

金针菇中多糖的测定 苯酚-硫酸法

Determination of polysaccharide for needle mushroom-phenol - sulfuric acid method

地方标准信息服务平台

2015 - 02 - 01 发布

2015 - 03 - 01 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2001给出的规则起草。

本标准由吉林省农业委员会提出并归口。

本标准起草单位：吉林农业大学。

本标准主要起草人：宋慧、李雨婷、王健、吴雷、郭志欣、金周雨、郭超、杨雪、王岩、张赫。

地方标准信息服务平台

金针菇中多糖的测定 苯酚-硫酸法

1 范围

本标准规定了金针菇中水溶性多糖含量苯酚-硫酸测定方法。
本标准适用于金针菇子实体（干品、鲜品）中水溶性多糖含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 15674-2009 食用菌中粗脂肪含量的测定
NY/T 1676-2008 食用菌中粗多糖含量的测定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

水溶性多糖 Water-soluble polysaccharide

一类能够溶解或者溶胀于H₂O中形成水溶液或分散体系的多糖。

4 原理

试料经热水提取，通过透析膜透析，得到的多糖在浓硫酸作用下，先水解成单糖，并脱水生成糖脎衍生物，与苯酚生成橙黄色物质，在490 nm处有最大吸收，吸光度值与多糖含量呈正比。

5 试剂与材料

除非有特殊说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。

5.1 硫酸（H₂SO₄）， $\rho=1.84$ g/mL。

5.2 95%乙醇（CH₃CH₂OH）。

5.3 苯酚（C₆H₆O），重蒸馏，将苯酚置于80℃的水浴中溶解，然后将一定量的苯酚移至蒸馏烧瓶中。放入玻璃珠数粒，于182℃蒸馏，弃去最初2 min~3 min蒸馏液，收集随后的蒸馏液，待冷却后备用。

警告--苯酚蒸汽有腐蚀性和毒性，重蒸馏需在通风橱内进行。

5.4 葡萄糖（C₆H₁₂O₆）标准品（CAS:50-99-7）。

5.5 800 g/L 苯酚溶液：量取80 g重蒸馏苯酚（5.3）于100 mL烧杯中，加水溶解，定容至100 mL，于棕色磨口瓶中，4℃冰箱，贮存期为2个月。

- 5.6 50 g/L 苯酚溶液：将 5 mL 800 g/L 苯酚溶液（5.5）稀释为总体积 80 mL 混合液，现用现配。
- 5.7 葡萄糖标准储备液：称取 0.1000 g 葡萄糖于 100 mL 烧杯中，加水溶解，定容至 100 mL，此溶液浓度为 1.0 g/L，于磨口瓶中，置 4 °C 冰箱，贮存期为 15 天。
- 5.8 葡萄糖标准工作液：将 5 mL 葡萄糖标准储备液（5.7）稀释为总体积 50 mL 混合液，现用现配；
- 5.9 透析袋：D 36 mm，截留分子量 6000~8000 Da。
- 5.10 标准筛：20 目，0.9 mm。

6 仪器设备

- 6.1 紫外-可见分光光度计，1 cm 比色杯。
- 6.2 分析天平，感量 0.0001 g。
- 6.3 离心机，转速在 4000 rpm 以上，离心管容量 ≥50 mL。
- 6.4 超声波提取器。
- 6.5 干燥箱，RT+10 °C~250 °C。

7 试样的制备

应按照 GB/T 15674-2009 中 6.2 的要求进行制备。

- 7.1 干样：将试样剪成小块，于 80 °C 干燥箱中烘至发脆后置于干燥器内冷却，立即粉碎。粉碎样品过孔径为 0.9 mm 的筛。未能过筛的部分再次粉碎或经研磨后再过筛，直至全部样品过筛为止，过筛后的样品全部混匀后装入清洁的广口瓶内密封保存，备用。
- 7.2 鲜样：将试样用手撕或刀切成小块，50 °C 鼓风干燥 6 h 以上，待样品半干后逐步提高温度至 80 °C，烘至发脆后置于干燥器内冷却，立即粉碎。其他操作同 7.1。

8 分析步骤

8.1 提取

应按照 NY/T 1676-2008 中 7.2 的要求进行提取。

称取 1.0 g 粉碎过 0.9 mm 孔径筛的试样（7.1 或 7.2），精确到 0.001 g，置于 50 mL 具塞离心管内。用 5 mL 水浸润试样，缓慢加入 20 mL 无水乙醇，充分振摇，使混合均匀，置超声提取器中超声提取 30 min。提取结束后，于 4000 rpm/min 离心 10 min，弃去上清液。不溶物用 10 mL 乙醇溶液洗涤、离心。用 30 mL 水分次将上述不溶物全部转入具塞锥形瓶中，以无菌透气封口膜封口后，于沸水浴中提取 2 h。冷却至室温，过滤，滤液备用。

8.2 透析

可以选择静止透析或流水透析方法。透析后，透析袋内溶液即为试料测定液。

- 8.2.1 静止透析：将滤液转移至长约 15 cm 透析袋（5.9）中，封口。将透析袋放入装有蒸馏水的 1000 mL 烧杯中。4 °C 透析 1 小时后更换透析外液；继续透析 2 小时后更换透析外液；再继续透析 3 小时后更换透析外液；再继续透析 3 小时，弃去透析外液，将透析袋内溶液转至 100 mL 容量瓶中，加水定容。
- 8.2.2 流水透析：将透析袋放入 500 mL 烧杯中，置于装有 5 L 蒸馏水的下口瓶下方，控制流速 10 mL/min，流水透析 6 h~7 h。将透析袋内溶液转至 100 mL 容量瓶中，加水定容。

8.3 标准曲线的绘制

准确吸取0.0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL 的标准葡萄糖工作液（5.8）于25 mL 具塞试管中，用水补至1.0 mL，葡萄糖质量分别为0 μg、20 μg、40 μg、60 μg、80 μg、100 μg，向试管中加入1.0 mL苯酚溶液（5.6），迅速摇匀，沿试管壁加入5.0 mL浓硫酸，迅速摇匀后盖塞，静置10 min，30 ℃水浴反应20 min，迅速冷却，转移至1 cm比色皿中，在490 nm处测定吸光度值。以葡萄糖的质量为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

8.4 测定

准确吸取0.1 mL试料测定液（8.2）于25 mL具塞试管中，按8.3操作，测定吸光度值。同时做空白试验。

9 结果计算

从标准曲线上查得测定液相应含量，单位以克每百克（g/100g）表示，按公式（1）计算：

$$C = \frac{M_1 \times V_1 \times 100}{M_2 \times V_2 \times 10^6} \times 0.9 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C ——样品中多糖的含量，%；

M_1 ——从标准曲线上查得测定液中葡萄糖含量，μg；

V_1 ——试样提取后定容体积，ml；

V_2 ——具塞色管中加入待测液体积，ml；

M_2 ——样品称量质量，g；

0.9——葡萄糖换算成葡聚糖时的校正系数；

注：计算结果保留至小数点后两位。

10 精密度

在重复性测定条件下获得的两次平行测试结果的绝对差值不大于算术平均值的10%，以大于这两个测定值的算术平均值的10%的情况不超过5%为前提。