

国家标准《多糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-  
激光光散射法》  
(征求意见稿)

编制说明

《多糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-激光光散射法》标  
准起草组  
2025 年 6 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 .....	5
（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 .....	8
（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 .....	10
（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 .....	11
（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系 .....	11
（七）重大分歧意见的处理经过和依据 .....	11
（八）涉及专利的有关说明 .....	11
（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 .....	11
（十）其他应予说明的事项 .....	11

# 国家标准《多糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-激光光散射法》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年第二批国家标准计划项目（国标委发[2024]18号），本项目计划编号为 20240918-T-469，名称为 多糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-激光光散射法。

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。

本标准由河北省食品检验研究院等联合起草。

## 2、目的和意义

多糖是由 10 个以上单糖分子通过线性或支链糖苷键聚合而成的天然大分子多聚物。随着分子生物学的发展，人们逐渐认识到多糖与蛋白质、核酸一样，是涉及生命活动本质的三类生物大分子之一，具有免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗辐射、延缓衰老、抗感染等生理活性。多糖架构复杂，稳定性差。部分企业由于提取和纯化工艺缺陷，生产标准化不足，难以保证产品的质量。因此，造成市场上的多糖产品质量良莠不齐，纯度和生物活性差异明显。目前国内外尚无相应的质量控制标准，市场混乱，多糖用户更偏向使用进口产品，国内企业举步维艰。多糖的分子量是其研发、生产及其应用的重要关键性指标，这是因为：1、多糖分子量是影响多糖生物活性的主要指标之一，相对分子质量过大的多糖不利于跨膜发挥生物效应，相对分子质量过小的多糖没有生物活性；2、由于多糖成分没有特异的鉴别反应和专属分析方法。因此，对多糖相对分子质量及其分布是多糖的重要识别特征之一，是行业内公认的鉴别手段。企业间通过测定其重均相对分子质量和数均相对分子质量作为控制多糖的质量指标，间接反映多糖组分的纯度。

多糖分子量测定的标准化方法是多糖质量控制和质量检测中的关键指标，是多糖产品标准化的基石，因此亟需建立起多糖分子量的标准化检测方法，维护行业的健康发展。根据文献调研发现，测定多糖相对分子质量的方法主要有：黏度法、超离心法、光散射法、渗透压法、凝胶色谱法、高效凝胶渗透色谱法以及联用法等。黏度法仪器简单，但受测试人员主观因素影响较大；超离心法仪器昂贵，操作复杂，花费时间长，不易普及推广；光散射法适用于成分单一，分布较窄的多糖分子；渗透压法所测为数均相对分子质量，它适用于 10<sup>4</sup>~10<sup>6</sup> 相对分子质量范围。客观比较其各自优缺点，为了实验方便，减少误差，提高相对分子质量测定的准确性，高效凝胶渗透色谱法作为测定多糖相对分子质量及分子

分布的首选方法。《中国药典》2015 年版附录规定采用高效凝胶渗透色谱法结合示差折光检测器测定多糖相对分子质量，示差检测器灵敏度较低，对环境、温度、流动相组成极其敏感且不能进行梯度洗脱，且高效凝胶渗透色谱方法中葡聚糖与样品多糖结构之间的差异可能会引起结果误差。

目前，高效凝胶渗透色谱-激光光散射法已成为测定聚合物分子量一种非常有效的工具，该方法测定分子量时受聚合物结构及分子量的限制较小，操作简单，有较高的精度。与传统凝胶渗透色谱相比，无需标样校正，无需建立标准曲线，能直接测出绝对分子量及其分布，因而受到越来越多的关注。该方法兼具了高效凝胶渗透色谱法和光散射法的特点，高效凝胶渗透色谱仪可将溶液中的高分子按分子流体力学体积顺序依次洗脱出来，因此不仅可测定单一聚合物，还可测定高分子混合物。分子按大小顺序依次进入多角度激光光散射仪确定分子量，绘制出分子量分布图，直接测出绝对重均分子量及分子量分布。本研究采用高效凝胶渗透色谱法-激光光散射技术建立果胶、海藻酸钠和葡聚糖等食品添加剂中水溶性多糖的分子量和分子量分布的测定方法，结果用数均相对分子质量、重均相对分子质量以及分布系数等来综合反应样品的相对分子质量，更加全面而准确地反应多聚物产品所具有的性质。

### 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6月至2022年12月，标准起草单位组织相关技术人员对《多糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-激光光散射法》标准项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外关于多糖分子量和分子量分布标准、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化交流研讨会的通知》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综合〔2024〕18号《国家标准委关于下达2024年第二批国家标准制修订计划的通知》立项文件，计划编号：20240918-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标准《多糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-激光光散射法》的起草工作，与会专家就《多

糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-激光光散射法》标准（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《多糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-激光光散射法》标准的起草研制工作。完成了《多糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-激光光散射法》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《多糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-激光光散射法》标准（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《多糖分子量及分子量分布的测定 高效凝胶渗透色谱-激光光散射法》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

本标准起草人有：XXXX。

（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）

果胶、海藻酸钠和葡聚糖等水溶性多糖的结构、分子量和分子量分布，决定了多糖在应用中的功能。最初多糖混合物的分子量测定多采用高效凝胶渗透色谱结合示差检测器测定，该方法需要一系列已知分子量的蛋白或多糖作为标准品，根据其保留时间与分子量之间的函数关系推算多糖分子量。一般标准品多采用球形分子蛋白或中性线性多糖，多糖与标准品在溶液中形态及色谱行为的差异将造成分子量的不准确。近些年，分子排阻液相色谱串联多角度激光散射/示差（MALS/RI）检测的方法已被开发用于大分子分子量和含量的测定，该方法是一种可在无标准品的情况下准确测定分子量及含量的简单、快速、准确的大分子定量分析方法。目前广泛用于植物多糖分子的分子量，如中药中性多糖、真菌性

多糖等。本标准参照 2025 版《中华人民共和国药典》通则 0514 分子排阻色谱法建立针对胶、海藻酸钠和葡聚糖等食品添加剂（分子量范围为  $1 \times 10^3$  Da- $1 \times 10^7$  Da）中分子量和分子量分布的检测通用方法，并对实验条件和进行优化。

## 2.1 样品溶剂和流动相的选择

多糖在水中以溶胀的方式缓慢地形成溶液，选择适当浓度的氯化钠或者硝酸钠溶液作为溶剂，以屏蔽静电相互作用并减少聚集体，避免样品分子间氢键的形成，使其溶解的更均。因此试验会在常用的氯化钠溶液、硫酸钠溶液和硝酸钠溶液等水相流动相中进行选择。氯化钠溶液在水溶性多糖的 SEC-MALS 分析中具有独特优势。首先， $\text{Cl}^-$  能高效破坏多糖分子间氢键，实现快速溶解；而硝酸钠溶液因  $\text{NO}_3^-$  极性不足、硫酸钠溶液因  $\text{SO}_4^{2-}$  强水合作用，均存在溶解缓慢或不完全的问题。其次，氯化钠溶液其完全解离特性可确保基线稳定性（RI 检测器噪声  $<0.5$  mV），且对色谱柱无吸附作用，在色谱兼容性上表现更好。以往文献实验数据显示，NaCl 体系的分子量测定回收率达 99.2%，重复性误差（RSD） $<3\%$ ，均显著优于其他盐类体系；此外，NaCl 具有成本低廉、安全性高的特点。因此，本标准选用 0.2mol/L 氯化钠溶液作为样品溶剂和流动相。试验中常在流动相中添加一定量的叠氮化钠，起到抑制微生物污染的作用；但叠氮化钠（ $\text{NaN}_3$ ）是一种具有高毒性的化合物，其毒性主要体现在对生物体的多重危害机制及潜在风险上，出于采购方式和检验人员安全性的考虑，及时更换流动相，或者低温保存的方式也能起到抑制流动相中微生物污染的作用。

## 2.2 色谱柱的选择

由于水溶性多糖具有易溶于水的特性，应在分子量范围内选择适宜的水性凝胶色谱柱。比较不同厂家的常用水性凝胶色谱柱，发现部分厂家的水性凝胶色谱柱存在柱流失现象；激光光散射检测器与凝胶渗透色谱联用技术中，柱流失会造成基线噪音增大，干扰正常的检测操作。为了解决这一问题，对市面上主流的色谱柱进行了比较，如 Shodex Ohpak 系列色谱柱或 TSKge1 GMPW 凝胶色谱柱。在选择多糖分子量及其分布检测的色谱柱时，主要依据分离度、样品保留时间以及峰型对称性等指标。通过综合评估这些指标，最终筛选出最适合的色谱柱，以确保检测结果的准确性和可靠性。

## 2.3 流速的选择

在多糖的 SEC-MALS 分析中，流速选择需兼顾分离效率、柱压限制和分子结构保护，尤其在凝胶柱串联或高分子量多糖分析时更为关键。以葡聚糖在 SEC-MALS 中分析为例，流速的选择需要根据分子量范围、色谱柱配置和分离要求进行优化。对于单柱分析（如

Shodex SB-804 HQ, 7.8 mm 内径), 推荐起始流速为 0.8 mL/min, 此时柱压通常维持在 1.5-2.5 MPa 的稳定范围。当分析高分子量葡聚糖组分 ( $>2\times 10^5\text{Da}$ ) 时, 建议将流速降低至 0.5 mL/min 以避免剪切力导致的分子降解; 而对于低分子量组分 ( $<1\times 10^4\text{Da}$ ), 可将流速提升至 1.0 mL/min 以提高分析效率。在双柱串联分析 (如 SB-803 HQ + SB-805 HQ 组合) 时, 初始流速应设为 0.6 mL/min, 监测系统总压, 需控制在 3.5 MPa 以下。若出现关键峰分离不足, 需进一步降低流速至 0.4 mL/min; 若系统压力过高, 应以降低溶液粘度。实验数据表明, 在 0.5 mL/min 的流速下, 色谱柱组合理论塔板数  $N>35000/\text{米}$ , 分离度  $R>1.7$ , 高分子量葡聚糖 ( $>2\times 10^5\text{Da}$ ) 的测定结果表现出良好的准确性和重复性 ( $M_w=198\text{ kDa}\pm 2\%$ ,  $n=3$ )。这些参数设置既保证了分离效率, 又最大限度地保护了多糖分子的完整性, 为获得可靠的分子量分布数据提供了方法保障。

## 2.4 不同样品浓度的进样浓度

多角度激光光散射仪灵敏度较高, 在样品浓度较低时即可以检测, 但示差折光检测器灵敏度较低, 低浓度下基线波动会给样品测定带来较大偏差, 因此, 选择合适的样品浓度对测定至关重要。以葡聚糖为例, 需平衡多角度激光光散射灵敏度与 RI 检测器信噪比要求。对于不同分子量的葡聚糖, 有不同策略。低分子量 ( $<10\text{ kDa}$ ) 的, 浓度需达 1.0 - 2.0 mg/mL 满足 RI 最小检测信号; 中分子量 (10 - 500 kDa) 的, 浓度 0.2 - 0.5 mg/mL 可兼顾两者; 高分子量 ( $>500\text{ kDa}$ ) 的, 浓度应 $\leq 0.1\text{ mg/mL}$  防浓度效应。实验时可通过浓度梯度测试, 选  $M_w$  稳定 ( $RSD<5\%$ ) 且 RI 峰高 $\geq 5\text{ mV}$  的最低浓度。若示差折光检测器响应不足, 可提高检测器增益或延长积分时间, 同时控制基线噪声。

## 3 精密度

### 3.1 准确度试验

激光光散射法是测定聚合物  $M_w$  的绝对方法, 仪器测量误差一般在 5% 以内。本实验使用激光光散射法测定已知分子量的葡聚糖标准物质, 并将实测分子量与标示分子量作比较, 考察系统准确度。由表 1 可知, 不同分子量的葡聚糖标准物质其实测值与标示值的相对误差在 3 % 以下, 说明该方法的准确度可靠。

表 1 检测葡聚糖标准物质分子量结果

葡聚糖标准物质 编号	M <sub>w</sub> 实测值/Da(n=3)			均值	RSD/%	M <sub>w</sub> 标示值 /Da	相对误差 /%
	1	2	3				
50005	12571	12876	12986	12811	1.68	12600	1.67
50006	70456	72318	71804	71526	1.34	70800	1.03
50009	555647	542572	538266	545495	1.66	549000	0.64

### 3.2 重复性试验

对三种质量份数的葡聚糖样品各 6 份进行测定，由表 2 可以看出，RSD≤5%，说明本方法重复性好。最终，在所选定的色谱条件下，测试结果表明葡聚糖的重均分子量测定误差≤2%，数均分子量和分子量分布误差均≤5%，实验获得了满意的结果，说明该方法可做为测定葡聚糖的分子量及其分布的方法。

表 2 葡聚糖样品重均分子量、数均分子量和分子量分布的检测结果 (n=6)

葡聚糖样品	M <sub>w</sub> /Da	RSD/%	M <sub>n</sub> /Da	RSD/%	分子量分布/Da	RSD/%
Y1	12875	1.85	7118	3.80	1.81	4.23
Y2	73254	0.94	54346	2.51	1.35	2.68
Y3	556484	1.56	277273	3.20	2.01	3.56

(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

除非另有说明，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

1.1.1 去离子水。

1.1.2 氯化钠。

1.1.3 微孔滤膜：0.45 μm。

### 1.2 溶液

1.2.1 0.2 mol/L 的氯化钠溶液：称取 11.69 g 氯化钠（3.2.2），用水溶解并定容至 1L。

### 1.3 仪器

1.3.1 高效液相色谱仪。

1.3.2 激光光散射检测器：配备激光光散射数据采集及处理软件。



1.3.3 示差检测器：配备数据采集及处理软件。

1.3.4 涡旋混合器。

1.3.5 控温振荡器。

## 2 实验方法

### 2.1 指标的建立

#### 2.1.1 样品溶液制备

准确称取样品 50-250 mg（精确至 0.1mg），置于 50 mL 离心管中，加流动相溶解，涡旋混匀 1 min，用流动相稀释至刻度。将离心管放入 3~8℃控温振荡器中，以 100 次/min 的摇晃频率振荡 12h，确保样品充分溶解。取出离心管，恢复至室温，溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后，待测。可视样品溶解情况调整溶液浓度。

#### 2.1.2 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：与多糖分子量范围匹配的系列凝胶柱。（根据样品的特性选择使用单根色谱柱或多根色谱柱联用，色谱柱的量程应与待测物分子量分布范围相匹配。色谱柱组合理论塔板数  $N$  要求达到每米至少 35 000，分离度  $R$  应大于 1.7。理论塔板数和分离度的计算方法参见附录 A）
- b) 流动相：0.2 mol/L 的氯化钠；
- c) 流速：0.4-1.0 mL/min；根据色谱柱选择合适的流速，不可超色谱柱的耐压值上限。
- d) 柱温和示差检测器的温度：40℃；
- e) 进样量：100-500μL，根据样品溶液在仪器的响应值适当调节进样量。

**注：**流动相为盐溶液体系，应及时更换流动相，避免微生物滋生。

### 2.2 关键指标的测定

#### 2.2.1 测定折光指数增量（ $dn/dc$ ）

称取一定量的样品配成溶液，用流动相溶液稀释后，配制成不同浓度的溶液，将溶液按浓度从低到高的顺序注入样品池中，进行测量和数据的收集，用软件处理相应的数据，得到样品的  $dn/dc$  值。

**注：**若仪器不具备直接测定样品  $dn/dc$  值的能力，可以利用软件程序估算  $dn/dc$  值，或者采用文献提供的参考值。

#### 2.2.2 样品测试

按照设定液相色谱条件对样品制备液进行测定,采集数据。处理软件可按规定的  $dn/dc$  和已知折光仪校正常数数据处理法计算多糖的相对分子质量及分子量分布。

### 2.2.3 结果计算

通过仪器配套的数据处理软件进行数据分析,并依据公式(1)、(2)和(3)计算相关参数。可直接从软件中读取样品的数均分子量( $M_n$ )、重均分子量( $M_w$ )及分子量分布指数( $D$ )。

$$M_n = \sum RI_i / \sum (RI_i / M_i) \quad (1)$$

$$M_w = \sum (RI_i M_i) / \sum RI_i \quad (2)$$

$$D = M_w / M_n \quad (3)$$

式中:

$M_n$ —数均分子量;

$M_w$ —重均分子量;

$D$ —分布系数;

$RI_i$ —供试品在保留时间*i*时的峰高;

$M_i$ —供试品在保留时间*i*时的分子量。

数均分子量( $M_n$ )、重均分子量( $M_w$ )及分子量分布指数( $D$ )三个结果均保留三位有效数字。

### 2.3 允许差

在重复性条件下获得  $M_n$  和  $M_w$  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%

## 4.方法验证

根据标准要求,标准起草小组对准确度和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清华大学、南京师范大学和华中农业大学,使用本文件规定的方法进行检测比对结果合格。

3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

该标准的制定不仅有助于提升企业的产品质量控制能力,还为多糖行业的规范化发展

提供了技术支撑，具有重要的经济和社会效益。一方面，该标准为企业提供更精准的多糖质量量化指标，其测定数据可直观反映多糖纯度，助力企业精细化管理质量，降低波动风险，推动标准化、规模化生产，提升市场竞争力与经济效益；另一方面，多糖分子量及分子量分布作为多糖产业内重要的检测指标，此标准化检测方法填补国内外空白，统一质量评价规范，避免市场混乱与质量争议，维护市场秩序，促进多糖产业可持续发展。

#### **（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**

目前国内外尚无用高效凝胶渗透色谱-激光光散射法测定多糖分子量及分子量分布的标准方法。本标准在制定过程中未采用国际标准和国外标准。

#### **（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**

本标准在制定过程中未采用国际标准和国外标准。

#### **（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**

无重大分歧意见。

#### **（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**

无。

#### **（十）其他应予说明的事项**

无

标准起草组

2025 年 6 月