ICS 67.180
CCS X 69

QB

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 5761—2022

食品中水苏糖的测定　核磁共振波谱法

Determination of stachyose in food—

Nuclear magnetic resonance spectroscopy

2022-09-30 发布　　2023-04-01 实施

中华人民共和国工业和信息化部　发布

前　言

本文件按照 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。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件由全国食品发酵标准化中心归口。

本文件起草单位：中轻食品检验认证有限公司、中国食品发酵工业研究院有限公司、广西壮族自治区分析测试研究中心、武汉中科牛津波谱技术有限公司、天津大学分析测试中心、无限极（中国）有限公司、承德京天食品科技有限公司、西安天美生物科技股份有限公司、普研（上海）标准技术服务有限公司。

本文件主要起草人：钟其顶、樊双喜、冯翠萍、刘一诺、吉鑫、仇凯、黄一帆、罗欢、邓小娟、孙红梅、刘伟德、周志桥、徐建成、胡永卫、吴海平。

本文件为首次发布。

食品中水苏糖的测定　核磁共振波谱法

1　范围

本文件描述了食品中水苏糖的测定方法——核磁共振波谱法。

本文件适用于采用核磁共振波谱法测定食品中的水苏糖，包括水苏糖原料、饮料及压片糖果。

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 6682－2008　分析实验室用水规格和试验方法

JY/T 0578－2020　超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱测试方法通则

JJF 1448－2014　超导脉冲傅里叶变换核磁共振谱仪校准规范

3　术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4　原理

在充分弛豫条件下，一维核磁共振波谱谱峰的积分面积与样品中所对应的自旋核的数目成正比。同时基于核磁共振信号强度（峰面积）互易原理，即给定线圈中核磁共振信号强度与90°脉冲宽度成反比，分别测定外标参考物质和待测样品的一维核磁共振氢谱（^{1}H NMR）及90°脉冲宽度，采用外标法测定样品中水苏糖的含量。

5　试剂和材料

5.1　一般要求

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682－2008 规定的二级或二级以上水。

5.2　试剂

5.2.1　重水（D_2O）：纯度不小于 99.8%。

5.2.2　磷酸二氢钾（KH_2PO_4）。

5.2.3　叠氮化钠（NaN_3）。

5.2.4　3-（三甲基硅烷基）氘代丙酸钠[$(CH_3)_3SiCD_2CD_2CO_2Na$，TSP-D_4]。

5.2.5　磷酸（H_3PO_4）：85%，质量分数。

5.3 试剂配制

5.3.1 TSP-D_4溶液（100 g/L）：称取1.00 g（精确至10 mg）TSP-D_4（5.2.4）至10 mL容量瓶，用重水（5.2.1）定容，混匀。

5.3.2 叠氮化钠溶液（130 g/L）：称取0.13 g（精确至10 mg）叠氮化钠（5.2.3）至10 mL容量瓶，用重水（5.2.1）定容，混匀。

5.3.3 磷酸二氢钾溶液（80 g/L）：称取8.00 g（精确至10 mg）磷酸二氢钾（5.2.2）至100 mL容量瓶，用重水（5.2.1）定容，混匀。

5.3.4 磷酸盐缓冲液：将100 mL磷酸二氢钾溶液（5.3.3）转移至200 mL容量瓶中，向其中加入5 mL磷酸（5.2.5）、2 mL TSP-D_4溶液（5.3.1）、2 mL叠氮化钠溶液（5.3.2）以及50 mL 重水（5.2.1），混匀。静置24 h后，测定该溶液pH，若pH大于2，则加入适量磷酸（5.2.5）调整，若pH小于 2，则加入适量磷酸二氢钾(5.2.2)调整，直至pH为2.00±0.02。再次静置24 h后，测定并调节pH至稳定为2.00±0.02。

5.4 标准品

5.4.1 柠檬酸标准品（$C_6H_8O_7$，CAS号：77-92-9）：纯度不小于99%，或国家有证标准物质。

5.4.2 水苏糖标准品（$C_{24}H_{42}O_{21}$，CAS号：54261-98-2）：纯度不小于98%，或国家有证标准物质。

5.5 标准溶液配制

5.5.1 外标柠檬酸溶液（2 000 mg/L）：称取200.0 mg（精确至0.1 mg）柠檬酸标准品（5.4.1）至100 mL容量瓶，用水定容，混匀。4℃密封保存，保质期1个月。

5.5.2 水苏糖标准贮备液（10 000 mg/L）：称取100 mg（精确至0.1 mg）水苏糖标准品（5.4.2）至10 mL容量瓶，用水定容，混匀，现用现配。

5.5.3 水苏糖系列标准工作液：分别准确吸取100 μL、200 μL、400 μL、600 μL、800 μL、1 000 μL、1 500 μL、2 000 μL水苏糖标准贮备液（5.5.2）于不同的10 mL容量瓶中，用水定容，摇匀，配制成100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L、800 mg/L、1 000 mg/L、1 500 mg/L、2 000 mg/L水苏糖系列标准工作液，现用现配。可根据样品中水苏糖含量适当调整水苏糖标准工作液质量浓度及水苏糖标准贮备液（5.5.2）质量浓度。

6 仪器设备

6.1 核磁共振波谱仪：氢（^1H）共振频率不低于400 MHz；可控温，温度精度不低于±0.1 K。

6.2 核磁共振样品管：外径5 mm，同心且均匀。

6.3 分析天平：感量为0.1 mg和1 mg。

6.4 涡旋震荡仪。

6.5 pH计：精度为±0.01。

6.6 移液器：量程为10 μL～100 μL和100 μL～1 000 μL。

6.7 水系微孔过滤膜：孔径0.45 μm。

7 试验步骤

7.1 样品前处理

7.1.1 固体样品母液制备

准确称取 300 mg（精确至 0.1 mg）粉末状样品（对于非粉末样品，应将样品研磨成粉末）于 10 mL 容量瓶，用水溶解并定容，充分混匀。取 2 mL 溶液，使用 0.45 μm 水系微孔过滤膜过滤至样品瓶，现用现配。

7.1.2 液体样品母液制备

取2 mL液体样品，使用0.45 μm水系微孔过滤膜过滤至样品瓶。

7.1.3 上机样品制备

用移液器准确吸取900 μL外标柠檬酸溶液（5.5.1）于2 mL离心管，再准确加入100 μL磷酸盐缓冲液（5.3.4），涡旋振荡30 s混匀后，吸取600 μL溶液于核磁共振样品管中用于上机测试。分别准确吸取900 μL水苏糖系列标准工作液（5.5.3）、固体样品母液（7.1.1）和液体样品母液（7.1.2），按照以上同样的步骤分别制备上机样品。

7.2 上机测定参考条件

7.2.1 核磁共振样品管不旋转。
7.2.2 检测温度：（300.0±0.1）K。
7.2.3 空扫次数：4 次。
7.2.4 扫描次数：64 次。
7.2.5 谱宽：8 000 Hz。
7.2.6 采样点数：65536。
7.2.7 接收增益：16。
7.2.8 弛豫延迟时间：不小于 4 s。
7.2.9 水峰压制脉冲序列：预饱和加相位循环。

7.3 上机测定

7.3.1 按照 JY/T 0578－2020 的规定对探头温度进行校正；按照 JJF 1448－2014 的规定对 ^{1}H 谱灵敏度、分辨力、线性、^{1}H 谱定量重复性进行校准。
7.3.2 将装有上机样品（7.1.3）的核磁共振样品管置于核磁共振波谱仪检测腔内，设置样品管不旋转。
7.3.3 设置待测样品温度为 300.0 K，测样前应等待样品温度稳定。
7.3.4 新建氢谱标准试验文件。
7.3.5 锁场与调谐。
7.3.6 匀场。
7.3.7 测定样品的 90°脉冲宽度，并记录结果。
7.3.8 调用有相位循环的预饱和水峰压制脉冲序列。
7.3.9 在 7.2 条件下设定参数，根据记录结果（7.3.7）设定 90°脉冲宽度，根据水峰压制效果优化水峰压制位置、压制功率等，保持各样品接收器增益值一致。
7.3.10 采集并保存数据。

8 数据处理

8.1 数据预处理

对原始数据进行傅里叶变换、相位校正和基线校正，并以TSP-D_4中硅烷甲基的化学位移作为零点进行定标。

8.2 定性分析

对水苏糖标准品和外标柠檬酸的^{1}H NMR谱（见附录A）信号峰进行归属，得到水苏糖和柠檬酸的定量相关参数（见附录A），包括定量峰化学位移、耦合常数、氢原子数量及积分区域。应注意定量峰积分区域未受到干扰。

8.3 定量峰积分

根据定性分析（8.2）得到的积分区域进行积分，分别得到外标柠檬酸和水苏糖标准品定量峰积分面积。

9 结果计算

9.1 校正因子（CF）的计算

9.1.1 水苏糖系列标准工作液上机样品质量浓度计算

水苏糖系列标准工作液（5.5.3）质量浓度按照公式（1）计算：

$$C_S = \frac{C_Q}{M(W_Q)} \times \frac{A_S}{A_Q} \times \frac{N(H_Q)}{N(H_S)} \times \frac{N(S_Q)}{N(S_S)} \times \frac{P_S}{P_Q} \times \frac{T_S}{T_Q} \times M(WS) \cdots\cdots (1)$$

式中：

C_S ——水苏糖系列标准工作液上机样品质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

C_Q ——外标柠檬酸溶液上机样品质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

$M(W_Q)$ ——柠檬酸摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）；

A_S ——上机样品中水苏糖定量峰积分面积；

A_Q ——外标柠檬酸溶液上机样品中柠檬酸定量峰积分面积；

$N(H_Q)$ ——外标柠檬酸溶液上机样品中柠檬酸积分区域对应的氢原子数量；

$N(H_S)$ ——上机样品中水苏糖积分区域对应的氢原子数量；

$N(S_Q)$ ——外标柠檬酸溶液上机样品扫描次数；

$N(S_S)$ ——上机样品扫描次数；

P_S ——上机样品^{1}H 90°脉冲宽度；

P_Q ——外标柠檬酸溶液上机样品^{1}H 90°脉冲宽度；

T_S ——上机样品检测温度，单位为开尔文（K）；

T_Q ——外标柠檬酸溶液上机样品检测温度，单位为开尔文（K）；

$M(W_S)$ ——水苏糖摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）。

9.1.2 回归方程绘制

以公式（1）计算得到的水苏糖质量浓度为横坐标，水苏糖系列标准工作液（5.5.3）实际质量浓度为纵坐标，建立线性回归方程 $y=ax+\beta$，校正因子（CF）为线性回归方程的斜率a。

9.2 固体样品中水苏糖含量计算

固体样品中水苏糖的含量按照公式（2）计算：

$$C_{S\text{-}S}=\frac{C_S\times V\times 1000}{m_s\times 1000\times 1000}\times CF \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (2)$$

式中：

$C_{S\text{-}S}$ ——固体样品中水苏糖的含量，单位为克每千克（g/kg）；

C_S ——水苏糖系列标准工作液质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V ——固体样品用水定容后的体积，单位为毫升（mL）；

m_s ——称取的固体样品质量，单位为克（g）；

CF ——校正因子，线性回归方程的斜率a；

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，小数点后保留 1 位数字。

9.3 液体样品中水苏糖的含量计算

液体样品中水苏糖的含量按照公式（3）计算：

$$C_{S\text{-}L}=C_S\times CF \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (3)$$

式中：

$C_{S\text{-}L}$ ——液体样品中水苏糖的含量，单位为毫克每升（mg/L）；

C_S ——水苏糖系列标准工作液质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

CF ——校正因子，线性回归方程的斜率a。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，小数点后保留 1 位数字。

10 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的10%。

11 检出限及定量限

11.1 固体样品

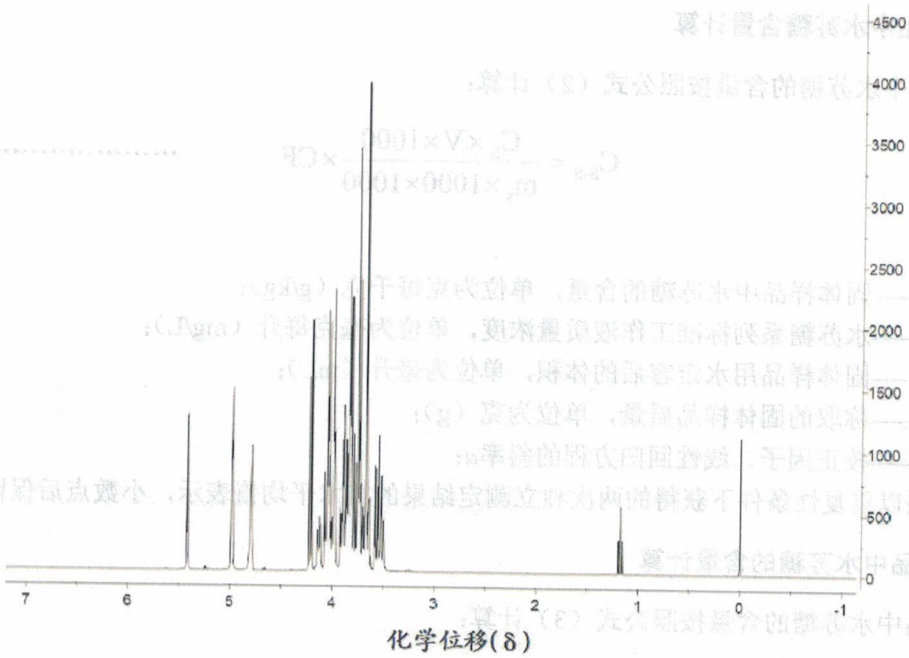
压片糖果、固体饮料及水苏糖原料中的水苏糖检出限为 1.1 g/kg，定量限为 4.1 g/kg。

11.2 液体样品

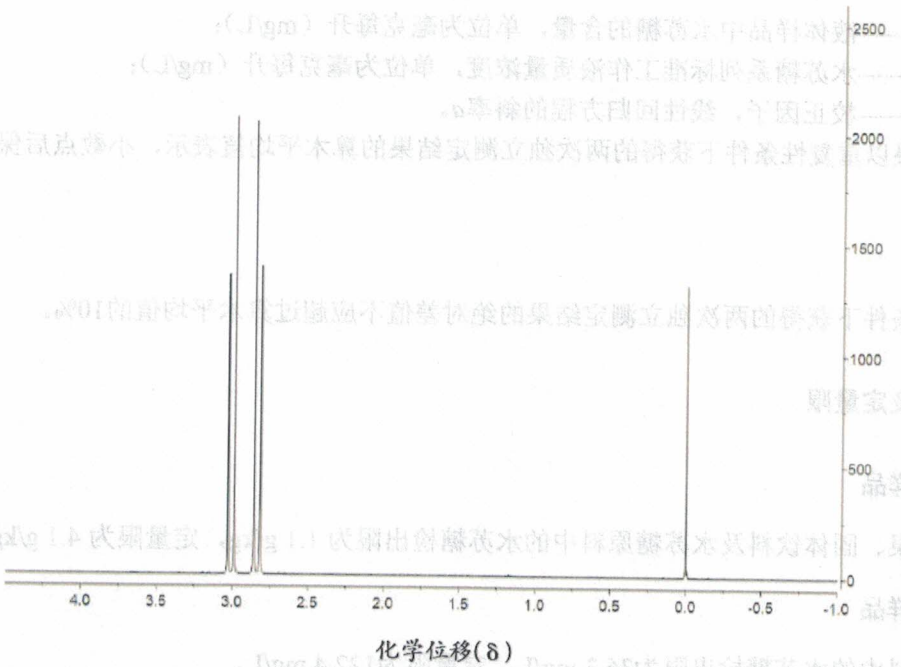
液体饮料中的水苏糖检出限为36.3 mg/L，定量限为122.4 mg/L。

附 录 A
（资料性）
水苏糖和柠檬酸^{1}H NMR谱及定量相关参数

图A.1和图A.2分别给出了水苏糖和柠檬酸^{1}H NMR谱。表A.1给出了定量相关参数。



图A.1 水苏糖^{1}H NMR谱



图A.2 柠檬酸^{1}H NMR谱

表A.1　定量相关参数

化合物	摩尔质量/（g/mol）	δ_H（峰形，耦合常数）	氢原子数量	积分区域（$\Delta\delta$）	检测温度/K
水苏糖	666.59	5.44（d，J=3.8 Hz）	1	5.359～5.503	300.0
		5.00（m，J=3.5 Hz）	2	4.908～5.077	
柠檬酸	192.14	3.01（d，J=15.7 Hz）	2	2.921～3.143	
		2.84（d，J=15.7 Hz）	2	2.693～2.916	

中 华 人 民 共 和 国
轻 工 行 业 标 准
食品中水苏糖的测定　核磁共振波谱法
QB/T 5761—2022
*
中国轻工业出版社出版发行
地址：北京东长安街 6 号
邮政编码：100740
发行电话：(010) 65241695
网址：http://www.chlip.com.cn
Email：club@chlip.com.cn

轻工业标准化编辑出版委员会编辑
地址：北京西城区月坛北小街 6 号院
邮政编码：100037
电话：(010)68049923
*
版权所有　侵权必究
书号：155019·6040
印数：1—200 册　　定价：30.00 元