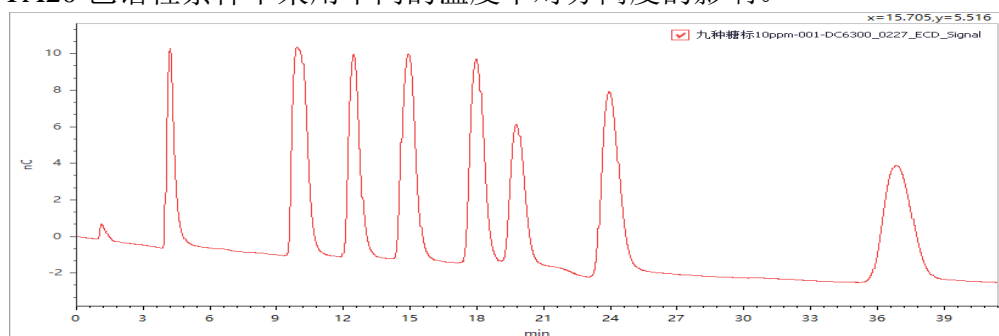


图 1 温度 40℃下，8 种糖出峰良好（未有效分离）

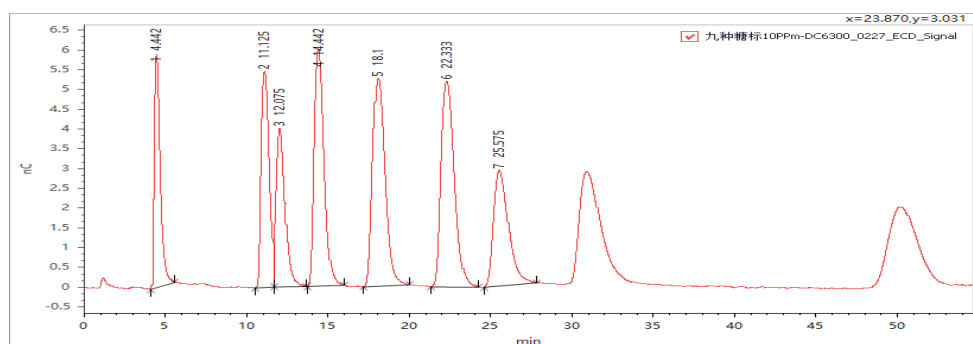
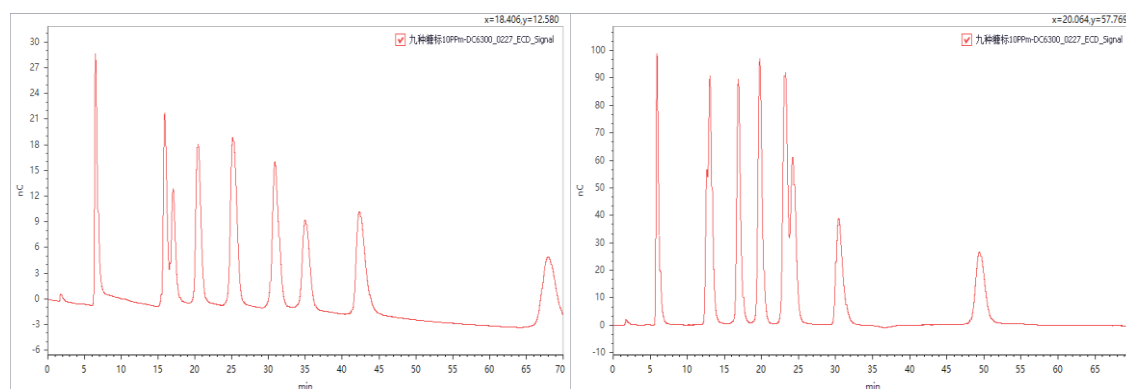


图 2 温度 20℃下，9 种糖出峰良好

小结：20℃下峰能较好的分离。

2.3.1.2 不同氢氧化钠浓度比例比较



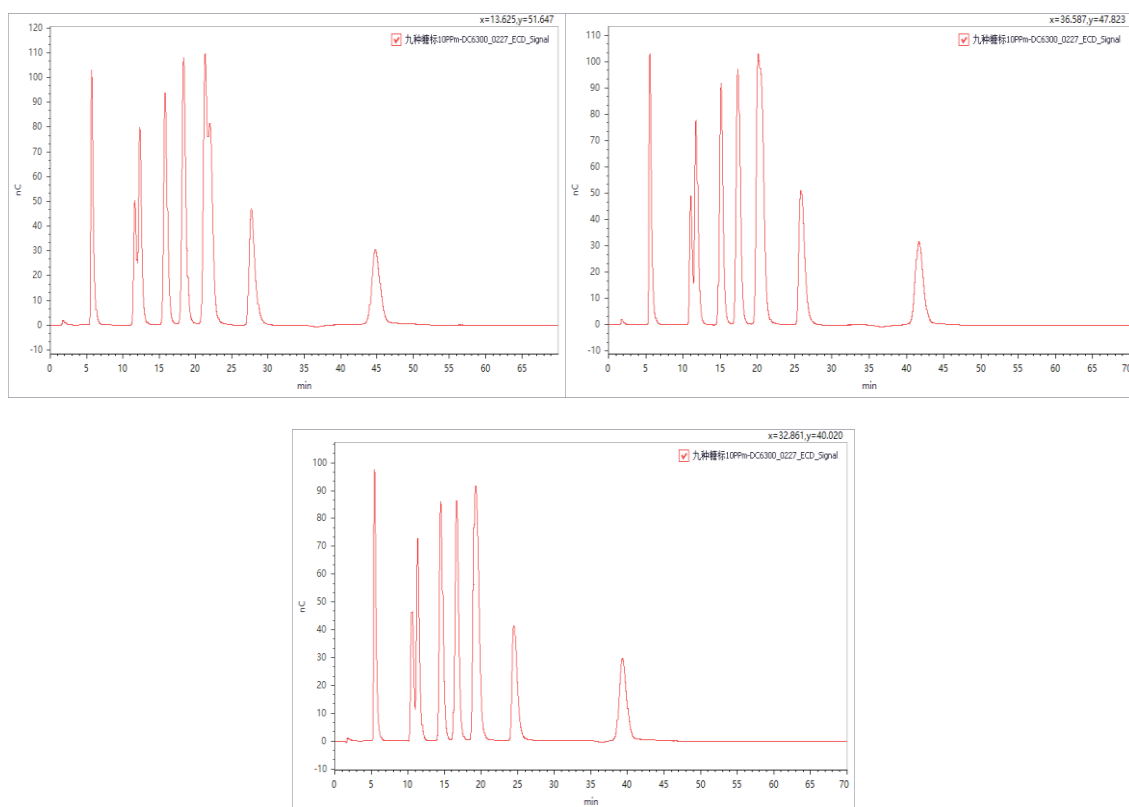


图 3 不同碱浓度的分离情况

小结：以下面 3 种条件优化流速为 0.4ml/min，温度为 20℃。研究该条件下不同氢氧化钠比例对分离度影响情况。结果为 99:1 图 A、98: 2 图 B、97:3 图 C、96:4 图 D、95:5 图 E。结果显示：氢氧化钠的浓度直接影响分离度，较少的碱有利于糖的分离。

2.3.1.3 不同的流速下比较

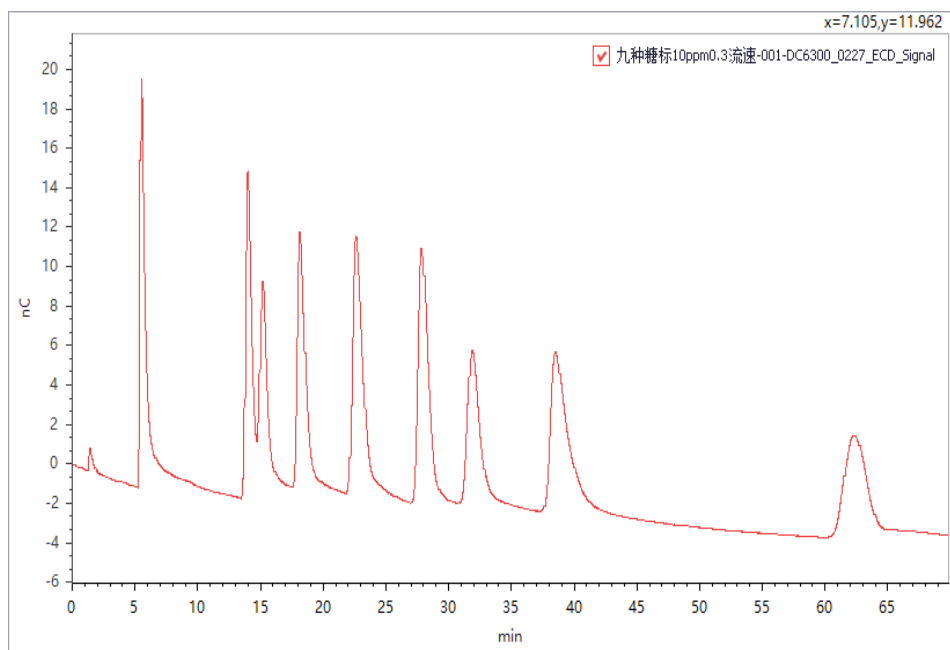


图 4 温度 20℃、流速为 0.3ml/min 条件下，9 种糖出峰良好

小结：较小的流速有利于分离，但是流速过小存在峰展宽和出峰时间变长的问题，建

议放弃。

2.3.2 MA1 条件优化

离子色谱的经验显示，碱性浓度优先于温度和流速，据此优先摸索碱性浓度的影响。

2.3.2.1 碱浓度的优化

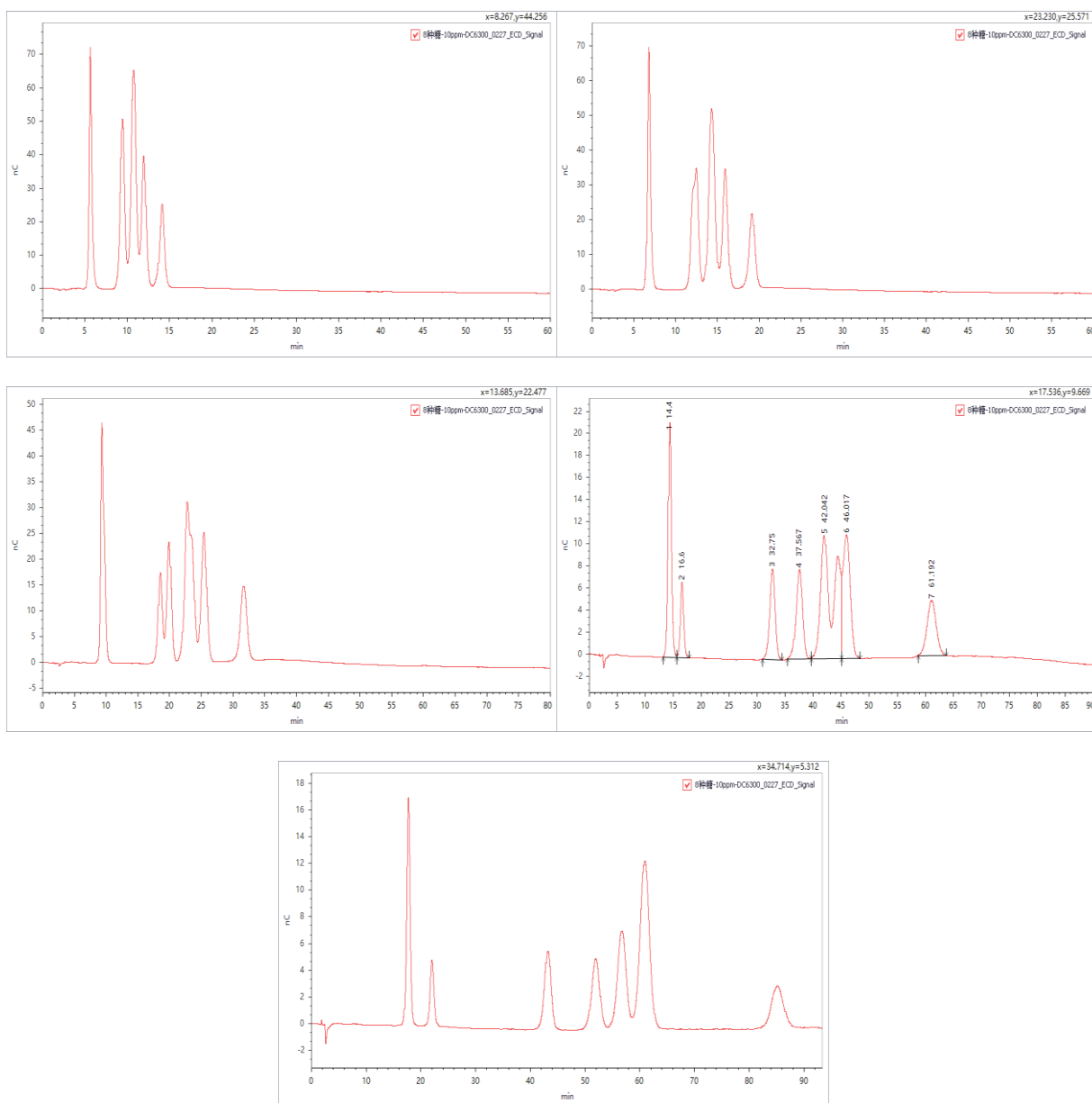


图 5 MA1 离子色谱柱在不同碱浓度下分离情况

设置 NaOH 浓度为 420mM、300mM、180mM、90mM、60mM。流速 1.0mM/min；温度 30℃ 条件下的结果展示如上，在次条件下越低浓度的碱分离效果较佳，但是未达到基线分离，以 90 mM 的分离最佳，在此基础上继续进行优化。

2.3.2.2 温度优化

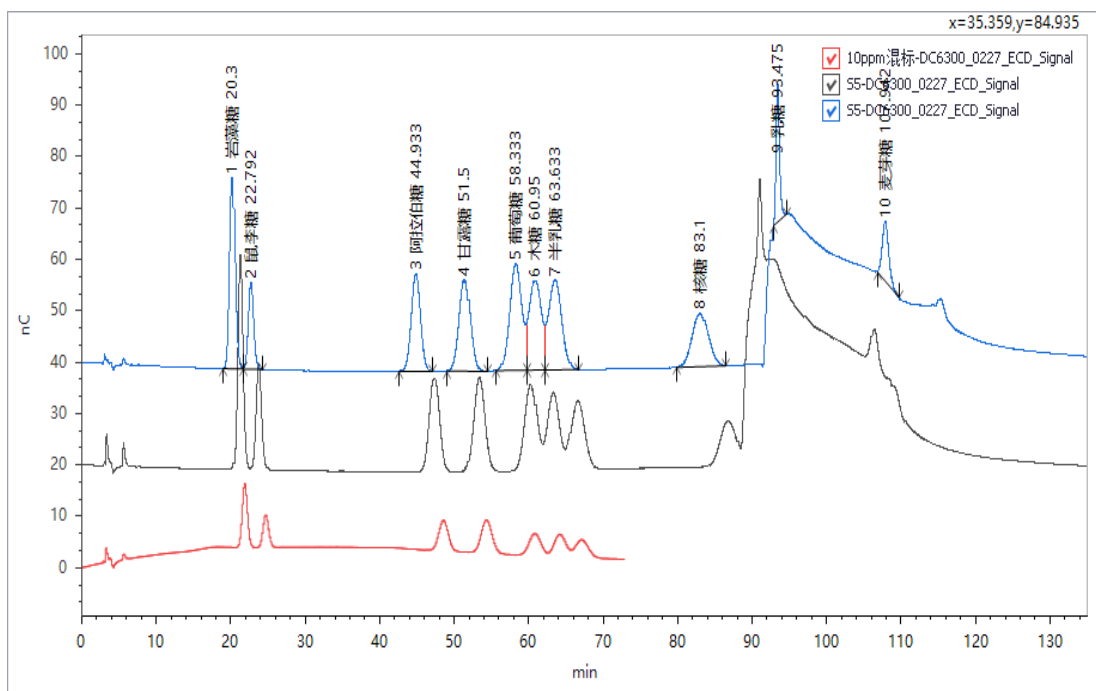


图 6 MA1 色谱柱条件下不同温度分离情况（上向下依次为 20℃、30℃、40℃）

小结：1.随着温度的上升，对葡萄糖、木糖、半乳糖的分离度有多提升。2.考虑到进行十种糖的分离实验，随着温度的升高，保留时间相应往后移动，增加了出峰时间和分析的时长，建议在 30℃ 下进行实验。

2.3.2.2 流速优化

流速在离子色谱分离度的影响不是最大的因素，在 90mM 氢氧化钠条件下，更改淋洗液流速为 1.0、0.6mL/min，研究流速对分离的影响。

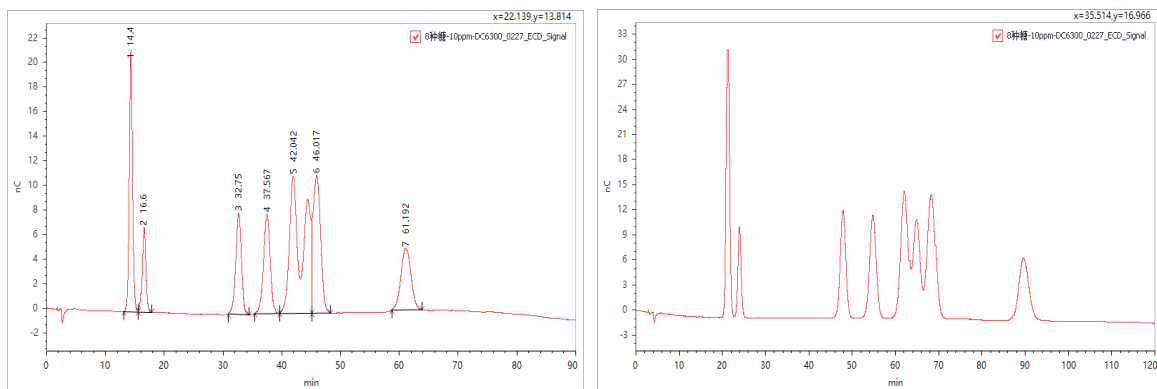


图 7

在 0.6mL/min 条件下，八种糖出现明显分离，中间三个峰分离度不够理想。综合以上条件的优化，条件 1 色谱柱 PA20 条件下：

a) 色谱柱： Dionex CarboPac PA20, 3 mm ×150 mm, 保护柱 3 mm ×30 mm。

b) 流速： 0.4 mL/min。

c) 进样量: 10 μ L。

d) 脉冲安培检测器: Au工作电极, Ag/AgCl参比电极。

e) 淋洗液: 淋洗液 A: 水; 淋洗液 B: 氢氧化钠溶液 (200 mmol/L);

f) 柱温: 20 $^{\circ}$ C。

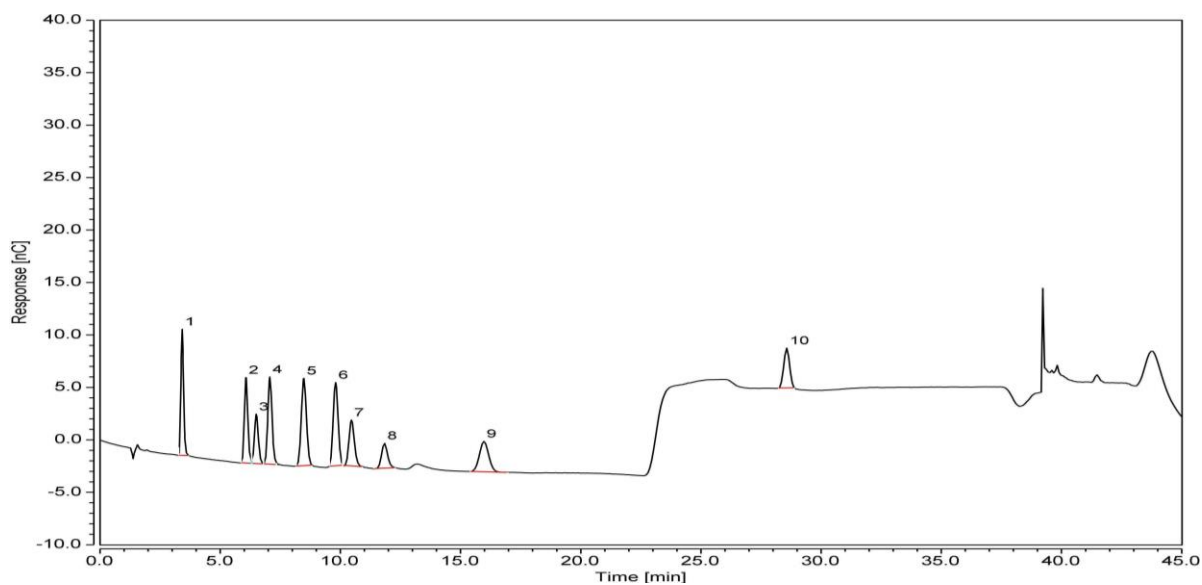


图8 出峰顺序1岩藻糖、2阿拉伯糖、3鼠李糖、4半乳糖、5葡萄糖、6甘露糖、7木糖、8核糖、9乳糖、10麦芽糖。

条件 2 色谱柱 MA1 条件下:

a) 色谱柱: Dionex CarboPac MA1, 4mm \times 250mm, 保护柱4 mm \times 30 mm。

b) 流速: 0.4 mL/min。

c) 进样量: 25 μ L。

d) 脉冲安培检测器: Au工作电极, Ag/AgCl参比电极。

e) 淋洗液: 淋洗液 A: 水; 淋洗液 B: 氢氧化钠溶液 (200 mmol/L);

f) 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

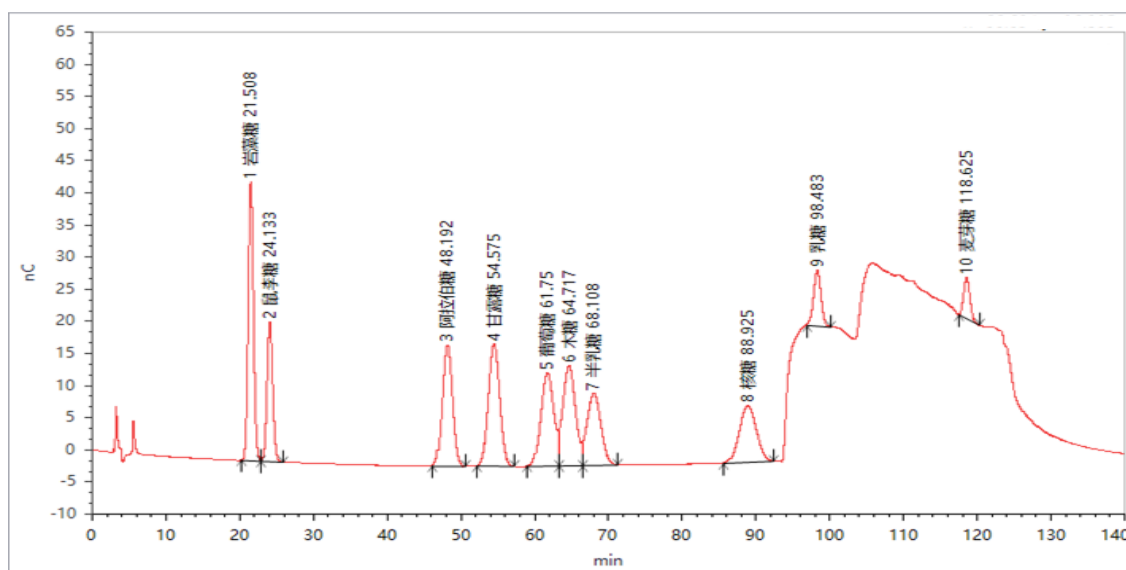
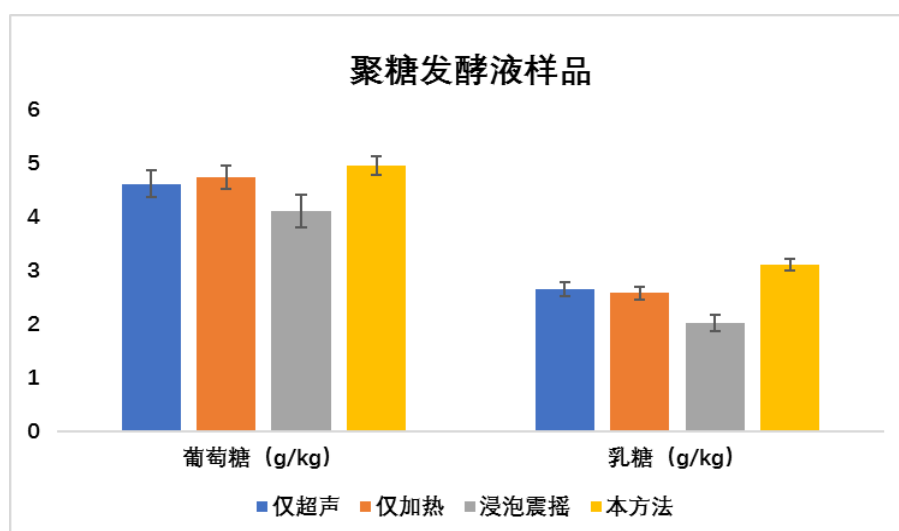


图9 出峰顺序1岩藻糖、2鼠李糖、3阿拉伯糖、4甘露糖、5葡萄糖、6木糖、7半乳糖、8核糖、9乳糖、10麦芽糖。

2.4 提取和净化方式的优化

生化制剂样品包括酶制剂、培养基、蛋白液、酶解液等，按照样品性状和特点可分为：固体制剂、含油脂及蛋白质的液体制剂、不含油脂及蛋白类液体等样品。其中蛋白质会对样品提取及后续的衍生反应产生干扰。假如进入液相色谱的待测液中含有大量蛋白质，在流动相极性，酸碱度发生变化时，非常容易产生沉淀，堵塞色谱柱，影响目标物的分离。

水是小分子还原糖的最佳提取溶剂，对于提取方法本实验采用沸水浴加热，及超声提取，并对比超声提取，仅加热提取，浸泡震荡提取，本方法提取，四种不同提取方式。前期模拟实验以乳粉（含大量蛋白、脂肪基质，含有乳糖及半乳糖），奶皮（含有蛋白及较多脂肪，含有乳糖及半乳糖），聚糖发酵液（含有蛋白、葡萄糖，乳糖），改良 Y 培养基（含有蛋白、葡萄糖，麦芽糖）四类样品为研究对象。结果如下图 10 所示。



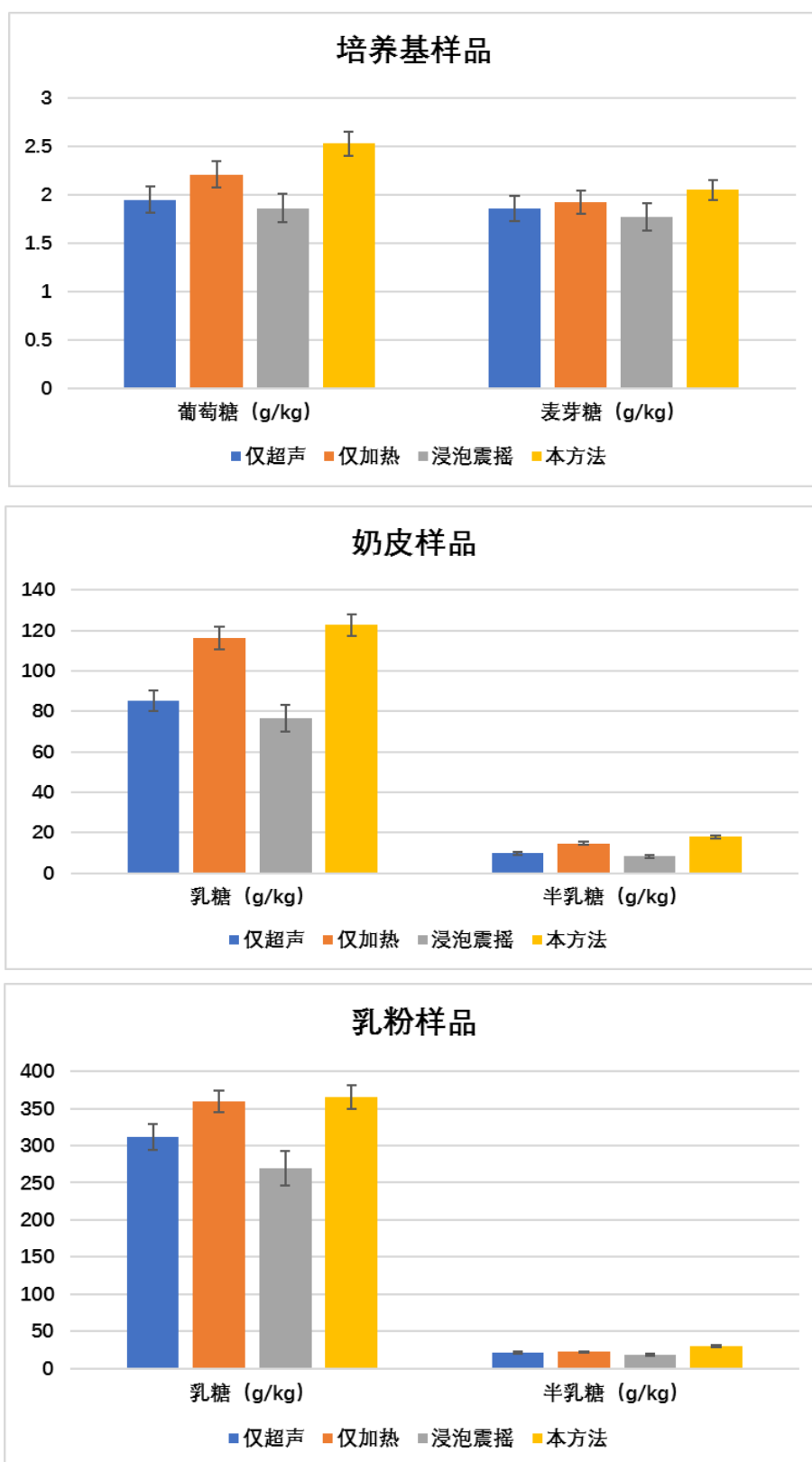


图 10 不同提取方法，对四种样品中糖类物质提取效果影响

由图 10 可知，对于液体样品，不同提取方法对最终检测结果影响较小，而含有较多蛋白质的固体样品仅采用浸泡或超声的办法，无法完全提取样品中的糖类物质，采用加热的方法，可以有效使蛋白质变性，增加提取效率，结合超声提取使目标物分子剧烈运动，

加快提取速度。

所以本方法采用，沸水浴加热结合超声提取。参考 GB/T 40980-2021 第一法中沸水时间，采用 30min 沸水浴时间；参考 GB/T 40980-2021 第一法中对油脂类的影响采用加入正己烷的方法，在定容后、放置冷的萃取液进行萃取，取澄清水层进行后续处理；在离子色谱中，依靠的是阴离子的交换作用，大含量的亚铁氰化钾、乙酸锌对于柱子的损害较大，同时也影响糖的分离，本次标准研制过程中决定放弃无机盐的使用，采用 GB 5009.8-2016 《食品安全国家标准食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定》中对于蛋白的净化，采用 C18 固相萃取柱进行蛋白和其他杂质的过滤，从原理上我们认为可行，从标准中已经得到了验证。

在 GB 5009.8-2016 中提到了利用乙酸进行糖的萃取实验，在本次的研制过程中，我们初步考察了水和 2% 乙酸水的提取对比实验，结果如表 2。

表 3 水和乙酸水溶液对培养基中的糖的提取比较

样品名称	复方消化酶胶囊（葡萄糖）		缓冲动力-硝酸盐（半乳糖）	
	水提取	2% 乙酸水提取	水提取	2% 乙酸水提取
峰面积	764	640	66998	67229

结论：在本次实验中采用同一洗脱、柱子条件下比较提取物峰面积的多少，结果显示在酸性提取效果下糖的峰面积反而变少，分析原因是酸性溶剂中和了流动相中碱性的洗脱液，使得糖的反应活性得到了改变，反而不利于定量测试，故采取水作为溶剂，使得工作曲线和提取系统一致，保证定量的测试。

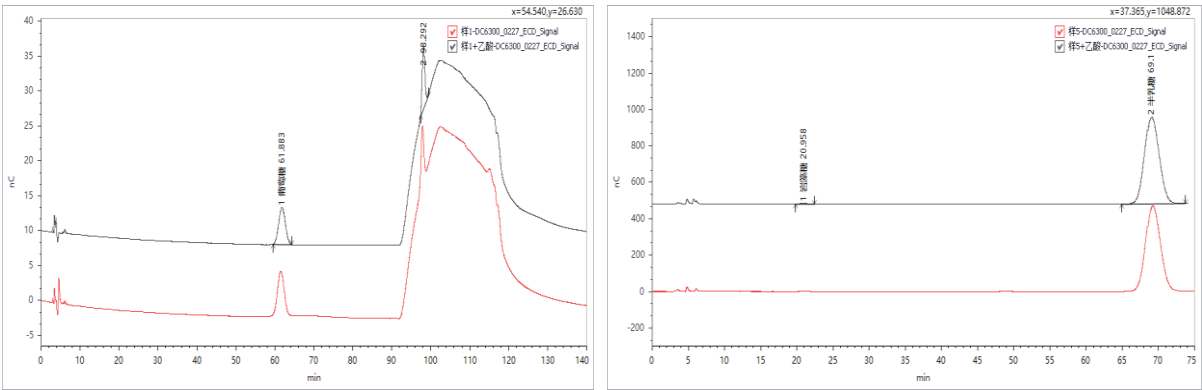


图 11 水和乙酸水提取液的比较

3 方法的实验室内验证

3.1 方法的线性范围、检出限和定量限

为了考察本方法的灵敏度，采用信噪比法计算本方法的检出限（LOD）和定量限（LOQ），以信噪比 $S/N \geq 3$ 左右的浓度确定为本方法检出限浓度，以信噪比 $S/N \geq 10$ 左右的浓度为本方法定量限浓度，具体结果见表 9、表 10，由表可知，本方法测定还原糖具有

良好的灵敏度，能够很好满足生化制品中还原糖的测定需要。

3.1.1 色谱柱 PA20 结果

测定 0.1 mg/L、0.4 mg/L、0.6 mg/L、0.8 mg/L、1.0 mg/L、6.0 mg/L、10.0 mg/L 七个系列浓度的还原糖标准溶液，以系列浓度与对应的峰面积所得线性相关系数见下表。

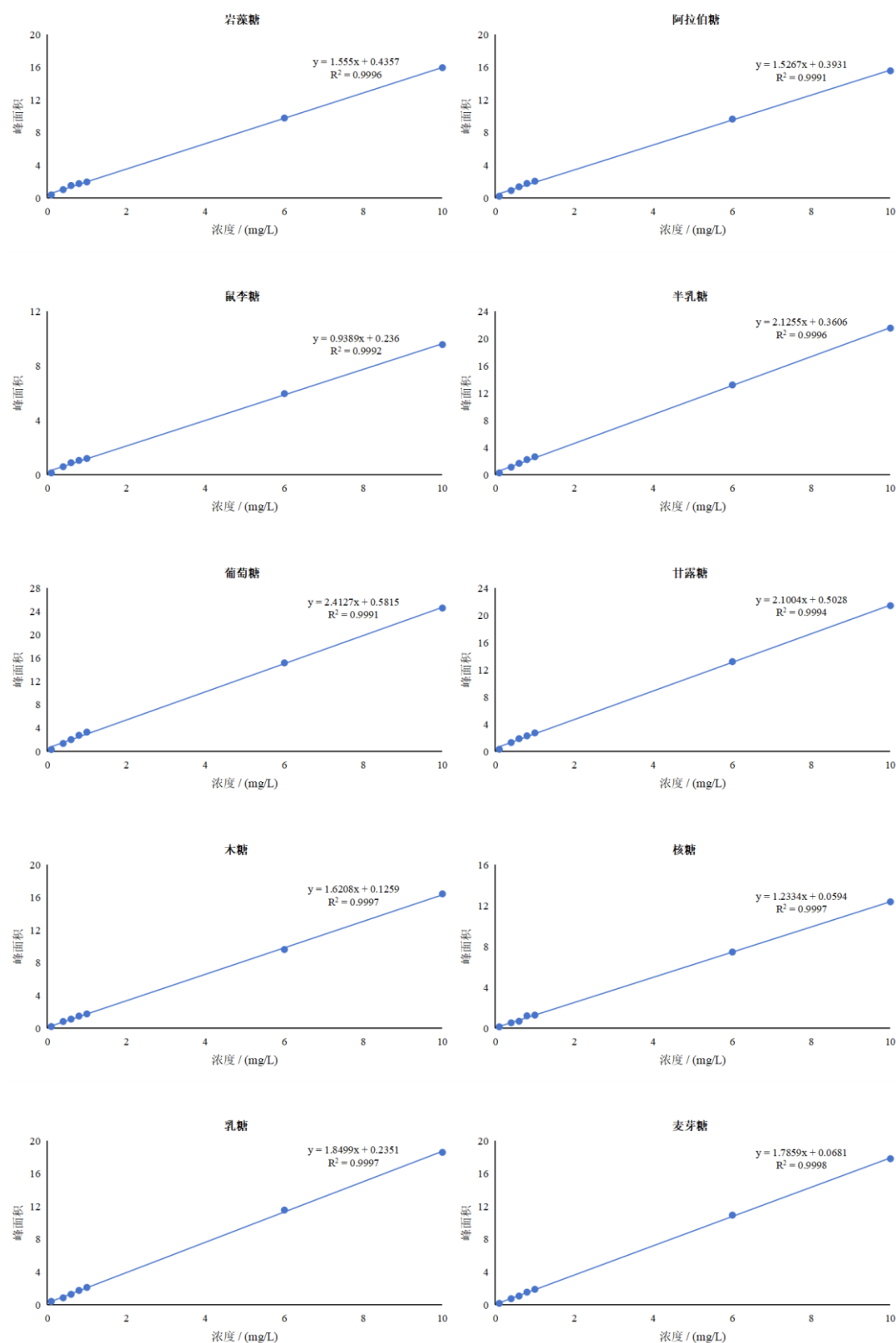


图12 10种糖工作曲线范围

表 4 还原糖的线性范围

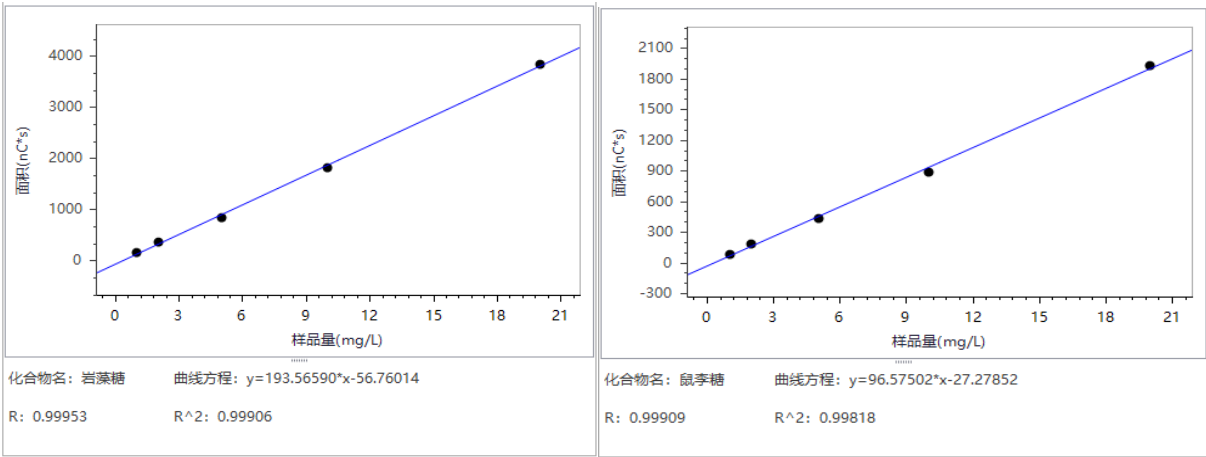
序号	化合物	线性范围	R ²
1	岩藻糖	$y = 1.555x + 0.4357$	0.9996
2	阿拉伯糖	$y = 1.5267x + 0.3931$	0.9991
3	鼠李糖	$y = 0.9389x + 0.236$	0.9992
4	半乳糖	$y = 2.1255x + 0.3606$	0.9996
5	葡萄糖	$y = 2.4127x + 0.5815$	0.9991
6	甘露糖	$y = 2.1004x + 0.5028$	0.9994
7	木糖	$y = 1.6208x + 0.1259$	0.9997
8	核糖	$y = 1.2334x + 0.0594$	0.9997
9	乳糖	$y = 1.8499x + 0.2351$	0.9997
10	麦芽糖	$y = 1.7859x + 0.0681$	0.9998

表 5 10 种还原糖标准品检出限和定量限

序号	化合物	检出限/(mg/L)	定量限/(mg/L)
1	岩藻糖	0.2	0.6
2	阿拉伯糖	0.2	0.6
3	鼠李糖	0.2	0.6
4	半乳糖	0.2	0.6
5	葡萄糖	0.2	0.6
6	甘露糖	0.2	0.6
7	木糖	0.2	0.6
8	核糖	0.2	0.6
9	乳糖	0.2	0.6
10	麦芽糖	0.2	0.6

3.1.2 色谱柱 MA1 结果

将还原糖的混合工作液配制成 1mg/L、2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L 溶液浓度。



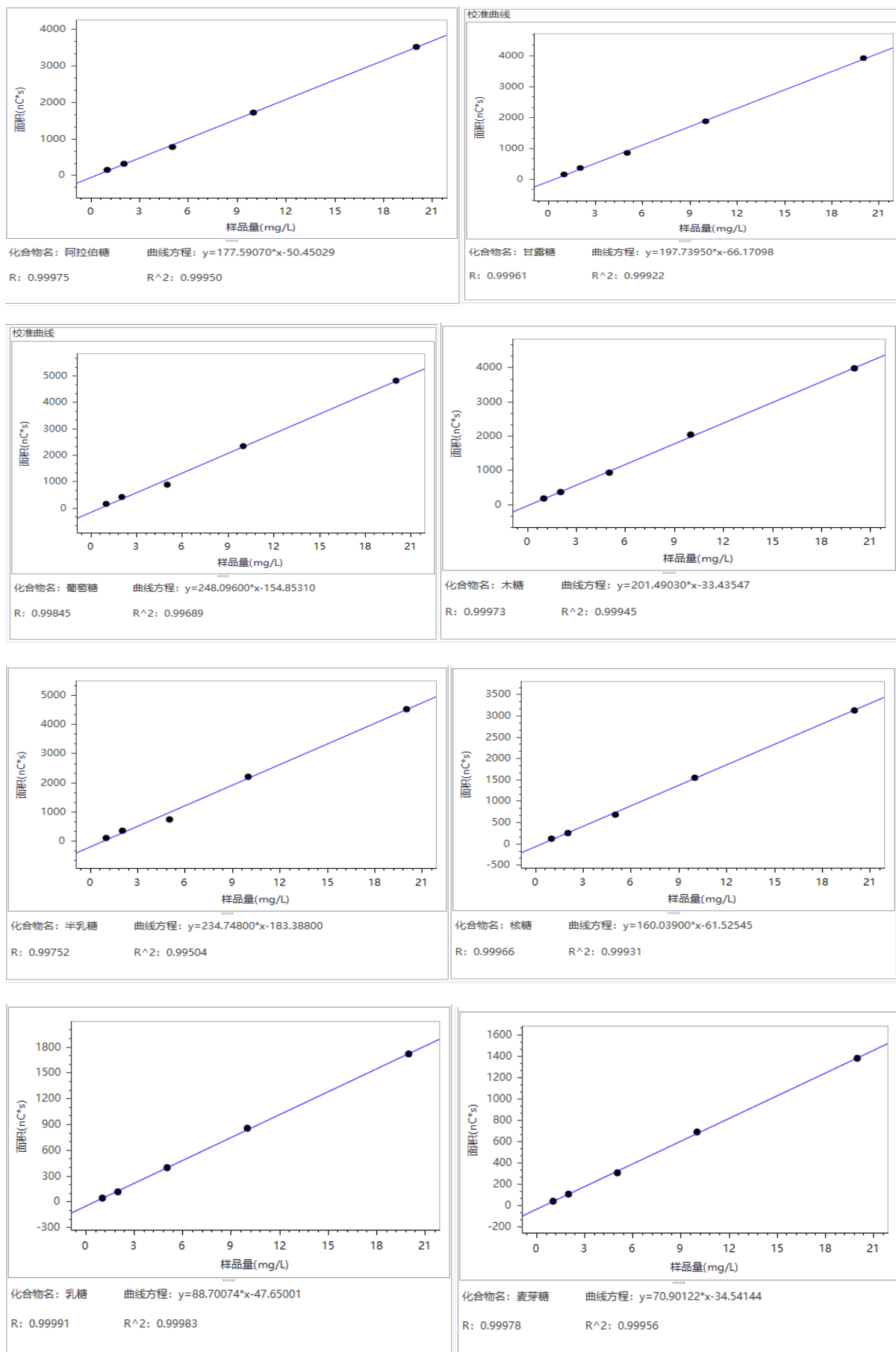


图13 10种糖工作曲线范围

表 6 10 种还原糖标准品检出限和定量限

序号	化合物	检出限/(mg/L)	定量限/(mg/L)
1	岩藻糖	0.3	1.0
2	鼠李糖	0.3	1.0
3	阿拉伯糖	0.3	1.0
4	甘露糖	0.3	1.0
5	葡萄糖	0.3	1.0
6	木糖	0.3	1.0
7	半乳糖	0.3	1.0
8	核糖	0.3	1.0
9	乳糖	0.3	1.0
10	麦芽糖	0.3	1.0

综合以上的数据得出结论：在 PA20 色谱柱上，整体上获得更低的检出限和定量限，建议使用时候优先考虑。

3.2 方法准确度（回收率）和精密度

准确称取复方消化酶、转移因子、改良 Y-培养基、葡萄糖肉汤培养基、缓冲动力-硝酸盐、木糖-明胶培养基等样品各 6 份，根据各样品中还原糖含量的情况 100%添加，分别加入适量还原糖标准储备溶液或标准品，按照本方法优化后的最佳仪器设备条件，注入离子色谱仪（PA20 色谱柱条件下）进行分析，考查本方法的加标回收率情况，具体结果见表 7，结果可见在 100%添加的时候回收率范围 91.39%~96.51%，说明本方法测定复方消化酶等样品中还原糖含量具有良好的准确度。

表 7 100%添加下的不同样品回收率结果（%）

名称	本底值 %	结果 1	结果 2	结果 3	结果 4	结果 5	结果 6	平均 值	RSD (%)
复方消化酶胶囊 (乳糖)	4.91	95.2	95.3	93.1	93.5	99.8	99.2	96.04	2.60
转移因子胶囊 (核糖)	0.049	94.2	89.1	89.6	91.6	92.5	91.6	91.39	1.72
木糖-明胶培养基(木糖)	0.26	98.4	88.5	96.3	91.4	92.5	90.3	92.90	3.42
缓冲动力-硝酸盐(甘露糖)	0.38	98.7	91.5	89.9	90.5	96.3	95.1	93.64	3.25
改良 Y-培养基 (乳糖)	7.87	98.2	100.2	96.5	92.3	95.5	96.1	96.51	2.43
葡萄糖肉汤培养基(葡萄糖)	11.57	94.2	96.3	101.1	96.4	94.1	95.3	96.21	2.36

3.3 方法稳定性和耐用性

还原糖在水溶液中的稳定性做了考察（PA20 色谱柱条件下），结果显示在 12 小时以内还原糖标准物质在水溶液中稳定性 RSD 均小于 5%，证明方法是可行的，样品在过夜的测试中能保持相对稳定的结果，乳糖和麦芽糖 RSD 略大，与出峰时间较晚，基线飘逸有关，可以进一步优化。

表 8 5mg/L 浓度下的工作曲线的稳定性（时间和峰面积）考察

序号	化合物	时间节点					平均值	RSD%
		0h	2h	4h	8h	12h		
1	岩藻糖-t（min）	20.475	20.608	20.8	20.933	21.083	20.78	1.1
	峰面积	916.584	936.128	947.804	950.109	934.781	937.081	1.3
2	鼠李糖-t（min）	22.975	23.117	23.317	23.458	23.608	23.295	1.1
	峰面积	465.282	479.479	492.99	496.73	491.643	485.225	2.4
3	阿拉伯糖-t（min）	45.25	45.533	46.025	46.433	46.908	46.03	1.5
	峰面积	833.575	845.81	841.851	841.427	821.704	836.873	1.0
4	甘露糖-t（min）	51.642	51.775	52.225	52.65	53.142	52.287	1.2
	峰面积	920.452	951.047	955.411	949.501	917.255	938.733	1.7
5	葡萄糖-t（min）	58.467	58.542	59.05	59.558	60.158	59.155	1.2
	峰面积	947.001	914.54	902.24	891.666	853.988	901.887	3.3
6	木糖-t（min）	58.467	58.542	59.05	59.558	60.158	59.155	1.2
	峰面积	954.28	957.855	916.917	913.893	873.277	923.244	3.3
7	半乳糖-t（min）	61.175	61.342	61.908	62.425	63.025	61.975	1.2
	峰面积	799.023	796.998	783.661	774.194	744.931	779.761	2.5
8	核糖-t（min）	63.933	64.133	64.842	65.492	66.25	64.93	1.5
	峰面积	693.69	685.983	672.405	658.602	677.564	677.649	1.8
9	乳糖-t（min）	83.633	83.867	84.708	85.525	86.492	84.845	1.4
	峰面积	363.211	340.901	340.114	292.035	341.687	335.590	4.98
10	麦芽糖-t（min）	93.533	93.483	93.617	93.708	93.875	93.643	0.17
	峰面积	344.061	357.66	339.954	316.739	324.844	336.652	4.3

分别微调流速、柱温（PA20 色谱柱条件下），考察两个条件微小变化时对检测结果的影响。具体结果见表 20。由结果可知：在微调流速、柱条件下，各样品检测结果与原条件检测结果 RSD% 范围 0.77%~2.82%，均小于 5%，方法耐用性良好。

表9 方法耐用性测试结果

样品名称 (参数)	含量 (%)							平均 值	RSD/%
	原结果	柱温/°C			流速/(mL/min)				
		25	27	32	0.55	0.65	0.7		
复方消化酶胶囊 (乳糖)	4.91	4.79	4.86	4.93	4.83	4.85	4.78	4.84	1.03

转移因子胶囊（核糖）	0.049	0.0485	0.0489	0.0491	0.0493	0.0486	0.0492	0.05	1.02
木糖-明胶培养基（木糖）	0.26	0.251	0.242	0.249	0.2458	0.2514	0.248	0.25	1.34
缓冲动力-硝酸盐（甘露糖）	0.38	0.38	0.36	0.37	0.354	0.38	0.37	0.37	2.82
改良 Y 培养基(乳糖)	7.87	7.83	7.71	7.76	7.86	7.89	7.82	7.81	0.77
葡萄糖肉汤培养基（葡萄糖）	11.57	11.27	11.22	11.32	11.57	11.36	11.42	11.36	1.00

（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

1 实验材料及仪器

1.1 试剂

1.1.1 氢氧化钠（NaOH）：色谱纯。

1.1.2 正己烷（C₆H₆）：分析纯。

0.22 μm 微孔滤膜（有机相）。除特殊说明外，本方法所用试剂均为分析纯，实验用水均为 GB/T 6882 规定的一级水。

1.2 溶液

1.2.1 氢氧化钠溶液（200 mmol/L）：称取 8.00g 氢氧化钠，溶于水稀释至 1000 mL，混匀。

1.3 仪器

1.3 离子色谱仪：脉冲安培检测器，Au 工作电极，Ag/AgCl 参比电极。

1.4 标准品

1.4.1 L-岩藻糖（CAS：2438-80-4，纯度：≥99.0%，或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质）。

1.4.2 D-阿拉伯糖（CAS：10323-20-3，纯度：≥99.0%，或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质）。

1.4.3 L-鼠李糖（CAS：3615-41-6，纯度：≥99.0%，或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质）。

1.4.4 D-半乳糖（CAS：59-23-4，纯度：≥99.0%，或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质）。

1.4.5 D-葡萄糖（CAS：50-99-7，纯度：≥99.0%，或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质）。

- 1.4.6 D-甘露糖（CAS：3458-28-4，纯度：≥99.0%，或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质）。
- 1.4.7 D-木糖（CAS：6763-34-3，纯度：≥99.0%，或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质）。
- 1.4.8 D-核糖（CAS：50-69-1，纯度：≥99.0%，或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质）。
- 1.4.9 D-乳糖（CAS：63-42-3，纯度：≥99.0%，或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质）。
- 1.4.10 D-麦芽糖（CAS：69-79-4，纯度：≥95.0%，或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质）。

2 实验方法

2.1 实验步骤

2.1.1 样品制备

取有代表性的样品至少50 g，固体样品（液体样品混匀直接待用）用电动粉碎机粉碎（过孔径为0.3 mm的筛），混匀后装入洁净的盛样容器内，作为试样，室温密封储存。

2.2 样品提取处理

2.2.1 含油脂及蛋白类液体样品前处理

称取样品1 g（精确到0.001 g）于50 mL离心管中，加入20 mL水，在沸水浴中提取30 min，超声提取10 min；样液冷却后，用水定容至50 mL容量瓶中；取部分澄清水层，加入正己烷5 mL，振摇或涡旋2 min，于5000 r/min离心5 min。取水层清液待净化。

2.2.2 不含油脂及蛋白类液体样品前处理

称取样品1 g（精确到0.001 g）于50 mL离心管中，加水至40 mL，在沸水浴中提取30 min，超声提取10 min；样液冷却后，转移至50 mL容量瓶中定容，充分振摇，于5000 r/min离心5 min，取水层清液待净化。

2.3 试样净化

试样提取溶液可根据试样中目标糖含量稀释适当的倍数。

上述试样提取溶液或稀释溶液采用离心获取上清液后，经过C₁₈固相萃取小柱，弃去前3mL，收集后续洗脱液过0.22μm滤膜待测。C₁₈固相萃取小柱使用前依次用10mL甲醇、15mL水活化，静置30min。

2.3 仪器色谱参考条件

- a) 色谱柱：阴离子交换柱（带保护柱），或等效的色谱柱。
- b) 流速：0.4 mL/min。
- c) 进样量：10 µL。
- d) 脉冲安培检测器：Au工作电极，Ag/AgCl参比电极。
- e) 淋洗液：淋洗液A：水；淋洗液 B：氢氧化钠溶液（200 mmol/L）；梯度洗脱条件参见表1。

表 10 参考洗脱条件

时间/min	淋洗液A/%	淋洗液B/%
0.0	97.0	3.0
20.0	97.0	3.0
20.1	70.0	30.0
35.0	70.0	30.0
35.1	0.0	100
40.0	0.0	100
40.1	97.0	3.0
45.0	97.0	3.0

2.4 标准曲线的制作

以混合标准工作液中目标糖的浓度为横坐标，以响应值为纵坐标，绘制标准工作曲线。
10种还原糖标准品色谱图见附录A中图A.1。

2.5 样品的测定

将待测样品液上机测定，记录色谱图，根据保留时间定性，记录峰面积，根据标准曲线计算待测样品液中糖的浓度。

2.6 分析结果计算与表示

试样中可溶性糖含量按照式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times K}{m \times 1000 \times 10} \dots\dots\dots(1)$$

- 式中：
- X——试样中含量，单位为克每百克（g/100g）；
 - ρ——由标准工作曲线得到的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
 - V——定容的体积，单位为毫升（mL）；
 - K——稀释倍数；
 - m——试样的称样量，单位为克（g）；
 - 10——换算系数；
 - 1000——换算系数。

糖的含量 ≥ 10 g/100g时，计算结果保留3位有效数字；糖的含量 < 10 g/100g时，计算结果保留2位有效数字。

2.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

2.8 检出限和定量限

本方法测定10种还原糖的参考检出限和定量限见表2。

表 11 10 种还原糖检出限和定量限

序号	化合物	检出限/(mg/L)	定量限/(mg/L)
1	岩藻糖	0.2	0.6
2	阿拉伯糖	0.2	0.6
3	鼠李糖	0.2	0.6
4	半乳糖	0.2	0.6
5	葡萄糖	0.2	0.6
6	甘露糖	0.2	0.6
7	木糖	0.2	0.6
8	核糖	0.2	0.6
9	乳糖	0.3	1.5
10	麦芽糖	0.2	0.6

4.方法验证

根据标准要求，标准起草小组对定量限、线性与范围、准确度、精密度等关键指标参数进行了验证，实验验证样品由本标准起草单位提供，将验证样品分别委托至上海市质量监督检验技术研究院、安徽皖仪科技股份有限公司、甘肃中商食品质量检验检测有限公司、四川省农业科学院分析测试中心、四川省饲料工作总站。

表 12 实验室间比对样品选择

序号	样品名称	测试参数	入选理由
1	复方消化酶胶囊	乳糖	固体制剂、淀粉含量较高
2	木糖-明胶培养基	木糖	半固体、油脂、蛋白含量较高、含量较小
3	缓冲动力-硝酸盐	甘露糖	固体、蛋白含量较高、高盐、含量较小
4	葡萄糖肉汤培养基	葡萄糖	固体、蛋白含量较高、高盐

表13 上海市质量监督检验技术研究院重复性验证结果（单位：g/100g）

样品名称(参数)	结果 1	结果 2	结果 3	结果 4	结果 5	结果 6	平均值	RSD/%
复方消化酶胶囊（乳糖）	4.60	4.70	4.60	4.60	4.50	4.50	4.58	1.64

木糖-明胶培养基(木糖)	0.24	0.25	0.25	0.25	0.23	0.23	0.24	4.07
缓冲动力-硝酸盐(甘露糖)	0.33	0.34	0.37	0.35	0.35	0.36	0.35	4.04
葡萄糖肉汤培养基（葡萄糖）	10.80	11.10	11.30	10.80	10.70	10.20	10.82	3.48

表14 安徽皖仪科技股份有限公司重复性验证结果（单位：g/100g）

样品名称(参数)	结果 1	结果 2	结果 3	结果 4	结果 5	结果 6	平均值	RSD/%
复方消化酶胶囊（乳糖）	4.50	4.60	4.60	4.60	4.50	4.40	4.53	1.80
木糖-明胶培养基(木糖)	0.25	0.26	0.24	0.25	0.24	0.24	0.25	3.31
缓冲动力-硝酸盐(甘露糖)	0.35	0.36	0.35	0.35	0.34	0.35	0.35	1.81
葡萄糖肉汤培养基（葡萄糖）	10.30	11.10	11.40	10.30	10.70	10.90	10.78	4.08

表15 甘肃中商食品质量检验检测有限公司重复性验证结果（单位：g/100g）

样品名称(参数)	结果 1	结果 2	结果 3	结果 4	结果 5	结果 6	平均值	RSD/%
复方消化酶胶囊（乳糖）	4.40	4.50	4.60	4.60	4.50	4.40	4.50	1.99
木糖-明胶培养基(木糖)	0.26	0.25	0.26	0.25	0.24	0.25	0.25	2.99
缓冲动力-硝酸盐(甘露糖)	0.36	0.34	0.35	0.36	0.35	0.36	0.35	2.31
葡萄糖肉汤培养基（葡萄糖）	10.70	10.90	11.20	10.50	10.70	10.80	10.80	2.19

表16 四川省农业科学院分析测试中心重复性验证结果（单位：g/100g）

样品名称(参数)	结果 1	结果 2	结果 3	结果 4	结果 5	结果 6	平均值	RSD/%
复方消化酶胶囊（乳糖）	4.50	4.60	4.60	4.60	4.50	4.60	4.57	1.13
木糖-明胶培养基(木糖)	0.24	0.25	0.24	0.24	0.24	0.25	0.24	2.12
缓冲动力-硝酸盐(甘露糖)	0.35	0.35	0.35	0.36	0.37	0.36	0.36	2.29
葡萄糖肉汤培养基（葡萄糖）	10.80	10.90	10.80	10.20	10.70	10.40	10.63	2.57

表17 四川省饲料工作总站重复性验证结果（单位：g/100g）

样品名称(参数)	结果 1	结果 2	结果 3	结果 4	结果 5	结果 6	平均值	RSD/%
复方消化酶胶囊（乳糖）	4.40	4.40	4.50	4.60	4.30	4.30	4.42	2.65
木糖-明胶培养基(木糖)	0.26	0.25	0.25	0.24	0.27	0.24	0.25	4.65
缓冲动力-硝酸盐(甘露糖)	0.33	0.33	0.34	0.35	0.35	0.35	0.34	2.88
葡萄糖肉汤培养基（葡萄糖）	10.50	10.30	10.10	10.20	10.50	10.40	10.33	1.58

共 5 家验证单位在重复性条件下获得的独立测定结果稳定（RSD<5%）与起草单位测试结果一致范围，满足该标准要求。说明该方法稳定可靠。

5、经济与社会效益

本项目针对当前生物制品中还原糖的检测没有国家标准的前提下，通过前期的文献

调研和后期的预试验，考察了甘露糖、核糖、鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖 10 种还原糖的线性范围，精密度，检出限、回收率，初步得到生化制品中 10 种还原糖的检测标准草案。制定过程中反复与同行专家进行深入交流研讨，重复测试并综合实验效果，建立了《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》。本文件为规范生化制品中还原糖的含量以及建立稳定的还原糖评价打好良好的基础，有利于市场监管和产品优化。

（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

国内尚无专门针对 10 种还原糖测定的离子色谱标准方法，本研究建立的《生化制品中还原糖的测定 离子色谱法》应用价值较大，制定项目有着必要性。

（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

无 10 种还原糖离子色谱法国际标准的。

（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系

本标准严格按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草，符合国家相关法律法规要求，与现行法律法规和强制性标准没有冲突。

（七）重大分歧意见的处理经过和依据

无。

（八）涉及专利的有关说明

无。

（九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议 建议标准实施前有 6 个月以上的宣贯培训期、缓冲期和过渡准备时间。

（十）其他应予说明的事项

无。

标准起草组

2025 年 03 月