

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx.1—2013

氨基寡糖素

第 1 部分:氨基寡糖素母药

Oligosaccharins

Part 1: *Oligosaccharins* Technical Concentrates (TK)

(征求意见稿)

2014-XX-XX发布

2014-XX-XX实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

NY/T XXXX《农药 氨基寡糖素》为系列标准，分为两部分：

第 1 部分：氨基寡糖素母药

第 2 部分：氨基寡糖素水剂

本部分为 NY/T XXXX 的第 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1-2009 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。

本标准由农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业部农药检定所、中国科学院大连化学物理研究所

本标准主要起草人：

氨基寡糖素

第 1 部分:氨基寡糖素母药

1 范围

本部分规定了农药氨基寡糖素母药的要求、试验方法、标志、标签、包装、贮运及验收。

本部分适用于以寡糖素为原料，采用生化技术生产的氨基寡糖素母药。

2 规范性引用文件

下列文件对于本部分的应用是必不可少的。凡是标注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本部分。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本部分。

GB/T 191 包装储运图示标志

GB/T 1601 农药pH值的测定方法

GB/T 1604 商品农药验收规则

GB/T 1605 商品农药采样方法

GB 3796 农药包装通则

GB 5009.3 食品安全国家标准 食品中水分的测定

GB 5009.4 食品安全国家标准 食品中灰分的测定

GB/T 8170-2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 28136-2011 农药水不溶物测定方法

3 要求

3.1 外观:

本品外观通常为浅黄色至浅棕色粉末，略有酸味，无明显外来杂质。

3.2 指标

氨基寡糖素母药质量控制项目指标应符合表1要求。

表1 氨基寡糖素母药控制项目及指标

项 目	指 标	
	母液	母粉
氨基寡糖素质量分数，%	7.5±0.8	80±2.5

氨基葡萄糖质量分数, %	≤0.05	≤0.5
灰分, %	-	≤2.0
水分, %	-	≤8.0
pH 值	3.0-6.0	3.0~6.0
水不溶物, %	≤0.5	≤0.5

4 试验方法

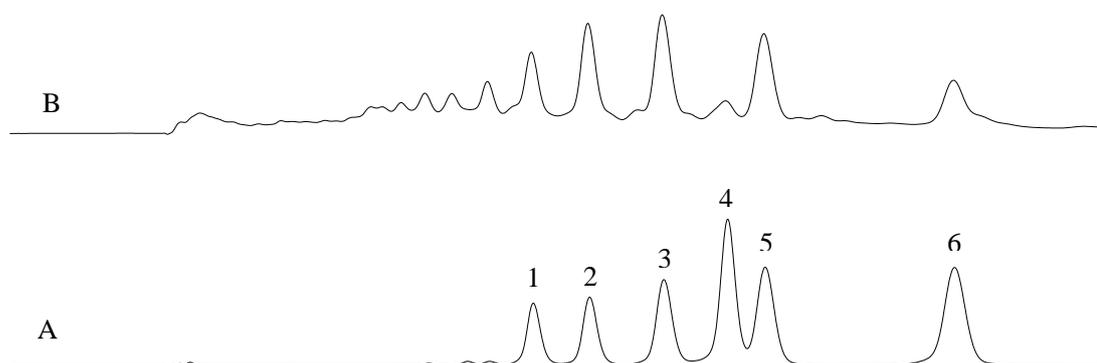
4.1 抽样

按照 GB/T 1605 规定进行样品的采集,用随机数表法确定抽样的包装件,最终抽样量不少于 100g。采样时应特别注意样品的代表性和避免污染,采样容器和采样工具应经过消毒灭菌,样品采集后应立即进行检验,若不能立即检验,应在 4℃ 条件下贮存。

4.2 鉴别试验

4.2.1 离子色谱法

本鉴别试验可与氨基寡糖素原药中氨基葡萄糖质量分数的测定同时进行。在相同色谱条件下,试样溶液中氨基葡萄糖、壳二糖、壳三糖、壳四糖、壳五糖和壳六糖色谱峰的保留时间与对应标样溶液色谱峰的保留时间,其相对差值应在 1.5% 以内。氨基寡糖素原药至少要含有 2-6 糖中的 2 个或者多个。氨基寡糖素原药和混合标准溶液的离子色谱见图 1。



A-混合标准溶液; B-试样溶液; 1-壳六糖; 2-壳五糖; 3-壳四糖; 4-氨基葡萄糖; 5-壳三糖; 6-壳二糖;

图 1 氨基寡糖素原药和混合标准溶液色谱图

4.2.2 质谱法

4.2.2.1 方法提要

本鉴别试验，通过样品的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）分析，利用数据处理软件，进行样品数均分子量（ M_n ）、重均分子量（ M_w ）、多分散性（ pd ）和平均聚合度（ DP ）统计分析，氨基寡糖素原药至少要含有 2-6 糖中的 2 个或者多个。氨基寡糖素原药的质谱图见图 2。

4.2.2.2 试剂和溶液

基质 2,5-二羟基苯甲酸；

校正用混合多肽标准品；

乙腈：色谱纯；

乙醇：色谱纯；

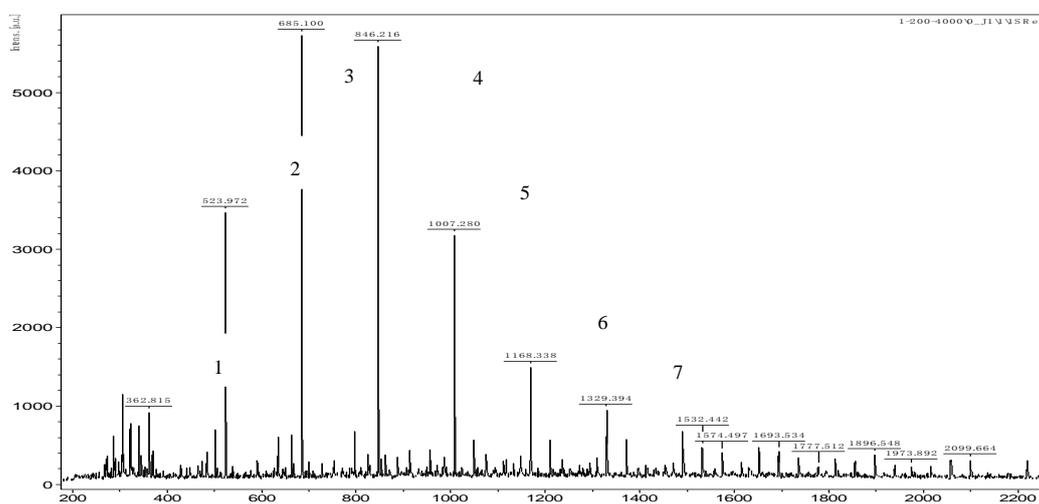
三氟乙酸。

4.2.2.3 仪器

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪，采用反射模式、正离子检测，全景式宽域聚焦技术，数据利用统计软件进行分析处理。

4.2.2.4 测定步骤

基质 2,5-二羟基苯甲酸和校正用混合多肽标准品用乙腈、超纯水、三氟乙酸按照体积比 200: 100: 3 配制成乙腈酸性溶剂。将 2,5-二羟基苯甲酸和待测样品分别溶于上述溶剂配制成 50 g/L 和 10 g/L 溶液备用。将等体积的基质和样品溶液充分混匀，取 0.5 μL 混合液滴于靶板上，待溶剂自然挥发样品结晶后，滴加 0.5 μL 乙醇，使样品与基质混合物二次结晶，乙醇挥发后即可进行质谱检测。



1-壳二糖；2-壳三糖；3-壳四糖；4-壳五糖；5-壳六糖；6-壳七糖；7-壳八糖

图 2 氨基寡糖素原药质谱图

4.3 氨基寡糖素质量分数的测定

4.3.1 分光光度法

试样用浓盐酸（优级纯）水解成D-葡萄糖胺，D-葡萄糖胺在碱性条件下与乙酰丙酮形成色原，色原在酸性反应液中与对二甲氨基苯甲醛反应显红色，其颜色深浅程度与氨基寡糖素质量分数呈线性关系，采用分光光度法测定氨基寡糖素的含量。

4.3.1.1 试剂和溶液

水：去离子水

0.33 mol/L磷酸三钠溶液（A溶液）：称取 $\text{NaPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 125.45g，用水定容到1000mL；

0.25 mol/L四硼酸钠溶液（B溶液）：称取95%四硼酸钠100.00g，用水定容到1000mL；

磷酸三钠-四硼酸钠溶液：取98mLA与2mLB相混即得；

3.5%乙酰丙酮试剂：取乙酰丙酮3.5mL，用磷酸三钠-四硼酸钠溶液配成100mL；

对二甲氨基苯甲醛（PDABA）试液：取0.16g PDABA溶于1.5mL 12mol/L盐酸溶液后，以10.5mL异丙醇稀释；

标样：盐酸氨基葡萄糖，已知质量分数 $\geq 99.0\%$

4.3.1.2 主要仪器、设备

分光光度计。

4.3.1.3 试验步骤

4.3.1.3.1 标样溶液的制备

准确称取标样0.602 g（精确至0.0002 g），置于25 mL烧杯中，用5 mL水溶解，转移到25 mL容量瓶中。用5 mL水洗涤烧杯内壁，移入到同一容量瓶中，重复洗涤2次，最后用双蒸水定容至25 mL，制成20 mg/mL氨基葡萄糖溶液。

用移液枪分别取20 mg/mL氨基葡萄糖溶液375 μL （相当于氨基葡萄糖7.5 mg）置于10 mL带聚四氟乙烯衬垫螺旋盖的玻璃管（水解管）中，然后用移液管加入6 mol/L盐酸2.625 mL，充分混匀后在管子里充入高纯氮气并将管子密封，于100℃水浴中加热3 h。冷却到室温后打开螺旋盖，用移液枪将1.0 mL水解液转移到蒸发皿中，在70℃烘箱中挥发至干。加1 mL水将蒸发皿中的固体溶解后在70℃烘箱中挥发至干，此步骤重复2次。用5 mL水将得到的固体溶

解，并转移到25 mL容量瓶中。用5 mL水洗涤蒸发皿，液体转入到同一容量瓶中，重复洗涤2次，用水定容到25 mL。得到标准氨基葡萄糖溶液。

4.3.1.3.2 标准曲线的制作

取10 mL带塞试管5支，依次加入氨基葡萄糖标准液0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL，再分别用移液枪加水到总体积为0.8 mL，得到浓度分别为0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的氨基葡萄糖梯度溶液。在每个试管中加入乙酰丙酮试剂0.6 mL，混匀，加盖，于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热30 min，冰水浴冷却，冷至室温后加入2 mL PDABA试剂。10 min后以0 $\mu\text{g/mL}$ 为对照，在535 nm处测定吸光度。做3组重复，取平均值。以吸光度为纵坐标、对应的葡萄糖含量为横坐标绘图。

4.3.1.3.3 试样溶液的制备

称取30mg试样置于带四氟乙烯衬垫螺旋盖的玻璃管（水解管）中，然后用移液管加入6mol/L盐酸3mL，充分混匀后在管子里充入高纯氮气并将管子密封，于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热3 h。每个试样3个重复，冷却到室温后打开螺旋盖，用移液枪取1.0 mL水解液到蒸发皿中，在70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中挥发至干。加1 mL水将蒸发皿中的固体溶解后在70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中挥发至干，此步骤重复2次。用5 mL水将得到的固体溶解，并转移到50 mL容量瓶中。用5 mL水洗涤蒸发皿，液体转入到同一容量瓶中，重复洗涤2次，用水定容。制得试样溶液。

4.3.1.3.4 测定

取0.8 mL试样溶液加入到10 mL带塞试管中，加入乙酰丙酮试剂0.6 mL，混匀，加盖，于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热30 min，冰水浴冷却，冷至室温后加入2 mL PDABA试剂。10 min后以0 $\mu\text{g/mL}$ 为对照，在535 nm处测定吸光度。从标准曲线中查到对应的葡萄糖质量分数。

4.3.1.4 计算方法

试样中氨基寡糖素质量分数 W_1 按式（1）计算：

$$W_1 = K \times 3 \times \frac{C \times 50 \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

K—换算因子，K=3

c—从标准曲线中查出的试样质量浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

3—稀释倍数

50—稀释后试样溶液体积，mL；

m—试样取样质量，mg；

100—换算成百分比；

1000—毫克换算成克。

4.3.1.5 允许差

两次平行测定结果相对差，应不大于5%，取其算术平均值作为测定结果。

4.3.2 离子色谱法

将氨基寡糖素原药在酸性条件下水解为氨基葡萄糖，以氢氧化钠溶液为流动相，使用脉冲安培检测器和高效阴离子交换色谱柱，对水解产物进行分离和测定，利用外标法进行定量。

4.3.2.1 试剂和溶液

氢氧化钠溶液 ($\omega(\text{NaOH})=50\%$): 优级纯;

无水乙酸钠: 优级纯;

水: 符合 GB/T 6682-2008 中一级水的规定, 即电导率 (25°C) / (mS/m) ≤ 0.01 ;

氢氧化钠溶液 (8mol/L);

盐酸溶液 (8mol/L);

100 mmol/L NaOH/100 mmol/L CH_3COONa 溶液: 在 2 L 塑料试剂瓶中加入约 1900 mL 经过 0.4 μm 尼龙滤膜过滤的水, 加入无水乙酸钠 16.4 g, 再移入氢氧化钠溶液 ($\omega(\text{NaOH})=50\%$) 10.5 mL 至水面以下, 然后加入水至 2 L 刻度, 通氮气保护后摇匀备用。

D-氨基葡萄糖盐酸盐标准品: 已知质量分数, $\omega \geq 99.0\%$ 。

4.3.2.2 仪器

离子色谱仪: 包含在线脱气装置的四元梯度泵、柱温箱、脉冲安培检测器 (Au 工作电极, pH/Ag/AgCl 复合参比电极, 糖标准四电位)、色谱工作站;

分析柱: CarboPac PA100 (i.d.4 \times 250 mm), 保护柱: CarboPac PA100 (i.d.4 \times 50 mm);

带聚四氟乙烯衬垫螺旋盖的厚壁耐压管。

4.3.2.3 离子色谱操作条件

流动相: ψ ((100 mmol/L NaOH/100 mmol/L CH_3COONa): H_2O) =10:90;

流速: 1.0 mL/min;

进样方式: 手动进样;

进样体积: 25 μL ;

柱温: 30°C

保留时间：氨基葡萄糖约 7.8 min。

实验中各淋洗液上方均施加 0.4 MPa 的氮气进行保护，防止淋洗液吸收空气中的二氧化碳。

上述操作参数是典型的，可根据不同仪器特点，对给定的操作参数作适当调整，以期获得最佳效果。典型的氨基寡糖素原药水解后溶液的离子色谱图见图 3。

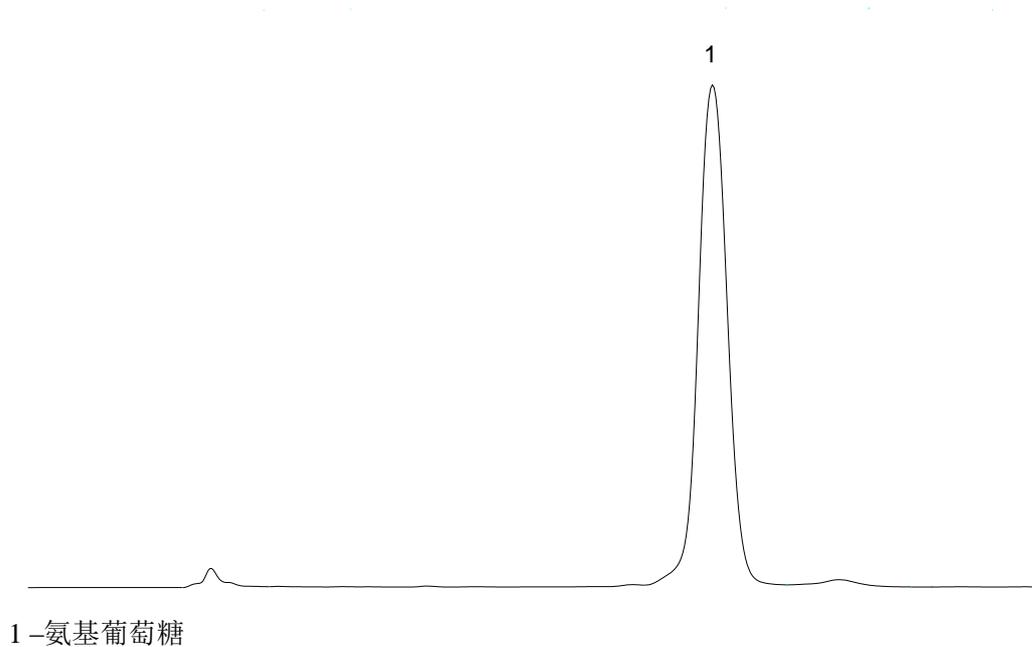


图 3 氨基寡糖素原药水解后的溶液离子色谱图

4.3.2.4 测定步骤

4.3.2.4.1 标样溶液的配制

称取 D-氨基葡萄糖盐酸盐标样约 15 mg（精确至 0.0002 g）置于 50 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，超声振荡 5 min，冷却至室温，摇匀。用移液管移取上述溶液 5.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

4.3.2.4.2 试样溶液的配制

称取氨基寡糖素原药约 15 mg（精确至 0.0002 g）置于 10 mL 带聚四氟乙烯衬垫螺旋盖的厚壁耐压管中，加入 5.0 mL 8.0 mol/L 盐酸，充分混匀后充入高纯度氮气并密封，98℃ 油浴下搅拌 8 h。冷却至室温，打开螺旋盖，缓慢加入 8.0 mol/L 的氢氧化钠溶液，调节水解液的 pH 值约至 7.0，再将水解液全部转移到 50 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，超声振荡 5 min，

冷却至室温，摇匀。用移液管移取上述溶液 5.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

4.3.2.4.3 测定

在上述操作条件下，待仪器基线稳定后，连续注入数针标样溶液，计算各针相对响应值，待相邻两针的相对响应值变化小于 1.5%，按照标样溶液、试样溶液、试样溶液、标样溶液的顺序进行测定。

4.3.2.5 计算

将测得的两针试样溶液以及试样前后两针标样溶液中氨基葡萄糖峰面积分别进行平均。试样中以氨基葡萄糖计的氨基寡糖素质量分数按式（1）计算：

$$\omega_1 = \frac{A_2 \times m_1 \times 179.17}{A_1 \times m_2 \times 215.63} \times \omega \times K \dots \dots \dots (1)$$

式中：

ω_1 ——试样中氨基寡糖素质量分数（以氨基葡萄糖计），以%表示；

A_2 ——试样溶液中，氨基葡萄糖峰面积的平均值；

m_1 ——氨基葡萄糖盐酸盐标样的质量，单位为克(g)；

ω ——氨基葡萄糖盐酸盐标样的质量分数，以%表示；

A_1 ——标样溶液中，氨基葡萄糖峰面积的平均值；

m_2 ——试样的质量，单位为克(g)；

179.17——氨基葡萄糖摩尔质量，单位为g/mol；

215.63——D-氨基葡萄糖盐酸盐摩尔质量，单位为g/mol；

K ——校正系数，校正氨基寡糖素在降解为氨基葡萄糖过程中的损失， $K = 2.2$ 。

4.3.2.6 允许差

氨基寡糖素质量分数两次平行测定结果之差应不大于3.0%，取其算术平均值作为测定结果。

4.4 氨基葡萄糖质量分数的测定

4.4.1 方法提要

样品用水溶解，以氢氧化钠溶液为流动相，使用脉冲安培检测器和高效阴离子交换色谱柱，对试样中的氨基葡萄糖进行离子色谱分离和测定。

4.4.2 试剂和溶液

氢氧化钠溶液 ($\omega(\text{NaOH})=50\%$)：优级纯；

水：符合 GB/T 6682-2008 中一级水的规定，即电导率 (25°C) / (mS/m) ≤ 0.01 ；

200 mmol/L NaOH溶液：在2 L塑料试剂瓶中加入1900 mL经过0.4 μm 尼龙滤膜过滤的一级水，再移入氢氧化钠溶液 ($\omega(\text{NaOH})=50\%$) 20.9 mL至水面以下，然后加入一级水至2 L刻度，通氮气保护后摇匀备用。

D-盐酸氨基葡萄糖标准品，已知质量分数， $\omega \geq 99.0\%$ 。

4.4.3 仪器

离子色谱：离子色谱仪，包含在线脱气装置的四元梯度泵、柱温箱、脉冲安培检测器 (Au工作电极，pH/Ag/AgCl 复合参比电极，糖标准四电位)、色谱工作站；

分析柱：CarboPac PA100 (i.d.4 \times 250 mm)，保护柱：CarboPac PA100 (i.d.4 \times 50 mm)；

4.4.4 色谱条件

流动相： ψ (200 mmol/L NaOH : H_2O)=10:90；

流速：0.4 mL/min；

进样方式：手动进样；

进样体积：25 μL ；

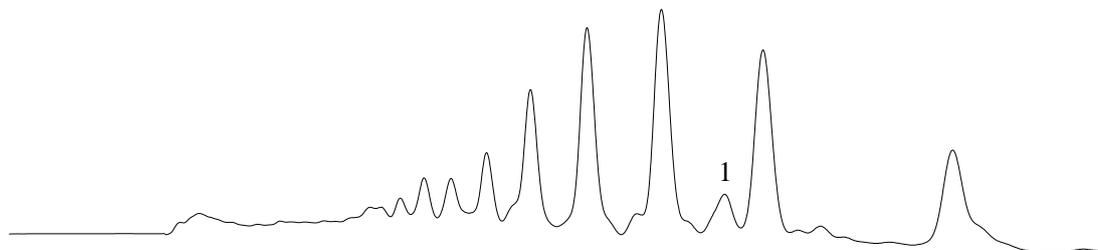
柱温：30 $^\circ\text{C}$

保留时间：氨基葡萄糖约 16.4 min。

实验中各淋洗液上方均施加 0.4 MPa 的氮气进行保护，防止淋洗液吸收空气中的二氧化碳。

上述操作参数是典型的，可根据不同仪器特点，对给定的操作参数作适当调整，以期获得最佳效果。

典型的氨基寡糖素原药溶液的离子色谱图见图 4。



1-氨基葡萄糖

图 4 氨基寡糖素原药溶液的离子色谱图

4.4.5 测定步骤

4.4.5.1 标样溶液的配制

称取 D-氨基葡萄糖盐酸盐标样约 30 mg（精确至 0.0002 g）置于 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，超声振荡 5 min，冷却至室温，摇匀。用移液管移取上述溶液 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

4.4.5.2 试样溶液的配制

称取氨基寡糖素原药约 100 mg（精确至 0.0002 g）置于 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，超声振荡 5 min，冷却至室温，摇匀。

4.4.5.3 测定

在上述操作条件下，待仪器基线稳定后，连续注入数针标样溶液，计算各针相对响应值，待相邻两针的相对响应值变化小于 1.5%，按照标样溶液、试样溶液、试样溶液、标样溶液的顺序进行测定。

4.4.5.4 计算

将测得的两针试样溶液以及试样前后两针标样溶液中氨基葡萄糖峰面积分别进行平均。试样中氨基葡萄糖质量分数按式（2）进行计算。

$$\omega_2 = \frac{A_2 \times m_1 \times 179.17}{A_1 \times m_2 \times 215.63 \times 100} \times \omega \dots\dots\dots(2)$$

式中：

ω_2 ——试样中氨基葡萄糖质量分数，以%表示；

A_2 ——试样溶液中，氨基葡萄糖峰面积的平均值；

m_1 ——氨基葡萄糖盐酸盐标样的质量，单位为克(g)；

ω ——标样的质量分数，以%表示；

A_1 ——标样溶液中，氨基葡萄糖峰面积的平均值；

m_2 ——试样的质量，单位为克(g)；

179.17——氨基葡萄糖摩尔质量，单位为g/mol；

215.63——D-氨基葡萄糖盐酸盐摩尔质量，单位为g/mol；

100——标样稀释倍数。

4.4.6 允许差

两次平行测定结果的相对偏差应不大于 10%，取其算术平均值作为测定结果。

4.5 灰分

按 GB 5009.4 中规定进行测定。

4.6 水分

按 GB 5009.3 中的规定测定。

4.7 pH 的测定

按 GB/T 1601 中的规定进行测定。

4.8 水不溶物的测定

按照 GB/T 28136-2011 中的规定测定。

5 产品检验与验收

应符合 GB/T 1604 规定。极限值的处理应按 GB/T 8170-2008 中 4.3.3 进行。

6 标志、标签、包装、贮运

6.1 标志、标签

氨基寡糖素原药的标志、标签应符合 GB 3796 规定，同时注明贮运条件。

6.2 包装

包装应符合 GB 3796 和 GB/T 191 的规定。

6.3 贮运

贮运时严防日晒及 35℃ 以上高温，置于阴凉干燥处。运输时，注意轻放，防止破损。不得与有毒有害物质混装、混运。

6.4 安全

在使用说明书或包装标签上应注明毒性、防护措施等。

6.5 验收期

验收期为 1 个月。从交货之日起，在一个月內完成产品的质量验收，其各项指标均应符合标准要求。
