

褐蘑菇多糖提取及含量的测定

李 娜^①

(辽宁工程技术大学理学院生物系 辽宁省阜新市细河区中华路 47 号 123000)

摘 要 采用水提醇沉法从褐蘑菇中提取水溶性多糖,通过苯酚-硫酸比色法在 490nm 波长处测定多糖含量。在 5.00—40.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,葡萄糖质量浓度与吸光度呈良好线性关系,相关系数 $r=0.9981$,回收率在 97.82%—103.09% 之间,相对标准偏差 RSD 为 2.24% ($n=5$),褐蘑菇多糖含量为 3.01%。方法操作简单、显色稳定、准确度高,可作为褐蘑菇多糖工业化生产的常规检测方法。

关键词 褐蘑菇,多糖,提取,分光光度法。

中图分类号:O657.32

文献标识码:B

文章编号:1004-8138(2009)01-0043-04

1 前言

褐蘑菇盖大柄粗,菌肉肥厚,味道鲜美,是欧美、日本、新加坡等国家和地区畅销食用菌品种之一,具有较高的食用和药用价值,褐蘑菇多糖是其主要有效成分之一。经研究表明,真菌多糖具有增强免疫力、抗肿瘤、抗突变、抗病毒、抗氧化、抗辐射、降血压、降血脂及健胃保肝等功效,在食品、药品及保健品行业上有着广阔的应用前景^[1-3]。

褐蘑菇栽培作为栽培技术简单、生长周期短的劳动密集型产业,生产成本较低,已成为各地出口创汇及农民增收的新兴产业。但褐蘑菇出口以鲜品为主,在加工过程中会产生菌柄、菌盖、畸形菇、残次菇等下脚料,少数以低价进入市场或制成干菇,多数以废物形式丢弃,既污染环境又浪费资源,其有效成分未得到充分利用^[4]。

目前多糖的测定无统一方法,一般分为两大类,一类是直接法,如高效液相色谱法等,测定结果准确,但操作复杂,且需贵重仪器及多糖标准品,在实践中应用较少^[5,6];另一类是间接法,如斐林法、3,5-二硝基水杨酸法、苯酚-硫酸法、硫酸-恩酮法等,操作简单、快速,且不需贵重仪器,已被国内多数实验室采用,其中苯酚-硫酸法是常用方法之一^[7-12]。本文通过对褐蘑菇多糖提取及含量测定进行研究,为褐蘑菇资源的综合开发利用提供科学依据。

2 实验部分

2.1 材料

新鲜褐蘑菇样品,辽宁田园有限公司提供。

2.2 主要仪器与试剂

752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);FA 2104N 电子天平(上海精密科学

① 联系人,电话: (0418) 3350577; 手机: (0) 13841804662; E-mail: linanaoyongqiang@126.com

作者简介: 李娜(1976—),女,辽宁省北镇市人,硕士,讲师,从事食用菌真菌的教学和研究工作。

收稿日期: 2008-10-13; 接受日期: 2008-10-27

仪器有限公司); pH S-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); RE52-99 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 500mL 索氏提取器(北京玻璃仪器厂)。

葡萄糖、乙醇、苯酚、浓硫酸、丙酮、乙醚、石油醚等为分析纯试剂, 试验用水为双蒸馏水。

5% 苯酚溶液的配制: 称取 100g 苯酚晶体置于烧瓶中, 加入 0.1g 铝片和 0.05g 碳酸氢钠, 加热蒸馏, 收集 182℃ 馏分。称取重蒸苯酚 5.0g, 加适量水溶解后转移至 100mL 容量瓶中, 加水至刻度, 置于棕色瓶中放 4℃ 冰箱内备用。

葡萄糖标准贮备液的配制: 精确称取 105℃ 干燥至恒重的葡萄糖标准品 100.0mg, 置于 100mL 棕色容量瓶中, 加适量水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 1.0mg/mL 葡萄糖标准贮备液。

2.3 褐蘑菇多糖的提取

褐蘑菇样品用自来水洗去表面的培养基、泥沙等杂质, 吸干表面水分后准确称取 20.00g, 用高速组织捣碎机将其捣碎, 烘干制成粉末。粉末中加石油醚(60—90℃), 用索氏提取器回流脱脂 2h, 过滤, 滤渣挥干石油醚后放入 500mL 蒸馏烧瓶中, 95℃ 热水浸提 2h, 共提取 2 次, 合并提取液。过滤, 旋转蒸发器减压浓缩至一定体积后, 用 Sevage 法反复处理, 除尽蛋白质, 加 95% 乙醇调整乙醇含量至 80%, 置于 4℃ 冰箱中静置 24h, 3000r/min 离心 30min 收集沉淀物, 沉淀物用无水乙醇、丙酮、乙醚多次洗涤, 60℃ 真空干燥即得褐蘑菇多糖。

3 结果与讨论

3.1 校准曲线

准确吸取质量浓度为 1.0mg/mL 葡萄糖标准贮备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0mL, 分别加水定容到 100mL 容量瓶中, 则葡萄糖质量浓度分别为 5、10、20、30、40μg/mL。分别吸取 1.0mL 置于刻度试管中, 各加入 5% 苯酚溶液 1.0mL, 摇匀后迅速加入 5.0mL 浓硫酸, 混匀; 另吸取 1.0mL 双蒸馏水置于刻度试管中, 同上操作加苯酚和浓硫酸, 作为空白液。静置 20min 后, 以空白液作对照,

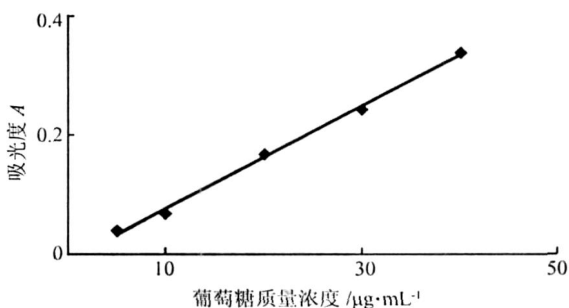


图 1 葡萄糖校准曲线

在 190—700nm 作紫外可见全波长扫描, 选择最大吸收波长处测定各管吸光度 A; 并以葡萄糖质量浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标, 绘制校准曲线, 结果如图 1 所示。

结果在 490nm 波长处有最大吸收峰, 因此在 490nm 波长处测定吸光度, 得回归方程 $y = 0.0086x - 0.0103$, 相关系数 $r = 0.9981$ ($n = 5$), 表明葡萄糖质量浓度在 5.00—40.00μg/mL 范围内, 吸光度与被测物呈良好线性关系。

3.2 样品中多糖含量测定

准确称取恒重的褐蘑菇多糖 50.0mg, 加适量水溶解后移至 100mL 容量瓶中, 加水至刻度。然后准确吸取待测样品液 1.0mL 置于刻度试管中, 按校准曲线方法测定吸光度, 由回归方程计算葡萄糖含量, 经换算得样品中多糖含量为 3.01%。

3.3 稳定性试验

准确吸取待测样品液 1.0mL 置于刻度试管中, 按校准曲线方法, 每隔 20min 测定吸光度 1 次, 共测定 6 次, 结果样品液在 2h 内稳定性良好, 相对标准偏差 RSD 为 2.16% ($n = 6$)。

3 4 回收率试验

准确吸取 0.5 mL 待测样品液 5 份置于刻度试管中, 分别加入不同质量浓度的葡萄糖标准贮备液 0.5 mL, 按校准曲线方法测定吸光度。结果加样回收率在 97.82%—103.09% 之间, 相对标准误差 RSD 为 2.24% ($n=5$), 见表 1。

表 1 回收率试验结果

序号	样品量(μg)	加样量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	相对标准偏差 RSD (%)
1	15.63	2.5	18.69	103.09	100.06	2.24
2	15.63	5.0	20.18	97.82		
3	15.63	10.0	25.27	98.60		
4	15.63	15.0	30.35	99.09		
5	15.63	20.0	36.24	101.71		

4 结论

(1) 在本试验中, 以空白液作对照, 葡萄糖标准贮备液经苯酚-硫酸显色后, 作全波长扫描, 结果在 490 nm 波长处有最大吸收峰, 因此选择 490 nm 波长为测定波长。

(2) 苯酚-硫酸法是多糖含量测定的常用方法之一, 先利用硫酸将多糖水解成单糖, 并迅速脱水生成糖醛, 糖醛与苯酚缩合形成有色化合物, 在 490 nm 波长处有特征吸收而测定的。本方法操作简单、显色稳定、准确度高, 且所需仪器和药品价格低廉, 可作为褐蘑菇多糖工业化生产的常规检测方法。

参考文献

[1] 李磊, 王卫国. 真菌多糖药理作用及其提取、纯化研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2008, 29(2): 87—92

[2] 沈业寿, 陶文娟. 真菌的应用研究-真菌多糖[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2003, 27(1): 93—97.

[3] 李小定, 荣建华, 吴谋成. 真菌多糖生物活性研究进展[J]. 食用菌学报, 2002, 9(4): 50—58

[4] 李娜. 出口褐蘑菇贮运保鲜技术[J]. 中国食用菌, 2008, 29(5): 48, 62

[5] 王刚, 杜士明, 肖森生等. 山药多糖的提取分离及山药总多糖的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(10): 1414—1416

[6] 钱一帆, 张磊, 濮存海. 高效液相色谱法测定灵芝孢子粉片中多糖含量的研究[J]. 中药材, 2007, 30(8): 1027—1029

[7] 张焱, 冯艳红, 喻华等. 非中和下斐林法测定柑桔果汁转化糖的研究[J]. 西南农业大学学报, 2006, 28(6): 1019—1022

[8] 尹银嘉, 魏士超, 马宝瑕. 3, 5-二硝基水杨酸法测定二味康口服液液中多糖的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(7): 414—416

[9] 裴瑾, 万德光, 杨林. 苯酚-硫酸比色法测定远志及地上部分多糖的含量[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(4): 337—339

[10] 常艳旭, 李晋, 苏格尔等. 锁阳不同生育期多糖含量的动态研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2007, 38(2): 237—240

[11] 刘桂君, 文华安. 大孢虫花菌丝体多糖提取工艺优化及其测定方法优选[J]. 菌物学报, 2006, 25(4): 624—632

[12] 杨帆, 郝爱国, 徐恒瑰等. 附子多糖的含量测定[J]. 大连医科大学学报, 2007, 29(5): 453—454

Extraction and Determination of Polysaccharide
from Portobello Mushroom

L I N a

(College of Science, Liaoning Technical University, Fuxin, Liaoning 123000, P. R. China)

Abstract Polysaccharide from portobello mushroom was extracted with hot water-ethanol method, and was determined at room temperature by phenol-sulphuric acid spectrophotometry 490 nm. The standard curve was liner in the concentration range of 5.00—40.00 $\mu\text{g/mL}$ with



correlation coefficient of $r = 0.9981$. The good recovery is 97.82%—103.09% with relative standard deviation of 2.24%. The contents of polysaccharide from portobello mushroom was 3.01%. This methods have advantages of simple operation, good stability and high accuracy, which can be used as the conventional testing methods of polysaccharide from portobello mushroom in industrial production.

Key words Portobello Mushroom, Polysaccharide, Extraction, Spectrophotometry.

2009 年《光谱实验室》征订启事

《光谱实验室》2009 年订价与 2007、2008 年相同:

双月刊, 16 开, 每册 256-288 页, 单月 25 日出版, 每份年订价为 240 元(1-6 期); 零售价为第 1 期 70 元/本, 其余 40 元/本。

欲订阅的读者请到当地邮电局(所)办理订阅手续, 邮发代号为 82-863。错过时间者, 可直接通过邮局汇款向本编辑部联络处订阅。

地址: 北京市 81 信箱 66 分箱 刘建林, 邮编: 100095, 电话: (010) 62452937。

《光谱实验室》编辑部

2009 年 1 月 25 日

过期《光谱实验室》期刊免费赠送启事

本部尚有一些过期(2004 及以前)的期刊, 凡同行中有需要者均可免费赠送, 但邮费(含包扎费和人工费)自付, 每 6 本(不同期)为 1 个单元, 约重 2-2.2kg, 收费(可用邮票支付)15 元。

有意者来信告知收件人姓名及详细地址, 同时将邮票放在信封中挂号寄来。

联系地址: 北京市 81 信箱 66 分箱《光谱实验室》编辑部联络处 刘建林, 邮编: 100095。

《光谱实验室》编辑部

关于赠送作者样刊和发放稿酬的通知

各有关作者:

从 2007 年第 1 期起, 本刊赠送作者发表自己论文的当期刊物(样刊), 均按篇赠送 2 本样刊, 用普通印刷品邮寄给作者联系人, 遗失不再补赠。若遗失或作者另有需要, 请在发表之日起 2 个月之内汇款购买(第 1 期 70 元/本; 其余 40 元/本, 免收挂号邮寄费), 逾期不再办理。

由于普通印刷品邮寄的送达时间不稳定, 若作者急需, 请预交特快专递费(30 元/件)。

给作者发放的稿酬均邮寄给联系人, 请各位联系人接到邮局通知后, 务必及时到邮局领取。若 2 个月未领, 被邮局退回, 本刊不再补发。

特此通知

《光谱实验室》编辑部

汇款购买地址: 北京市 81 信箱 66 分箱 刘建林, 邮编: 100095