

# 导数光谱法快速测定食用菌多糖

陈悦娇 马应丹 谢武珊

(仲恺农业技术学院食品科学系, 广州, 510225)

**摘要** 研究中发现多糖-苯酚-硫酸显色反应体系的一阶导数光谱值与多糖含量成正比, 据此建立了苯酚-硫酸显色导数光谱分析多糖的方法。它具有选择性好, 不受样品颜色的干扰, 所需样品量少, 测定简便、快速、准确的优点。直接应用于灰树花、猴头菇、姬松茸等食用真菌水提液中多糖含量的测定, 取得满意的结果。

**关键词** 苯酚-硫酸法, 导数光谱, 多糖

多糖是由单糖分子以糖苷键结合而成的大分子化合物, 普遍存在于动物、植物和食用菌产品中。在众多多糖物质中, 最令人瞩目的要数真菌多糖。它具有增强机体免疫功能, 延缓机体细胞衰老, 降低血糖和血脂, 以及具有抗癌防癌活性<sup>[1]</sup>。目前已开发的真菌活性多糖有香菇多糖、银耳多糖、猴头菇多糖和茯苓多糖等。产品形式有口服液、发酵液、精粉等。随着多糖的制备、结构、合成、药理学及临床学研究的不断深入, 食用菌多糖的开发应用将具有更广阔的前景, 因此多糖含量的测定具有重要意义。文中研究建立了1种快速测定食用菌多糖的方法——导数光谱法, 并将其应用于灰树花、猴头菇、姬松茸等食用菌多糖的测定, 取得了令人满意的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

灰树花(福建产)、猴头菇(黑龙江产)、姬松茸(福建产)等均为市售。干燥粉碎后密封保存于玻璃瓶备用。

UV-754 分光光度计, SB3200 超声波仪, 真空恒温干燥箱, SH2-3(Ⅲ)型循环水真空泵, 索氏提取器。

葡萄糖, 无水乙醇, 95%乙醇, 苯酚, 浓 $H_2SO_4$ ,  $NaHCO_3$ 。试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

**苯酚的精制:**取苯酚 200 g, 加 Al 片 0.2 g

和  $NaHCO_3$  0.1 g, 蒸馏, 收集 182℃ 馏分。置棕色瓶中于冰箱保存备用。

**葡萄糖标液的配制:**精密称取 105℃ 干燥至恒重的葡萄糖 100.0 mg, 配制成 1.000 mg/mL 的标准溶液, 精密吸取上述标准液 5.00 mL 置于 50 mL 容量瓶中, 再加蒸馏水稀释到刻度, 得  $1.000 \times 10^{-1}$  mg/mL 葡萄糖标准液。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 多糖的提取

**方法 1** 称取食用菌粉末 3 g, 置索氏提取器中, 用 95%乙醇回流提取至无色<sup>[2]</sup>。残渣取出加水洗涤、过滤、烘干, 加入 100 mL 蒸馏水在 75℃ 恒温水浴中浸取约 30 min, 超声波提取 30 min, 再在 75℃ 恒温水浴中浸取约 2 h, 过滤, 滤液为粗多糖提取液。

**方法 2** 称取食用菌粉末 3 g, 置索氏提取器中, 用 95%乙醇回流提取至无色<sup>[2]</sup>。残渣取出加水洗涤、过滤、烘干, 加入 100 mL 蒸馏水在 75℃ 恒温水浴中浸取约 6 h<sup>[3]</sup>, 过滤, 滤液为粗多糖提取液。

#### 1.2.2 多糖的测定

##### 1.2.2.1 标准曲线的制作

精密量取葡萄糖溶液 0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 和 0.60 mL, 分别置于 10 mL 干燥比色管中, 加蒸馏水至体积 1.00 mL, 加入苯酚试剂 0.50 mL, 混匀, 迅速加入浓  $H_2SO_4$  3.00 mL, 即刻摇匀, 放置 5 min, 置沸水浴中加热 15 min, 取出冷却至室温。用 UV-754 分光光度计在

420~550 nm 波长范围内扫描,绘制零阶和一阶导数吸收光谱。

1.2.2.2 样品测定

精密吸取供试液 0.10 mL 或 0.20 mL 置于 10 mL 干燥比色管中,加蒸馏水至体积 1.00 mL,加入苯酚试剂 0.50 mL,混匀,迅速加入浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.00 mL,即刻摇匀,放置 5 min,置沸水浴中加热 15 min,取出冷却至室温。用 UV-754 分光光度计在 420~550 nm 波长范围内扫描,绘制零阶和一阶导数吸收光谱。

2 结果与分析

2.1 显色条件的选择

根据苯酚-硫酸法显色的原理以及其有色物质的一阶导数光谱在 475~501 nm 间的波峰-波谷间距值定量,效果最好。以苯酚的浓度(A)、浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的用量(B)、沸水浴加热时间(C)为考察因素,每个因素各取 3 个水平,依 L<sub>9</sub>(3)正交设计试验法确定苯酚-硫酸法显色的最优实验条件<sup>[2]</sup>。实验数据和计算结果见表 1。

表 1 正交试验结果的极差分析

试验号	A/%	B/mL	C/min	dA/dλ
1	A <sub>1</sub> (3)	B <sub>1</sub> (2.5)	C <sub>1</sub> (5)	0.020
2	A <sub>1</sub> (3)	B <sub>2</sub> (2.0)	C <sub>2</sub> (10)	0.011
3	A <sub>1</sub> (3)	B <sub>3</sub> (3.0)	C <sub>3</sub> (15)	0.027
4	A <sub>2</sub> (4)	B <sub>1</sub> (2.5)	C <sub>1</sub> (10)	0.024
5	A <sub>2</sub> (4)	B <sub>2</sub> (2.0)	C <sub>2</sub> (15)	0.015
6	A <sub>2</sub> (4)	B <sub>3</sub> (3.0)	C <sub>3</sub> (5)	0.023
7	A <sub>3</sub> (5)	B <sub>1</sub> (2.5)	C <sub>3</sub> (15)	0.020
8	A <sub>3</sub> (5)	B <sub>2</sub> (2.0)	C <sub>1</sub> (5)	0.009
9	A <sub>3</sub> (5)	B <sub>3</sub> (3.0)	C <sub>2</sub> (10)	0.022
Σ1	0.058	0.064	0.052	
Σ2	0.062	0.035	0.057	
Σ3	0.051	0.072	0.062	
Σ1/3=k <sub>1</sub>	0.019	0.021	0.017	
Σ2/3=k <sub>2</sub>	0.021	0.012	0.019	
Σ3/3=k <sub>3</sub>	0.017	0.024	0.021	
极差 R	0.004	0.013	0.004	

注:dA/dλ 为一阶导数光谱在 475~501 nm 间的波峰-波谷间距值。

极差的大小可以反映各因素对指标影响程度,根据表 1 的极差分析,可知浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的用量对显色的影响最大,苯酚浓度和加热时间对显色的影响程度相等。从表 1 还可看出,因素 A 以第 2 水平为最好,因素 B 以第 3 水平为最

好,因素 C 以第 3 水平为最好,因此最优水平搭配为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>。由此可知,最优实验条件为:苯酚的浓度为 4%,浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的用量为 3.00 mL,加热时间为 15 min。

2.2 乙醇对显色反应的影响

由于在多糖的提取过程中要用到乙醇介质,多糖测定时经常要考虑乙醇的影响。精密量取无水乙醇 0.00、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 mL,分别加入葡萄糖溶液 0.20 mL,用上述方法测定<sup>[5]</sup>。其零阶导数吸收光谱和一阶导数吸收光谱测定值列于表 2。

表 2 乙醇对显色反应的影响

无水乙醇体积 /mL	最大吸收波长 /nm	吸光度	导数光谱测定值
0.00	488.0	0.272	0.015
0.10	486.0	0.293	0.015
0.20	485.0	0.310	0.015
0.30	484.0	0.0347	0.015
0.40	482.0	0.375	0.0165
0.50	481.0	0.401	0.018
0.60	480.0	0.433	0.018

由表 2 数据可以看出,乙醇介质的存在对显色反应有较大影响,随着乙醇量增大,吸光度 A 显著增大,且最大吸收波长发生变化,逐渐向短波方向移动。若采用一阶导数法,在 0~0.30 mL 乙醇范围内导数值不变,乙醇达 0.40 mL 时,导数值增大 10%。故在少量乙醇存在的情况下采用一阶导数吸收光谱测定多糖时可消除乙醇的干扰。

2.3 标准曲线

按 1.2.2.1 进行。以一阶导数吸收光谱在 475~501 nm 间的波峰-波谷间距为纵坐标,以葡萄糖浓度为横坐标求得标准曲线回归方程为:dA/dλ=0.002 94c+0.002 54,相关系数为 0.999 1。结果表明,在所试验的 2.22~13.33 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.4 多糖提取方法的选择

以灰树花为实验原料,按照方法 1 和方法 2 对灰树花进行粗多糖提取,2 种方法所得的灰树花多糖导数光谱测定值基本相近。而从时间上考虑,方法 2 至少需要 6h 以上,影响实验进度。方法 1 只需 3h,而且经过 30 min 的浸提可

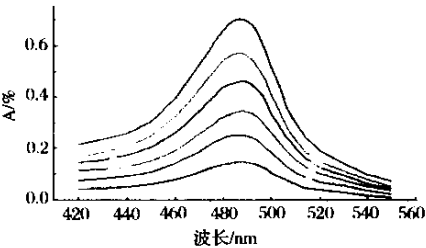


图 2 葡萄糖的吸收光谱

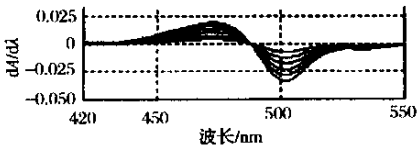


图 3 葡萄糖的一阶导数吸收光谱

使原料充分软化,再使用超声波破碎,最后经过2h的浸提,多糖得以充分提取。

表 3 两种多糖提取方法的比较

方法	导数光谱测定值				
	1 次	2 次	3 次	4 次	5 次
1	0.0355	0.0345	0.0330	0.0345	0.0350
2	0.0340	0.0335	0.0330	0.0340	0.0345

2.5 样品多糖含量的测定

灰树花、猴头菇、姬松茸分别按 1.2.2 方法进行提取与测定,吸光度值代入标准曲线,求得各样品的多糖含量结果,见表 4。

表 4 样品的多糖含量

样 品	多糖含量/%					平均值
	1 次	2 次	3 次	4 次	5 次	
灰树花	16.80	16.30	15.54	16.56	15.54	16.15
猴头菇	17.58	18.09	17.84	17.58	17.84	17.79
姬松茸	11.97	11.97	11.46	11.71	11.97	11.82

2.6 精密度考察实验

3 种样品分别重复测定 5 次,由数据彼此符合的程度确定方法的精密度。结果表明,精密度良好。

2.7 稳定性考察实验

每隔一段时间测定样品多糖提取液吸光度,以考察其稳定性,结果见表 6。结果表明,其导数光谱值在显色后 0.5 h 达到最高,在 2 h 内基本稳定。

表 5 精密度试验结果

品名 种类	导数光谱测定值					平均值	RSD /%
	1 次	2 次	3 次	4 次	5 次		
灰树花	0.0355	0.0345	0.035	0.035	0.0345	0.0349	1.2
猴头菇	0.037	0.038	0.0375	0.037	0.0375	0.0374	1.18
姬松茸	0.026	0.026	0.025	0.0255	0.026	0.0257	1.74

表 6 稳定性试验结果

品名 种类	各个时间的导数光谱测定值					平均值	RSD /%
	0 h	30 h	60 h	90 h	120 h		
灰树花	0.0345	0.035	0.034	0.033	0.0325	0.0338	3.07
猴头菇	0.037	0.038	0.0375	0.037	0.036	0.0371	1.99
姬松茸	0.025	0.026	0.0255	0.025	0.0245	0.0252	2.26

2.8 重现性考察实验

同一批样品重复测定 5 次,由实验测得数据求得一阶导数吸收光谱值,结果见表 7。结果表明,重现性良好。

表 7 重现性试验结果

品名 种类	导数光谱测定值					平均值	RSD /%
	1 次	2 次	3 次	4 次	5 次		
灰树花	0.0355	0.040	0.0345	0.033	0.0345	0.0355	7.38
猴头菇	0.037	0.038	0.037	0.0375	0.0365	0.0372	1.14
姬松茸	0.025	0.026	0.0245	0.0255	0.025	0.0252	2.26

2.9 回收率实验

精密量取已知多糖含量的灰树花、猴头菇、姬松茸粉末各 3 份,每份 3 g,在同一种样品的 3 份中,分别加入标准葡萄糖 100 mg、200 mg、300 mg,按 1.2.2 方法操作。将导数吸收光谱波峰-波谷间距代入标准曲线回归方程得以葡萄糖量计的总多糖含量,计算其回收率。结果列于表 8。

表 8 回收率试验结果

种类	样品质量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
	/μg	/μg	/μg	/%		
灰树花	48.92	10	57.34	97.31	96.55	0.995
	49.68	20	66.52	95.47		
	48.15	30	75.70	96.87		
猴头菇	51.98	10	61.93	99.91	99.15	1.49
	52.51	20	72.64	100.1		
	53.98	30	81.83	97.44		
姬松茸	35.14	10	44.33	98.2	96.65	1.42
	34.38	20	51.98	95.59		
	33.61	30	61.16	96.15		

在多糖含量测定中,因得到相应多糖对照品较困难,尤其当多糖组成复杂时,往往采用单糖如葡萄糖代替对照品测定样品中多糖的相对

含量。实验中的测定结果是以多糖的水解产物葡萄糖来表示多糖的相对含量。从测定结果看出,其回收率高,均在95%以上。

### 3 讨论与小结

食用真菌中多糖的测定目前广泛采用的是苯酚-硫酸比色法<sup>[4]</sup>,此法虽简单、快速、无需多糖纯品和高级仪器,但要求被测溶液本身无颜色或颜色较浅,而且溶液中其他组分在490 nm左右无明显吸收或吸收甚小。而真菌如灰树花、猴头菇、姬松茸等往往有很深的棕褐色,对测定产生较大干扰。所以测定前一般要经过活性炭脱色或其他处理<sup>[5]</sup>,费时费力,且容易产生较大误差。导数光谱亦称微分光谱,属紫外吸收光谱派生的一个分支,对复杂组分可不经分离而直接测定,近年来在医药检验及药物质量控制方面得到广泛应用<sup>[6]</sup>。

试验中用苯酚-硫酸导数光谱法快速测定食用真菌中的多糖含量,理论上其一阶导数峰顶峰谷应在467~501 nm,实测得峰顶在475 nm处,峰谷在501 nm,非常吻合,试验结果表

明,其导数光谱测定值与浓度有较好的线性关系,同时也有较好的精密度、准确性、稳定性及较高回收率,且克服了本身颜色和其他成分的影响。在多次试验中发现,不同食用菌样品测得峰顶475 nm和峰谷501 nm的位置均无偏离。故本法是一种经济、简便、快速、准确的食用真菌中多糖的测定手段。对食用菌多糖的进一步研究和开发利用具有积极的意义,具有一定的推广价值。

### 参 考 文 献

- 1 奚明金,靖士侠.部分植物多糖的药理作用[J].中国医院药学杂志,1994,14(2):80~82
- 2 周采菊,王 静.苯酚硫酸法测定肾石消胶囊中多糖的含量[J].中草药,1998,29(1):15~16
- 3 陆蕴如.中药化学[M].北京:学苑出版社,1995
- 4 司世麟,赵春桂.苯酚-浓硫酸比色定糖法的应用[J].生物化学与生物物理进展,1986(5):68~69
- 5 张双凤,林香娟.苯酚-硫酸法测定胖大海凉茶中多糖的研究[J].河南预防医学杂志,2000,11(3):144~145
- 6 王绪明,朱宝玉.导数光谱法在药物分析中的应用进展[J].解放军药学学报,2000,16(5):258~260

## Study on Derivative Spectrometry of Reaction System for Rapid Determination of Polysaccharides in Edible fungus

Chen Yuejiao Ma Yingdan Xie Wushan

(Department of Food Science, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou, 510225)

**ABSTRACT** It was found that the first derivative spectrometric value of polysaccharide-phenol-sulfuric acid reaction system was proportional to the content of polysaccharides. A phenol-sulfuric acid derivative spectrometry for determination of polysaccharides in edible fungus was proposed and proved to be an easy, rapid and accurate method with good selectivity, sensitivity and little interference of sample matrix color. The method was used to determine the content of polysaccharides in *Grifola frondosa*, *Hericium*, *Agaricus Blazei* with satisfied results.

**Key words** phenol-sulfuric acid method, derivative spectrum, polysaccharide