



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

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

Determination of molecular weight and molecular weight distribution of
polysaccharides—High Performance gel permeation chromatography-laser light
scattering method

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件依据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。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）归口。

本文件起草单位：河北省食品检验研究院。

本文件主要起草人：XX

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

1 范围

本标准规定了高效凝胶渗透色谱-激光光散射法测定果胶、海藻酸钠和葡聚糖等食品添加剂（分子量范围为 1×10^3 Da- 1×10^7 Da）中水溶性多糖的分子量及分子量分布的测定方法和试验条件。

本标准适用于果胶、海藻酸钠和葡聚糖等食品添加剂（分子量范围为 1×10^3 Da- 1×10^7 Da）中水溶性多糖分子量及分子量分布的测定。

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。

3 原理

样品配制成溶液后，采用分子尺寸排阻色谱（SCE）分离不同分子量多糖分子，依据分子大小顺序依次进入多角度静态激光光散射（MALS），通过光散射信号确定分子量，并同步绘制分子量分布图，实现多糖分子量及分子量分布的测定。

4 试剂耗材

4.1 试剂和材料

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。

4.1.1 去离子水。

4.1.2 氯化钠。

4.1.3 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。

4.1.4 微孔滤膜：0.45 μm 。

4.2 仪器和设备

4.2.1 电子天平（精确到 0.1mg）。

4.2.2 高效液相色谱仪。

4.2.3 激光光散射检测器：配备激光光散射数据采集及处理软件。

4.2.4 示差检测器。

4.2.5 控温振荡器

4.2.6 涡旋混合器。

5 实验步骤

5.1 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。

5.2 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- 色谱柱：与多糖分子量范围匹配的凝胶柱。（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要求达到每米至少 35 000，分离度应大于 1.7。理论塔板数和分离度的计算方法参见附录 A）
- 流动相：0.2 mol/L 的氯化钠；
- 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。
- 柱温和示差检测器的温度：40℃；
- 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。

5.3 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，将溶液按浓度从稀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，或者采用文献同体系的参考值。

5.4 样品测试

按照 5.2 设定液相色谱条件对 5.1 样品制备液进行测定，采集数据。处理软件可按设定的 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。

5.5 结果计算

通过仪器配套的数据处理软件进行数据分析，并依据以下公式（1）、（2）和（3）计算相关参数，亦可直接从软件中读取样品的数均分子量（Mn）、重均分子量（Mw）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：

Mn—数均分子量；

M_w —重均分子量；

D —分布系数；

R_{li} —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。

6 允许差

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%。

附录A

(资料性附录)

理论塔板数和分离度的计算

A.1 理论塔板数 N 的计算

理论塔板数是无量纲常数，与柱效和色谱系统中分散过程相关。测定理论塔板数时的测试条件应与本标准相同。用一种相对分子量均一的纯物质，如甲醇、乙腈等，经高效凝胶渗透色谱测定，得到色谱峰，按照式(A.1)计算每米理论塔板数 N：

$$N = 16 \left(\frac{V_R}{W} \right)^2 \times \frac{100}{L} = 5.54 \left(\frac{V_R}{W_{1/2}} \right)^2 \times \frac{100}{L} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

V_R ——从样品加入到出现峰顶位置的淋洗体积；

W ——峰低宽，表示由峰的两侧曲线拐点处作出切线与基线所截得的基线宽度；

$W_{1/2}$ ——半高峰宽，表示通过色谱峰峰高的中间点做平行于峰底的直线，此直线与峰两侧相交点之间的距离；

L ——分离柱(组合)的长度，单位为厘米(cm)。

A.2 分离度 R 的计算

分离度 R 是无量纲常数，代表色谱柱和系列色谱柱的分离能力，与分散和带展宽效应相关。两个窄分布标准物质的已知分子量应不同且因数不小于 10，进样浓度不大于 0.05%，进样量不大于 100 μL 。R 可按式(A.2)计算：

$$R = \frac{2(V_2 - V_1)}{W_1 + W_2} \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

V_1 、 V_2 ——对应于样品 1 和样品 2 的两个峰值的淋洗体积；

W_1 、 W_2 ——对应于样品 1 和样品 2 的两个峰的峰底宽。