

doi :10.3969/j.issn.1008-6145.2015.01.001

## 海藻糖标准样品的研制\*

陈晖<sup>1,2</sup>, 方华<sup>1</sup>, 张怡评<sup>1</sup>, 陈伟珠<sup>1</sup>, 洪专<sup>1</sup>, 易瑞灶<sup>1</sup>

(1. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建厦门 361005 ;  
2. 厦门大学海洋与地球学院, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建厦门 361005)

**摘要** 研制了海藻糖国家标准样品。以食品级海藻糖粗品为原料, 纯化制备海藻糖, 采用红外光谱 (IR)、质谱和核磁共振谱 (NMR) 以及单晶衍射等方法进行结构确证。样品分装成 400 瓶后, 采用离子色谱法进行均匀性、稳定性检验和定值分析。从样品中随机抽取 15 瓶进行均匀性检验, 经  $F$  检验表明, 在 95% 的置信区间范围内, 样品均匀性良好。在 40 ℃ 下, 经过 24 个月稳定性考察, 结果表明样品稳定性良好。标准样品经国内 8 家具有分析资质的实验室进行协同定值, 并评定了定值结果的不确定度, 海藻糖标准样品定值结果为 99.72%, 扩展不确定度为 0.26% ( $k=1.96$ )。该标准样品达到国家标准样品的技术要求, 可用于有关海藻糖的方法校正和质量控制。

**关键词** 海藻糖; 标准样品; 离子色谱法; 定值; 不确定度

中图分类号: O653 文献标识码: A 文章编号: 1008-6145(2015)01-0001-04

### Development of Trehalose Certified Reference Material

Chen Hui<sup>1,2</sup>, Fang Hua<sup>1</sup>, Zhang Yiping<sup>1</sup>, Chen Weizhu<sup>1</sup>, Hong Zhuan<sup>1</sup>, Yi Ruizao<sup>1</sup>

(1. The Third Institute of Oceanography of the State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China ;

2. College of Ocean & Earth Science, State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Trehalose certified reference material was developed. Trehalose was purified from the crude product. The structure of trehalose certified reference material was confirmed by infrared spectroscopy (IR), mass spectrometry, NMR and XRD. Trehalose was divided into 400 bottles. The homogeneity and stability testing and quantitative analysis were evaluated by ion chromatography method. According to analysis procedure of homogeneity, 15 bottles of sample were randomly taken from 400 bottles, and the results were validated by  $F$ -test statistical methods. The stability inspection was carried on the long-term (24 months), and the results indicated that the period for trehalose storage was 24 months at 40 ℃. A cooperative certification was conducted by 8 qualified laboratories. The certified purity value of the reference material of trehalose was 99.72% with relative expanded uncertainty of 0.26% ( $k=1.96$ ). The reference material can conform to the technical requirement of the certified reference material, and it can be used for validation and quality control regarding trehalose.

**Keywords** trehalose; certified reference material; ion chromatography; certification; uncertainty

海藻糖是一种分子结构明确的天然二糖, 由两个葡萄糖分子通过半缩醛羟基以  $\alpha$ -1, 1 糖苷键结合, 其二水合物分子式为  $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$ , 相对分子质量为 378.33。海藻糖无毒性, 水溶性好, 结构稳定。近年来, 国内外的众多研究表明海藻糖具有保存生物活力的特殊功能, 国际上用它作为生物活性物质的稳定剂和保护剂, 在保护基因工程酶类、各种病毒、疫苗、抗体、蛋白质因子、核酸等方面都取得了很好的结果, 在食品、保健品、化妆品、医药、分子生物化学和农业等领域显示了广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。

目前国内外高度重视海藻糖在食品、生物医药等领域的开发利用, 已有食用级海藻糖和药用辅料

级海藻糖在市场上销售使用, 但是国内未见海藻糖国家标准样品研制的报道及销售, 使得国内对海藻糖产品的质量控制及药理药效学研究完全依赖于昂贵的进口标准样品<sup>[2]</sup>, 限制了对海藻糖的深入研究。笔者以食品级海藻糖粗品为原料, 纯化制备了海藻糖标准样品, 解决了海洋天然活性物质中结构近似的糖类化合物难以分离的共性技术问题, 对加速海

\* 福建省科技计划项目 (2013N01010205); 厦门市海洋经济创新发展区域示范项目 (12PZP001SF10); 海洋公益行业科研专项 (201005020-1); 厦门市科技计划项目 (3502Z20122009)

联系人: 洪专; E-mail: hzh@tio.org.cn

收稿日期: 2014-11-17

藻糖活性的理论研究与应用基础研究、促进海洋生物医药的发展具有积极的推动作用。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

离子色谱仪:ICS 3000型,美国 Thermo Scientific 公司;

红外光谱仪:VERTEX 70型 美国 Bruker 公司;

质谱仪:3100型 美国 Waters 公司;

核磁共振仪:400 MHz 美国 Bruker 公司;

单晶衍射仪:SuperNova型 美国 Agilent 公司;

天平:AL/104型 瑞士 Mettler Toledo 公司;

纯水机:Milli-Q型 美国 Milli-pore 公司;

氢氧化钠溶液:质量分数为50%,美国 Thermo Scientific 公司。

### 1.2 海藻糖标准样品的制备

以食品级海藻糖粗品为原料,经热溶冷析结晶、乙醇结晶、减压干燥等方式获得纯度不低于99%的海藻糖。

### 1.3 定性分析

采用红外吸收光谱、质谱、核磁共振谱、单晶衍射等对海藻糖标准样品进行定性分析。

### 1.4 定值分析

海藻糖标准样品含量采用高灵敏度的离子色谱法<sup>[3]</sup>进行测定。

#### 1.4.1 色谱条件

色谱柱:CarboPac PA-10柱(250 mm × 4 mm, 美国 Thermo Scientific);流动相:30 mol/L NaOH 溶液;流量:0.8 mL/min;积分安培检测器,标准4电位检测;进样体积:25 μL;柱温:30。

#### 1.4.2 样品配制

精密称取海藻糖标准样品0.150 g,用水溶解并定容于100 mL容量瓶中,摇匀后精密移取1 mL至250 mL容量瓶中,定容,摇匀,用0.2 μm微孔滤膜过滤,按照1.4.1色谱条件进行纯度检测,进样25 μL。每个样品重复进样测定3次。

### 1.5 均匀性检验

对同一批制备的海藻糖样品进行分装,每瓶净重为1 g,共400瓶。按照GB/T 15000.3-2008<sup>[4]</sup>规定,确定抽样数目为15个,采用单因素多水平试验方差分析法对海藻糖样品进行纯度均匀性检验,测定方法采用离子色谱法,每个样品重复测定3次。检测数据用方差分析法进行分析以判断标准样品的均匀性是否合格。

### 1.6 稳定性检验

取海藻糖样品模拟上市包装,在(40 ± 2)%,相对湿度为(75 ± 5)%的条件下进行24个月长期试验,分别于0,3,6,9,12,18,24个月取样,采用离子色谱法进行检测,考察其样品纯度的变化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 海藻糖标准样品的定性分析

利用红外吸收光谱、质谱、核磁共振谱以及单晶衍射对海藻糖标准样品进行定性分析。

图1、图2分别是海藻糖标准样品的红外光谱、质谱图。海藻糖标准样品的核磁解析数据见表1。

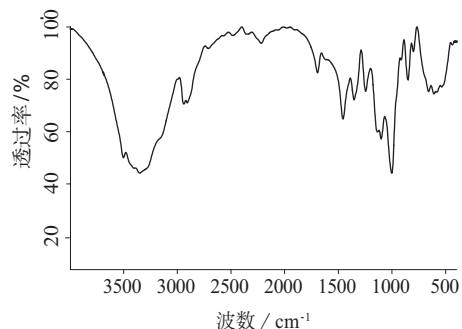


图1 海藻糖标准样品的红外光谱图

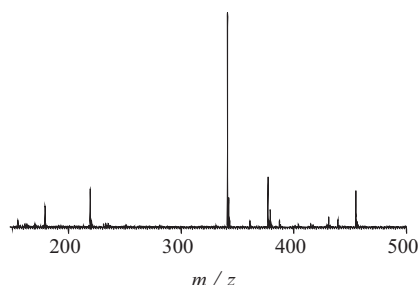


图2 海藻糖标准样品的质谱图

表1 海藻糖标准样品的核磁共振数据归属(D<sub>2</sub>O介质)

序号	$\delta_c$ (100 MHz) 文献值 <sup>1)</sup> /实验值	$\delta_H$ (multiplicity, JH/H Hz, 400 MHz) <sup>2)</sup> 文献值/实验值	主要 COSY谱
1	94.2/93.2	4.88/5.08, <i>d</i> , <i>J</i> =4.0 Hz	3.58
2	70.8/71.0	3.24/3.58, <i>dd</i> , <i>J</i> =10.0, 3.6 Hz	5.08
3	73.6/72.5	3.24/3.76, <i>t</i> , <i>J</i> =9.2 Hz	
4	70.8/69.7	3.13/3.39, <i>t</i> , <i>J</i> =9.2 Hz	3.76, 3.79
5	73.2/72.1	3.64/3.79, <i>m</i>	
6	61.6/60.5	3.58/3.80, <i>d</i> , <i>J</i> =10.0 Hz 3.47/3.70, <i>dd</i> , <i>J</i> =11.6, 4.8 Hz	

注:1)文献数据来自 Spectral Database for Organic Compounds (SDBS);2)氢谱数据来源于 HMQC 的对应关系。

由图1可知,海藻糖结构中存在羟基(—OH)、亚甲基(—CH<sub>2</sub>)、碳与氧的单键连接。样品质谱图中,在负离子电喷雾状态下测得准分子离子峰为  $m/z$  342 [M-H]<sup>+</sup>,与其相对分子质量(342)相符。此外,在该质谱图中还可见到  $m/z$  179(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>)和  $m/z$  163(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>)的少量碎片,与该化合物为两个六

碳糖相连而成的结构相符。

由表 1 可知,该化合物的各质子、各碳的化学位移与文献数据基本一致,且质子数、碳原子数与海藻糖的分子式一致。其中,端基质子  $\delta 5.08$  ( $d, J=4.0$  Hz) 为耦合常数 4.0 Hz 的二重峰,属于 D-葡萄糖的 1 位质子与 2 位质子呈  $e-a$  立体关系,表明为  $\alpha$  立体构型。由于该分子呈完全对称的氢谱和碳谱数据,表明两个葡萄糖之间以  $\alpha, \alpha$  键相连而成<sup>[5]</sup>。

通过培养获得海藻糖单晶,选择大小适度、晶质良好的单晶体,利用 X-衍射技术进行晶体的测定和数据分析,结果表明该化合物为 2 水合  $\alpha, \alpha$ -海藻糖 2 分子椅式吡喃型 D-葡萄糖均通过端基的  $\alpha$  构型连接而成,与 Liu W 等<sup>[6]</sup>报道一致。

确定海藻糖的结构式(如图 2 所示)及晶体结构。

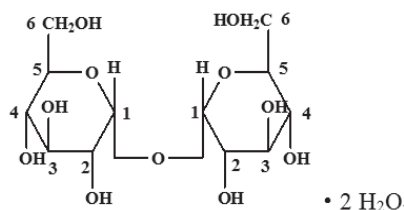


图 2 海藻糖的结构式

## 2.2 均匀性检验

在对海藻糖标准样品进行分装后,进行纯度均匀性检验,均匀性检验结果见表 2、表 3。

表 2 海藻糖标准样品纯度均匀性检验结果 %

瓶号	测定值	平均值
65	99.85 99.83 99.85	99.84
87	99.85 99.87 99.84	99.85
98	99.85 99.84 99.86	99.85
110	99.87 99.81 99.84	99.84
129	99.79 99.82 99.81	99.81
143	99.8 99.83 99.83	99.82
161	99.78 99.79 99.78	99.78
179	99.79 99.74 99.77	99.77
197	99.83 99.85 99.85	99.84
215	99.84 99.86 99.86	99.85
233	99.82 99.83 99.86	99.84
251	99.86 99.86 99.85	99.86
269	99.88 99.88 99.86	99.87
287	99.88 99.8 99.83	99.84
305	99.86 99.87 99.86	99.86

表 3 均匀性检验方差分析结果

变差源	SS	自由度	MS
组间	0.025 880	14	0.001 849
组内	0.030 200	30	0.001 007
总和	0.056 080	44	

由表 3 可知,  $F=MS_{\text{组间}}/MS_{\text{组内}} \approx 1.84$ ,  $F_{(0.05, 14, 30)}=2.04$ ,  $F < F_{(0.05, 14, 30)}$ , 说明在 95% 的置信区间, 海藻

糖标准样品均匀性良好。

## 2.3 稳定性检验

因为海藻糖性质稳定,所以选择在高温条件下加速样品的化学或物理变化,模拟出样品在长期储存条件下的变化,考察样品的稳定性,为样品的包装、运输、存储提供资料。在 40 条件下 24 个月内海藻糖标准样品测定结果见表 4。

表 4 海藻糖标准样品稳定性检验结果

时间/月	性状	纯度/%
0	白色粉末	99.66
3	白色粉末	99.73
6	白色粉末	99.77
9	白色粉末	99.63
12	白色粉末	99.52
18	白色粉末	99.58
24	白色粉末	99.60

采用直线模型作为经验模型,对海藻糖长期稳定性获得的数据进行分析<sup>[7-8]</sup>,计算可得斜率  $|a| < t_{0.95, n-2}S(a)$ , 故斜率不显著,因而未观测到不稳定性,说明在该存储条件下,海藻糖标准样品稳定性良好。参照中国药典(2010 版)<sup>[9]</sup>的相关说明,可以将海藻糖标准样品的有效期暂定为 2 年。

## 2.4 定值结果及其不确定度评定

### 2.4.1 定值结果

按照 GB/T 15000.3-2008 标准要求,采用多个实验室协作定值,选择获得国家或部门认可、具备资质的 8 家实验室对研制的海藻糖标准样品进行定值。随机抽取 8 瓶样品,每个定值实验室送 1 瓶,采用离子色谱法进行测定,应用面积归一法进行定量,定值结果见表 5。

表 5 海藻糖标准样品定值结果汇总 %

实验室编号	检测结果	平均值	标准偏差
1	99.84 99.86 99.87 99.88 99.90 99.90	99.88	0.03
2	99.63 99.76 99.79 99.84 99.96 100.00	99.83	0.14
3	99.80 99.80 99.81 99.83 99.84 99.85	99.82	0.03
4	99.42 99.44 99.45 99.46 99.47 99.48	99.45	0.03
5	99.86 99.87 99.88 99.88 99.90 99.91	99.88	0.02
6	99.53 99.54 99.56 99.58 99.61 99.65	99.58	0.05
7	99.61 99.63 99.64 99.68 99.68 99.72	99.66	0.05
8	99.30 99.32 99.33 99.34 99.34 99.36	99.33	0.03

汇集各家实验室的检测数据后,对每家实验室的数据按大小顺序排列,用 Grubb's 法和峰度法正态性检验组内数据的异常值,结果没有异常值,则所有数据进行下一步统计<sup>[10]</sup>。再用 Grubb's 法对每家实验室的平均值进行检验,将其看成一组测定值进行异常值检验,结果无异常值。因此将各家实验室测得的数据作为无偏估计值,计算 8 家实验室测

定结果的平均值及标准偏差。然后对各实验室测定结果的标准偏差  $s$  进行 Cochran 检验,按式 (1) 计算统计量  $C$  :

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2} \quad (1)$$

式中:  $s_i$ ——各实验室测定结果的标准偏差;

$s_{\max}$ —— $s_i$  中的最大值。

计算得  $C=0.685$ ,查表得  $C_{8,6(0.05)}=0.360$ ,  $C > C_{8,6(0.05)}$ ,表明各实验室间的测量不属于等精度测量,因此计算加权平均值作为最佳值得到海藻糖标准样品的定值结果(总平均值  $X=99.72\%$ )。

#### 2.4.2 定值结果的不确定度评定

根据 GB/T 15000.3-2008 标准规定,定值结果由标准值和不确定度组成。标准样品特性标准值的测量不确定度  $u$  由标准值定值试验的不确定度  $u(X)$ 、均匀性检验的不确定度  $u_{bb}$  和稳定性检验的不确定度  $u_{ts}$  组成。依据全部测定结果,计算海藻糖样品的特性标准值和不确定度。

(1) 标准值定值试验引入的不确定度  $u(X)$ 。按照加权法计算得到标准样品定值的不确定度  $u(X)=0.08\%$ 。

(2) 均匀性检验引入的不确定度  $u_{bb}$ 。该项用瓶间方差表示,计算得  $u_{bb}=0.02\%$ 。

(3) 稳定性检验引入的不确定度  $u_{ts}$ 。由 2.3 稳定性试验可以计算得  $u_{ts}=s(a)t=0.09\%$ 。

则标准样品定值的不确定度:

$$u = \sqrt{u^2(X) + u_{bb}^2 + u_{ts}^2} = 0.13\%$$

#### 福建厦门政企联合实验室开启检测机构发展新模式

福建省厦门市计量检定测试院与海克斯康测量技术(青岛)有限公司建立的联合实验室正式揭牌成立并对外开放,这是该省计量技术机构与国际知名测量技术供应商的首次“联姻”,将为厦门乃至海西计量检测领域提供一种全新的服务模式和合作平台。

通过联合实验室的创新建设模式,不断深化完善政企联合实验室的共建机制,将对厦门机械装备和平板显示等千亿产业提供几何量的精密测量和全面计量解决方案,为复杂形状零部件等高精度计量检测提供准确、可靠的技术保障,并不断输出技术服务咨询、人才培养等增值服务。

有关专家认为,随着联合实验室的启动,推行开放运行的管理机制,融合吸纳先进的检验检测技术,突破产业关键技术瓶颈,将对加快科技服务经济发展产生重大的推动意义。(李)

取包含因子  $k=1.96$ ,则扩展不确定度:

$$U_{95}=ku=1.96 \times 0.13\%=0.26\%$$

海藻糖标准样品定值结果为  $(99.72 \pm 0.26)\%$ ,

$k=1.96$ 。

#### 3 结语

研制的海藻糖标准样品经实验考察其均匀性、稳定性均符合要求,该标准样品对食品安全、生物医药等方面的测量和科学研究提供了技术支撑和量值溯源保证。

#### 参考文献

- [1] 马文锦,刘树兴,潘巨忠,等.海藻糖的生产制备及应用前景[J].现代农业科技,2007,24:199-201.
- [2] 汪斌,卢晓华,孟凡敏.2001年以来我国标准物质发展状况概述[J].江苏现代计量,2009(5):34-36.
- [3] 陈晖,易瑞灶,谢荣伟,等.基于离子色谱法的海藻糖检测方法研究[J].中国海洋药物,2012(1):34-37.
- [4] GB/T 15000.3-2008 标准样品工作导则(3) 标准样品定值的一般原则和统计方法[S].
- [5] 田媛,张尊建.糖类结构的核磁共振波谱及质谱分析[J].药学进展,2003(2):78-80.
- [6] Liu W, Yan J, Song Q, et al. Trehalose dihydrate from Tremella fuciformis [J]. Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online, 2012, 68(8): 2511.
- [7] 刘德富.药品稳定性试验的统计分析[J].中国医药工业杂志,1993,24(4):185-188.
- [8] 王弘,刘昉阳,张燕平.药品稳定性实验研究进展[J].中国新药杂志,2006,20:1710-1715.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010版[M].二部.附录199-201.北京:中国医药科技出版社,2010.
- [10] 陈伟珠,谢全灵,张怡评,等.4,9-脱水河豚毒素国家标准样品的研制[J].化学分析计量,2014,23(3):1-4.

#### 浙江省质监局“四着力”加强认证市场监管

(1) 着力开展强制性产品认证监管。组织开展强制性产品认证获证产品监督抽查。

(2) 着力开展食品农产品认证监管。开展了有机产品等食品农产品认证监督检查。联合浙江检验检疫局开展有机产品认证监督检查,检查范围覆盖省内20%以上的有机产品生产加工获证企业、认证机构以及销售有机产品的商场、超市、专卖店等,针对抽检结果不合格的获证企业,追溯认证机构进行后处理。

(3) 着力开展管理体系认证监管。积极配合国家认监委检查组对11家质量管理体系认证企业开展现场检查。

(4) 着力开展投诉举报后核查。针对认证机构认证行为不规范的举报投诉,从数据库中随机抽取4家强制性产品、质量管理体系认证企业进行了现场核查,并根据核查情况依法进行处置。(仪器信息网)