



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 食用菌中凝集素的测定 高效液相色谱法

Determination of lectin in fungi by HPLC

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中华人民共和国国家市场监督管理总局 发  
中国国家标准化管理委员会 布



# 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国科学院过程工程研究所提出。

本标准由中国标准化研究院归口。

本标准起草单位：河北中科汉禧生物科技有限公司、丽江中源绿色食品有限公司、中国科学院过程工程研究所、中国标准化研究院、北京化工大学

本标准主要起草人：康跻耀，孔英俊，张贵锋，刘昕昊，刘璐，席兴军，魏芸，兰韬，刘媛媛，刘聪，邱继权

# 食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法

## 1 范围

本标准规定了基于高效液相色谱法的食用菌中凝集素的测定方法的范围、规范性引用文件、原理、试剂和材料、仪器和设备、食用菌中凝集素的测定方法、结果计算与表示、精密度。

本标准适用于食用菌中凝集素的测定。

## 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/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 原理

试样中菌菇凝集素经硫酸铵沉淀、超滤富集后，高效液相色谱法测定，以保留时间定性，外标法定量。

## 4 试剂和材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

4.1 乙腈（ $C_2H_3N$ ）：色谱纯

4.2 三氟乙酸（ $C_2HO_2F_3$ ）：分析纯

4.3 硫酸铵（ $(NH_4)_2SO_4$ ）：分析纯

4.4 十二水合磷酸氢二钠（ $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$ ）：分析纯

4.5 二水合磷酸二氢钠（ $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ）：分析纯

4.6 磷酸氢二钠溶液（0.02mol/L）：1L 水中加入 7.16 g 十二水合磷酸氢二钠

4.7 磷酸二氢钠溶液（0.02mol/L）：1L 水中加入 3.12 g 二水合磷酸二氢钠

- 4.8 磷酸盐提取液（0.02mol/L）：磷酸氢二钠溶液和磷酸二氢钠溶液混合调至 pH 7.2，
- 4.9 硫酸铵溶液（30%）：100 mL 水中溶入 16.4 g 硫酸铵固体
- 4.10 流动相：乙腈：水：三氟乙酸=40:60:0.05（体积比）
- 4.11 水系滤模：孔径 0.22  $\mu\text{m}$
- 4.12 菌菇凝集素标准物质（纯度 $\geq$ 99%）
- 4.13 菌菇凝集素标准溶液：准确称取 5 mg（精确至 0.10 mg）菌菇凝集素标准品，置于 5 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度线。该标准溶液中菌菇凝集素的质量浓度为 1 mg/mL，-18℃冰箱避光保存，有效期一周。
- 4.14 菌菇凝集素系列标准工作液：分别准确移取 0.25 mL、0.3 mL、0.45 mL、0.5 mL、1.0 mL 凝集素标准溶液于不同的 5 mL 容量瓶中，用水稀释、定容刻度线，摇匀，得到菌菇凝集素系列标准工作溶液（质量浓度分别为 50  $\mu\text{g/mL}$ 、60  $\mu\text{g/mL}$ 、90  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ 、200  $\mu\text{g/mL}$ ）。

## 5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器。
- 5.2 超声波振荡器
- 5.3 分析天平，感量 0.01 g 和 0.0001 g。
- 5.4 离心机，5000 r/min 以上。
- 5.5 破壁机
- 5.6 超滤离心管：50 mL，10 kd
- 5.7 容量瓶：5 mL
- 5.8 烧杯：50 mL，500 mL
- 5.9 凝胶色谱柱，TSKgel G2000SWXL，7.8 mm I.D.×30 cm，5  $\mu\text{m}$ ，或相当规格色谱柱
- 5.10 针式微孔过滤器：0.22  $\mu\text{m}$ ，直径 13 mm 的聚四氟乙烯（PTFE）滤膜或者相当者。
- 5.11 离心管：50 mL

## 6 食用菌中凝集素的检测方法

### 试样制备

#### 6.1.1 鲜样

取具有代表性的食用菌样品 1000 g，用干净纱布擦去表面附着物，采用对角线分割法，取对角部分，切碎，充分混匀后放入破壁机粉碎成匀浆，放入密封容器中，-18℃保存备用。

#### 6.1.2 干样

取具有代表性的食用菌样品 200 g，用样品粉碎机粉碎，过 425  $\mu\text{m}$  标准网筛，将样品装于密封容器中，0℃-20℃保存备用。

## 6.2 凝集素提取

### 6.2.1 鲜样

取处理好的鲜样 50 g 于破壁机中，加入 1:30 的磷酸盐提取液匀浆，匀浆完成后放入 500 mL 烧杯中，在超声波振荡器中超声 30 min，超声完成后在 4℃冰箱中放置 4 h。放置混匀后称取 20 g 匀浆以 8000 r/min 的转速离心 20 min，离心完成后用滤纸过滤，取过滤后的滤液 5 g 放入烧杯中，加入 5 g 30% 的硫酸铵溶液，并用超滤离心管以 8000 r/min 的转速离心 15 min 超滤 6 次，将超滤之后的上清液转入 5 mL 容量瓶中，用水定容，过 0.22  $\mu\text{m}$  的水系针式滤膜，以供液相检测使用。

### 6.2.2 干样

取处理好的干样 1 g 于烧杯中，加入 1:45 的磷酸盐提取液在超声波振荡器中超声 30 min，超声完成后在 4℃冰箱放置 4 h。放置混匀后称取 20 g 以 8000 r/min 的转速离心 20 min，离心完成后用滤纸过滤，取过滤后的滤液 2 g 放入烧杯中，加入 10 g 30% 的硫酸铵溶液，并用超滤离心管以 8000 r/min 的转速离心 15 min 超滤 6 次，将超滤之后的上清液转入 5 毫升容量瓶中，用水定容，过 0.22  $\mu\text{m}$  的水系针式滤膜，以供液相检测使用。

## 6.3 测定

### 6.3.1 参考色谱条件，

色谱柱：凝胶色谱柱，TSKgel G2000SWXL，7.8 mm I.D.  $\times$  30 cm，5  $\mu\text{m}$ ，或相当规格色谱柱

流动相 A：水（含 0.05% 三氟乙酸）

流动相 B：乙腈

流速：0.5 mL/min

UV：280 nm

进样量：100  $\mu\text{g}$ L

### 6.3.2 标准曲线

准确吸取适量标准溶液用水稀释，配制质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液，按参考色谱条件测定，菌菇凝集素典型高效液相色谱图见附录图 A.1，以菌菇凝集素质量浓度为横坐标，相应的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线或计算线性回归方程。

### 6.3.3 测定

样品典型高效液相色谱图见附录图 A.2，按照保留时间进行定性，样品与标准品保留时间的相对偏差不大于 2%，单点或多点校正外标法定量。待测样液中菌菇凝集素的响应值应在标准曲线范围内，超过线性范围则应稀释后再进样分析。同时做空白试验。

## 7 结果计算与表示

7.1 结果计算

试样中菌菇凝集素的量以质量分数  $\omega$  计，单位以毫克每克(mg/g)表示，按式（1）计算。

鲜样：

$$\omega=A\times(f+1)/1000..... (1)$$

干样：

$$\omega=A\times(f+1) \times 2.5/1000..... (1)$$

式中：

$\omega$ ——供试品中凝集素总含量，单位为毫克每克（mg/g）；

A—根据标准曲线计算出的样品凝集素浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

f—样品稀释倍数

7.2 结果表示

测定结果以两次平行测定值的算数平均值表示，计算结果保留三位有效数字。

8 精密度

8.1 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的5%。

8.2 再现性

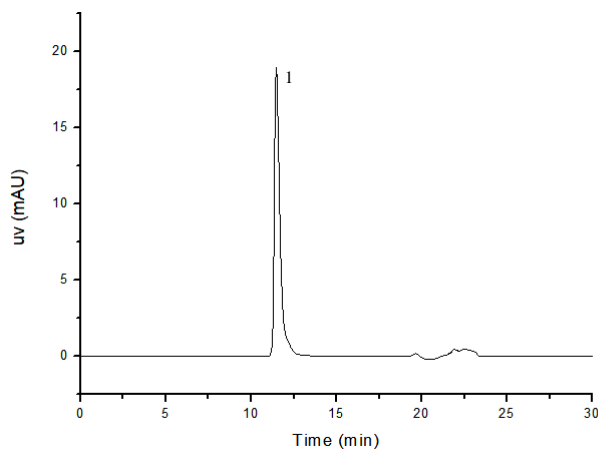
再现性条件下获得的两次独立性测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算数平均值的10%。

附 录 A

(资料性附录)

典型高效液相色谱图

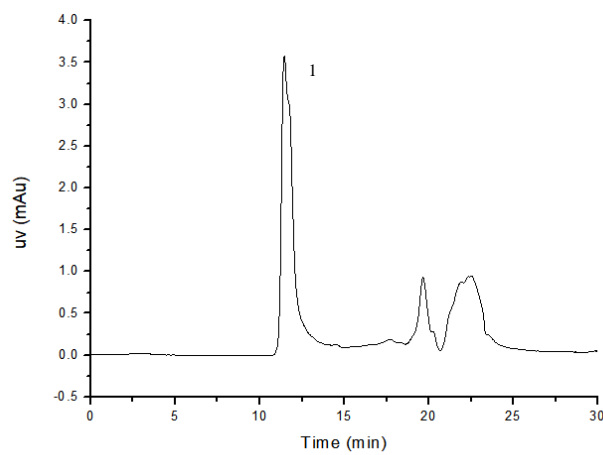
A. 1 菌菇凝集素典型高效液相色谱图见图A.1。



注：1 菌菇凝集素

图A. 1 菌菇凝集素典型高效液相色谱图

A. 2 样品典型高效液相色谱图见图 A. 2。



注：1 菌菇凝集素

图A. 2 样品典型高效液相色谱图