

# **《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》国家标准编制说明**

# 目录

1.	任务来源.....	3
2.	起草的目的意义.....	3
2.1.	企业产品质量控制的需要 .....	3
2.2.	完善国家标准的需要.....	3
3.	凝集素研究、应用与标准现状.....	4
3.1.	凝集素研究.....	4
3.2.	凝集素开发应用 .....	4
3.3.	凝集素标准.....	5
4.	主要起草过程.....	5
4.1.	成立标准制定工作组.....	5
4.2.	确定工作计划和标准制定原则 .....	5
4.3.	查询国内外相关标准和文献资料.....	5
4.4.	研究建立标准方法，开展条件实验 .....	6
4.5.	方法验证.....	7
4.6.	形成标准讨论稿和编制说明 .....	7
4.7.	形成标准草案.....	7
4.8.	形成标准征求意见稿和编制说明 .....	7
4.9.	征求意见并形成标准送审稿和编制说明 .....	8
5.	本标准与国内外分析方法的关系.....	8
6.	主要技术指标依据与说明 .....	8
6.1.	标准名称.....	8
6.2.	前言 .....	8
6.3.	主体内容 .....	9
6.4.	“范围”的界定 .....	9
6.5.	原理.....	9
6.6.	试剂.....	错误！未定义书签。
6.7.	仪器和设备.....	错误！未定义书签。
6.8.	样品制备 .....	10
6.9.	样品中凝集素的提取.....	11
6.10.	凝集素提取条件筛选.....	12
6.11.	凝集素 HPLC 定量分析方法的建立 .....	18
6.12.	方法验证.....	25
6.13.	实际样品检测.....	37
6.14.	验证结论 .....	37
7.	采用国际标准和国外先进标准程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况 .....	37
8.	与现行法律法规和强制性标准的关系 .....	38
9.	标准作为强制性或推荐性标准的意见 .....	38
10.	实施标准的建议.....	38
11.	参考文献.....	38

## 1. 任务来源

本国家标准的制定任务是根据国家标准化管理委员会下达的国家标准制定计划《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱》项目（计划号 20202637-T-424）起草。国家标准计划《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱》由 424-cniss（中国标准化研究院）归口上报及执行，主管部门为国家市场监督管理总局(质检)。本标准由中国科学院过程工程研究所、河北中科汉禧生物科技有限公司和中国标准化研究院共同起草。本标准主要起草人：孔英俊，刘昕昊，刘璐，康跻耀，张贵锋，兰韬，席兴军。

## 2. 起草的目的意义

在我国，关于食用菌凝集素的研究刚刚起步，通过对食用菌加工废弃物中的凝集素提取加工工艺、检测与功效评价方法的深入研究，有助于提高我国食用菌凝集素研究水平，促进食用菌加工产业健康发展。

### 2.1. 企业产品质量控制的需要

目前，食用菌是一种富含多种活性成分的优良蔬菜，我国是世界食用菌生产第一大国，目前食用菌产量占全球总产量的 75% 以上，2014 年，全国食用菌产量已超过 3000 万吨。食用菌产品出口 126 个国家和地区，食用菌出口量约占亚洲出口总量的 80%，占全球贸易量的 40%。食用菌总产值在我国种植业中的排名，仅次于粮、棉、油、菜、果，居第六位。食用菌产业已成为我国种植业的一项新兴的支柱产业和新的经济增长点。其中 2011 年，我国食用菌产值已超过 1400 亿元，出口创汇达 24.07 亿美元。

食用菌产品主要以鲜销、干制、盐渍、速冻等方式为主，在其加工生产过程中会产生大量的废弃物，主要有菌脚、菇片、菌柄基部等。这些废弃物难以食用或商品价值低，开发利用率极低，多限于在动物饲料和有机肥中使用，因此对食用菌加工废弃物中的主要活性成分进行深入研究，制定相应的标准是企业快速发展和进行产品质量控制的需要。

### 2.2. 完善国家标准的需要

凝集素的检测方法在国内外还没有统一标准，因此急需建立一套科学合理的

凝集素检测体系，为凝集素产品研发及食用菌综合开发利用提供依据，进而引导生产，规范市场。所以，本标准的制定也是完善食用菌及其加工产品检测方法国家标准的需要。

### **3. 凝集素研究、应用与标准现状**

#### **3.1. 凝集素研究**

据报道，食用菌中的蛋白质具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节、降血压等生物活性，其中凝集素是食用菌中一类糖蛋白，它能与糖专一地、非共价地可逆结合，具有免疫调节、抗增生、抗肿瘤和抗病毒等功能，是目前国际上的研究热点。据报道，从草菇、裂褶菌、牛肝菌等菌类中能提取出具有免疫调节功能的凝集素，能有效促进小鼠淋巴细胞有丝分裂；从蒙古口蘑、草菇、糙皮侧耳等中能提取具有抗肿瘤功能的凝集素，能有效抑制小鼠肉瘤细胞；从杨树菇、毛头鬼伞等中能提取具有抗病毒活性的凝集素，对烟草花叶病毒有明显的抑制作用。利用凝集素与糖类的特异性结合，或对不同糖结合力的差异、以及凝集素自身特性，凝集素已作为生物材料的重要组成部分，被用于药物输送、生物检测、组织修复等方面，并表现出一些非常有趣和新颖的功能，如用于对黏膜上皮细胞、癌细胞、血脑屏障的靶向给药。

#### **3.2. 凝集素开发应用**

凝集素广泛存在自然界中，种类繁多。由于其特异性糖结合活性，可作为糖基研究重要工具。随着科学研究技术日新月异，凝集素研究重点由此前的基本分类及一般生物性质转变至基础研究及临床试验应用。研究表明，凝集素除具有多种生物活性，还可特异性结合细胞表面糖基，进行细胞分选，如凝集素芯片和凝集素亲和层析筛选差异糖蛋白、凝集素介导药物靶向治疗等。虽然凝集素有亲和性和专一性不及抗体等固有问题，但也有自身优势。随着越来越多亲和力和专一性更强凝集素鉴定分离及对现有凝集素改造，凝集素将拥有广泛应用，为生物研究做出独特贡献。。

总的说来，凝集素的开发利用尚处于初级发展阶段，虽然在靶向性药物载体、生物传感器、医用高分子聚合物材料等方面有相关产品，但还没有形成规模化。

### 3.3. 凝集素标准

经查询，目前 ISO/AOAC 标准以及我国国家标准中都没有食用菌及食用菌加工废弃物中凝集素的高效液相色谱检测方法相关标准。此外，未查到与菌菇凝集素相关的国家标准、行业标准、地方标准和企业标准。菌菇凝集素分析方法标准的缺失，使得相关企业在市场竞争中无标准可用，相关产品缺乏技术支撑，质量参差不齐。

因此，有必要尽快制定《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》国家标准，以满足相关企业和检测、管理结构的需要。

## 4. 主要起草过程

### 4.1. 成立标准制定工作组

国家重点研发项目立项后，2017 年 11 月 10 日在北京市西藏大厦召开了国家标准《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》第一次工作会。参加单位有中国科学院过程工程研究所、河北中科汉禧生物科技有限公司、中国标准化研究院等。会议成立了由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、北京化工大学等单位参加的标准工作组，主要由从事标准制修订、仪器分析、具有丰富技术经验的专业研究人员组成，工作组制定了初步的标准编制工作计划。

### 4.2. 确定工作计划和标准制定原则

按照工作任务要求，工作组制定了标准起草工作计划和任务分工。

在充分研究与讨论的基础上，制定了标准制定原则：

- (1) 先进性：其准确度、精密度和灵敏度达到较高水平。
- (2) 适用性：要适应我国食用菌产业发展的要求，满足食用菌加工的需要。
- (3) 可操作性：符合我国目前检测仪器设备和试剂、材料的供应条件。

(4) 实用性：符合检测从业人员的技术水平，能被国内主要的环境分析实验室所使用并达到所规定的要求。要有利于提高食用菌及其制品质量，为中药质量控制部门、有关企业和三农服务。

### 4.3. 查询国内外相关标准和文献资料

2017 年，开始开展“食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法”方法研究。由

于在现行国家标准、行业标准、地方标准、团体标准和企业标准中，均无相应的测定方法标准，所以我们查阅相关文献并开展研究工作。

目前国内外用于检测凝集素的方法主要有血凝法、放射性同位素标记糖复合物法、免疫学方法等。血凝法是利用凝集素能够凝聚天然或酶处理的人或动物红细胞的特性，对凝集素进行检测，受多种条件的影响，主要包括粉碎粒度、脱脂方法和抽提方法等。另外，在测定时需对测定条件的进行反复的筛选，过程十分复杂。放射性同位素标记糖复合物法是用放射性同位素标记糖复合物后，与凝集素保温，由于凝集素的多价结合位点，使糖复合物与凝集素结合而易在高盐浓度下发生沉淀，进而借助离心或过滤的方法将结合和游离的标记化合物分开。通过测定沉淀中放射性的强度，可计算出凝集素的结合标记化合物的量和结合常数，也可通过抑制剂或竞争性底物对沉淀中放射性强度的影响程度，计算出抑制剂或竞争性底物的抑制常数或结合常数，比较这些抑制剂的抑制常数就可确定凝集素的专一性或结合活性，得出凝集素的含量。该方法操作复杂，且需要特殊的设备和防护措施，在实际操作中受到限制。通过免疫学方法用抗凝集素特异性抗体进行火箭免疫电泳、酶联免疫吸附法或放射免疫分析法进行定量分析，该方法因需数月的抗体制备过程而费时过长，也不易于推广。

高效液相色谱（HPLC）是目前能够快速分析凝集素的重要手段，可以结合超滤、离子交换层析、分子排阻层析以及亲和层析等技术，从而获得高纯度的凝集素，提高了纯化的效率。

通过将硫酸铵沉淀、超滤和高效液相色谱相结合，能有效且快速地对凝集素进行分析检测，建立一种对食用菌、食用菌加工废弃物中的凝集素的检测方法，具有准确度好、精密度高、检出限与定量限低、操作简单等优点，考虑到标准的适用性与可操作性，因此确定采用液相色谱法检测样品中凝集素。经过初步试验，证明方法是可行的。而后对方法进行优化，对方法进行验证，结果表明方法的准确性、回收率、精密度等方面都能达到国家标准的要求，并且基本符合制定国家标准的条件，并于 2018 年向国家标准化管理委员会提出立项申请。

#### **4.4. 研究建立标准方法，开展条件实验**

标准工作组按照计划任务书的要求，结合制定标准的要求，研究建立标准

方法的实验方案，并进行方法前处理条件的选择、仪器条件的确定和方法精密度、准确度及检出限的测定等试验。

第一批样品采集后，开始开展实验室验证工作，建立凝集素高效液相色谱分析方法，包括线性范围、相关系数、加标回收率、准确度、精密度、检出限、定量限等。

#### **4.5. 方法验证**

2020 年 12 月，由 5 家单位对“食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法”进行验证，分别是河北中科同创科技发展有限公司、青岛市资源化学与新材料研究中心、北京化工大学、江南大学、广东药科大学，通过统计检验技术确认外部实验室试验结果的准确性。

#### **4.6. 形成标准讨论稿和编制说明**

2021 年 1 月 4 日，起草工作组组织相关单位和专家，在山东青岛中国科学院兰州化学物理研究所召开第二次标准起草工作会。参会单位包括河北中科汉禧生物科技有限公司、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、中国科学院兰州化学物理研究所、浙江大学等。

与会专家对《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》标准草案中的英文名称、范围、术语和定义、基本要求、主要技术指标、附录等章条提出了详细的意见，会后根据修改意见形成了《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》标准讨论稿及其编制说明。

#### **4.7. 形成标准草案**

标准起草工作组查阅、收集和整理了国内外有关研究进展和专利、标准、法规等文献资料，掌握了相关标准的现状；对文献中凝集素测定方法进行了对比和总结，为标准文本的编制奠定理论基础。在《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》国家标准第一次起草工作会议的基础上，起草工作组相关单位共同讨论起草形成了《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》国家标准的技术框架和主要内容，初步形成了《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》标准草案。

#### **4.8. 形成标准征求意见稿和编制说明**

在前期工作的基础上，起草工作组组织相关单位和专家于 2021 年 2 月 5 日

在北京中国标准化研究院召开第三次标准起草工作会。参会单位包括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、北京化工大学等。与会成员认真讨论《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》标准讨论稿后，根据讨论结果修改形成了《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》征求意见稿及编制说明。会议同时讨论了下一阶段征求意见的单位和专家名单。

#### **4.9. 征求意见并形成标准送审稿和编制说明**

起草工作组对提出的意见经过反复研究、讨论和处理后，修改形成了《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》送审稿及编制说明。具体意见汇总和处理表见《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》征求意见稿及编制说明。国家标准征求意见稿汇总处理表。

### **5. 本标准与国内外分析方法的关系**

本标准研究旨在建立一项满足食用菌产业中凝集素含量检测要求，在质量控制目标和技术手段上与国际接轨，适应我国大部分食品行业质控实验室仪器设备和检测能力的检测方法标准。通过查阅国内外相关文献资料，制定条件优化方案，确保本方法前处理所采用的装置操作简便，能够满足国内实验室的条件要求。本标准拟采用硫酸铵沉淀、超滤富集-高效液相色谱法测定菌菇凝集素。力求方法在稳定、可靠和实用的基础上，达到国际先进水平，以适应我国食用菌产业中凝集素含量检测、质控与管理的需要。

### **6. 主要技术指标依据与说明**

#### **6.1. 标准名称**

本标准主要解决食用菌产业中凝集素含量测定的技术问题，所以将本标准的名称定为：《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》。本标准的全称《食用菌中凝集素的测定-高效液相色谱法》翻译为“Determination of lectin in fungi by HPLC”。

#### **6.2. 前言**

明确了本标准的归口单位及主要起草单位、起草人。



### **6.3. 主体内容**

标准的主体内容包括：范围、规范性引用文件、原理、试剂、仪器和设备、测定步骤、空白试验、结果计算与表示、精密度和回收率、检出限、检验报告等。

### **6.4. “范围”的界定**

本标准规定了用高效液相色谱法测定食用菌中凝集素含量的原理、材料、仪器与设备、测定步骤、结果计算与表示、精密度和回收率、检验报告。

本标准适用于食用菌中凝集素含量的测定。

### **6.5. 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。

## 6.6. 试剂

除另外有规定外，所用试剂均为分析纯，水应复合 GB/T6682 中一级水的要求。

6.6.1. 乙腈 ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ )：色谱纯

6.6.2. 三氟乙酸 ( $\text{C}_2\text{HO}_2\text{F}_3$ )：分析纯

6.6.3. 硫酸铵 ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )：分析纯

6.6.4. 十二水合磷酸氢二钠 ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )：分析纯

6.6.5. 二水合磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )：分析纯

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

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

6.6.8. 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，

6.6.9. 硫酸铵溶液 (30%)：100ml 水中溶入 16.4g 硫酸铵固体

6.6.10. 流动相：乙腈：水：三氟乙酸=40:60:0.05（体积比）

6.6.11. 水系滤模：孔径 0.22 $\mu\text{m}$

6.6.12. 菌菇凝集素标准物质（纯度 $\geq 99\%$ ）

6.6.13. 菌菇凝集素标准溶液：准确称取 5mg（精确至 0.10mg）菌菇凝集素标准品，置于 5ml 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 1mg/ml，-18℃冰箱避光保存，有效期一周。

6.6.14. 菌菇凝集素系列标准工作液：分别准确移取 0.25mL、0.3mL、0.40mL、0.5mL、1mL 凝集素标准溶液于不同的 5mL 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 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ ）。

## 6.7. 仪器和设备

6.7.1. 高效液相色谱仪：配紫外检测器。

6.7.2. 超声波振荡器

6.7.3. 分析天平，感量 0.01g 和 0.0001g。

6.7.4. 离心机，5000r/min 以上。

6.7.5. 破壁机

6.7.6. 超滤离心管：50ml，10kd

6.7.7. 容量瓶：5ml

6.7.8. 烧杯：50ml，500ml

6.7.9. 凝胶色谱柱，TSKgel G2000SWXL，7.8 mm I.D.×30 cm，5 μm，或相当规格色谱柱

6.7.10. 针式微孔过滤器：0.22μm，直径 13 mm 的聚四氟乙烯（PTFE）滤膜或者相当者。

6.7.11. 离心管：50ml

## **6.8. 样品制备**

### **6.8.1. 鲜样**

取具有代表性的食用菌样品 1000g，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。

### **6.8.2. 干样**

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

## **6.9. 样品中凝集素的提取**

### **6.9.1. 鲜样**

取处理好的鲜样 50g 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 500ml 烧杯中，在超声波振荡器中超声 30min，超声完成后在 4℃冰箱中放置 4 小时。放置混匀后称取 20g 匀浆以 8000r/min 的转速离心 20min，离心完成后用滤纸过滤，取过滤后的滤液 5g 放入烧杯中，加入 5g 30%的硫酸铵

溶液，并用超滤离心管以 8000r/min 的转速离心 15min 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 $\mu$  m 的水系针式滤膜，以供液相检测使用。

6.9.2. 干样

取处理好的干样 1g 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 30min，超声完成后在 4℃冰箱放置 4 小时。放置混匀后称取 20g 以 8000r/min 的转速离心 20min，离心完成后用滤纸过滤，取过滤后的滤液 2g 放入烧杯中，加入 10g 30%的硫酸铵溶液，并用超滤离心管以 8000r/min 的转速离心 15min 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 $\mu$ m 的水系针式滤膜，以供液相检测使用。

6.10. 凝集素提取条件筛选

6.10.1. 提取溶剂比例

干料：称取处理好的食用菌样品 1g，放入烧杯中，以 0.02mol/L 的磷酸盐溶液为提取溶剂，按照 6.9.2 进行菌菇凝集素的提取，其中料液比分别采用 1:35、1:40、1:45、1:50。

不同的料液比对菌菇凝集素干料提取率的影响，结果如图 1 所示。当料液比为 1:45 时，菌菇凝集素提取率最高。

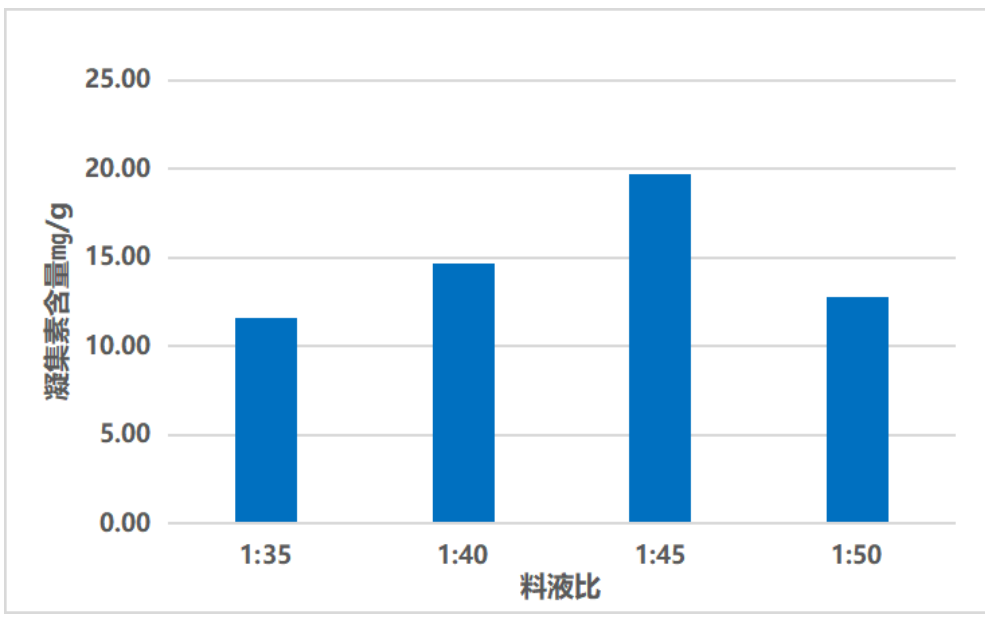


图 1

鲜样：称取处理好的食用菌样品 10.00g，放入烧杯中，以磷酸盐溶液为提

取溶剂，按照 6.9.1 进行菌菇凝集素的提取，其中料液比分别采用 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50。

不同的料液比对菌菇凝集素鲜料提取率的影响，结果如图 2 所示。当料液比 1:30 为时，菌菇凝集素提取率最高。

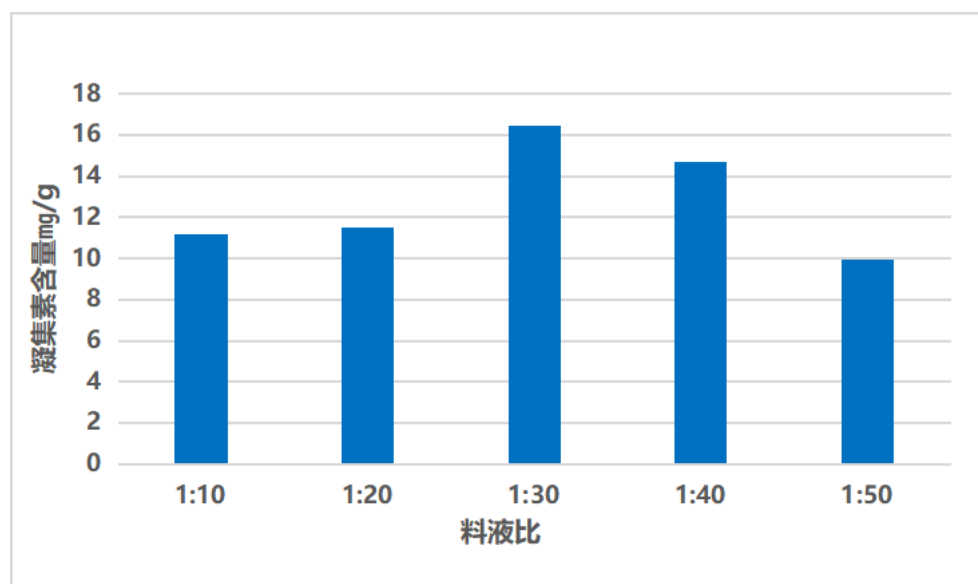


图 2

#### 6.10.2. 提取时间

干料：称取处理好的食用菌样品 1g，放入烧杯中，以 0.02mol/L 的磷酸盐提为提取溶剂，按照 6.9.2 进行菌菇凝集素的提取，其中提取时间分别采用 1、2、3、4、5h。

不同的提取时间对菌菇凝集素的影响，结果如图 3 所示。当提取时间为 4 小时，菌菇凝集素提取率最高。

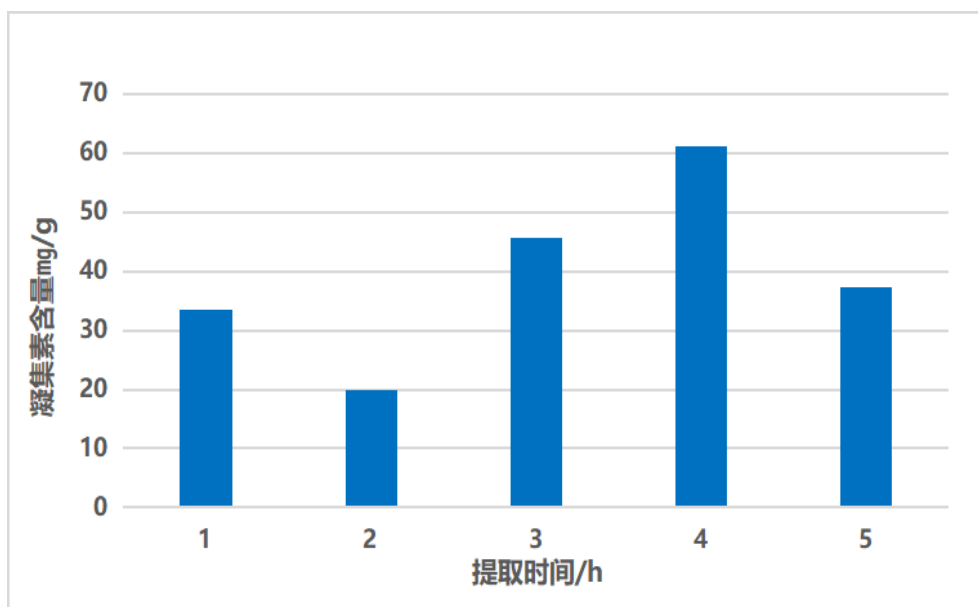


图 3

鲜样：称取处理好的食用菌样品 10.00g，放入烧杯中，以 0.02mol/L 的磷酸盐溶液为提取溶剂，按照 6.9.1 进行菌菇凝集素的提取，其中提取时间分别采用 1、2、3、4、5h。

不同的提取时间对菌菇凝集素的影响，结果如图 4 所示。当提取时间为 4 小时，菌菇凝集素提取率最高。

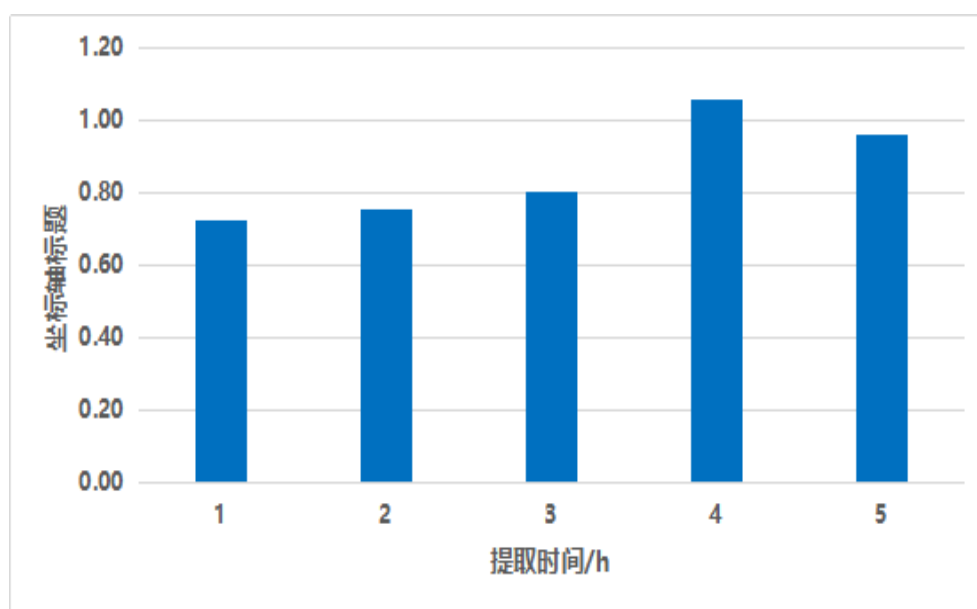


图 4

### 6.10.3. 硫酸铵溶液浓度

干料：称取处理好的食用菌样品 1g，放入烧杯中，按照 6.9.2 进行菌菇凝

集素的提取，其中硫酸铵浓度为 0、20%、30%、40%、50%、60%、70%。

不同的硫酸铵浓度对菌菇凝集素干料提取率的影响，结果如图 5 所示。当硫酸铵浓度为 30%时，菌菇凝集素提取率最高。

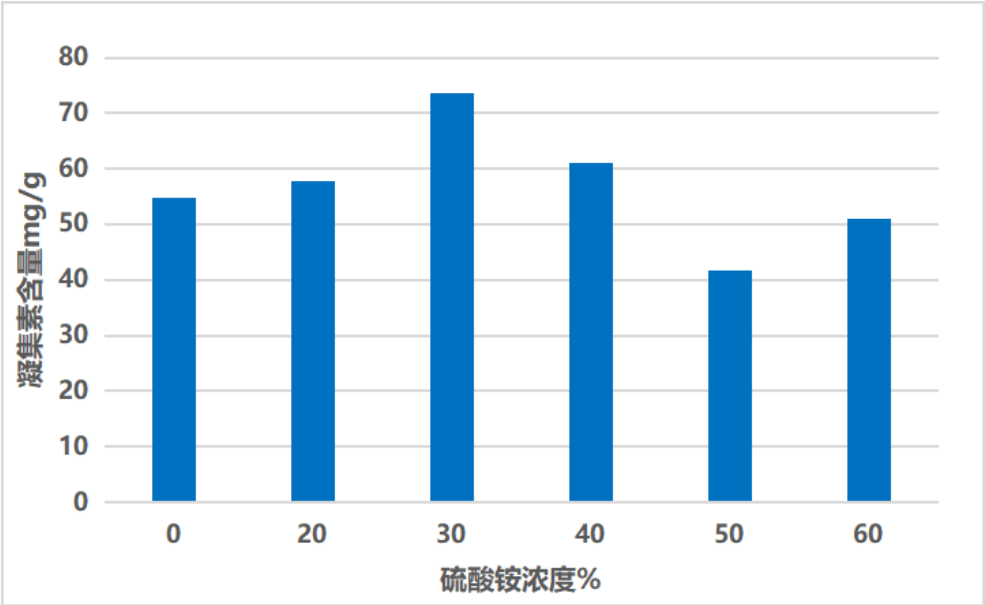


图 5

鲜样：称取处理好的食用菌样品 10.00g，放入烧杯中，按照 6.9.1 进行菌菇凝集素的提取，其中硫酸铵浓度为 0、20%、30%、40%、50%、60%、70%。

不同的硫酸铵浓度对菌菇凝集素鲜料提取率的影响，结果如图 6 所示。当硫酸铵浓度为 30%时，菌菇凝集素提取率最高。

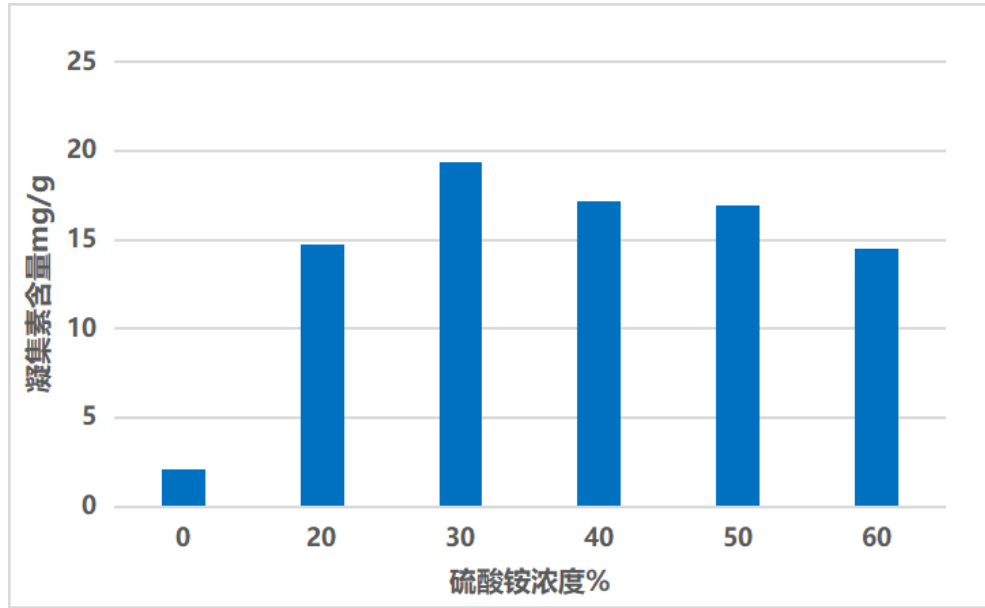


图 6

#### 6.10.4. 提取液 PH 值

干料：称取食用菌样品 1.00g，放入烧杯中，按照 6.9.2 进行菌菇凝集素的提取，以 0.02mol/L 的磷酸盐溶液为提取溶剂，其中 pH 分别采用 6.0、6.5、7.0、7.2、7.5、8.0。

不同的 pH 磷酸盐缓冲液对菌菇凝集素干料提取率的影响，结果如图 7 所示。当 pH 为 7.2 时，菌菇凝集素提取率最高。

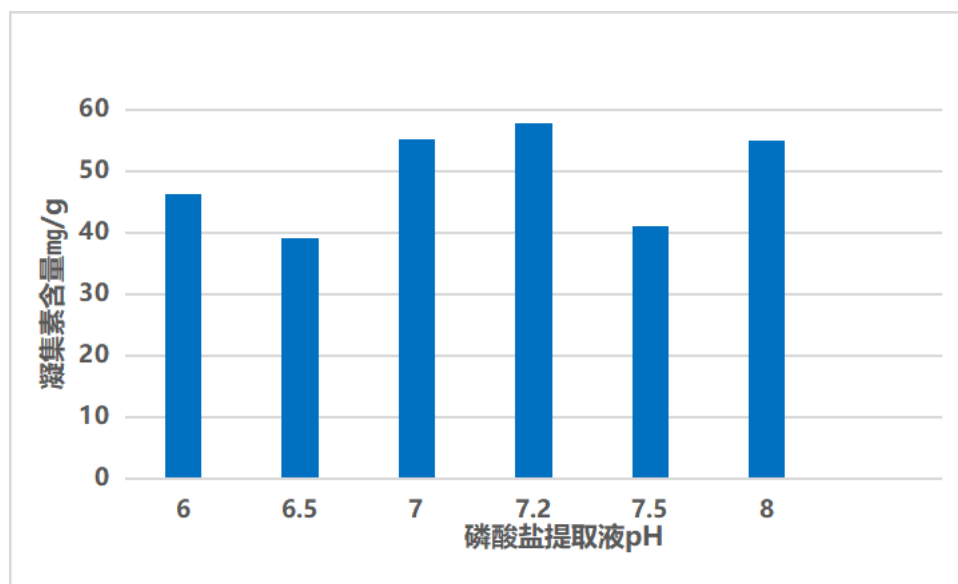


图 7

鲜样：称取食用菌样品 10.00g，放入烧杯中，按照 6.9.1 进行菌菇凝集素的提取，以磷酸盐溶液为提取溶剂，其中 pH 分别采用 6.0、6.5、7.0、7.2、7.5、8.0。

不同 pH 磷酸盐缓冲液对菌菇凝集素鲜料提取率的影响，结果如图 8 所示。当 pH 为 7.2 时，菌菇凝集素提取率最高。



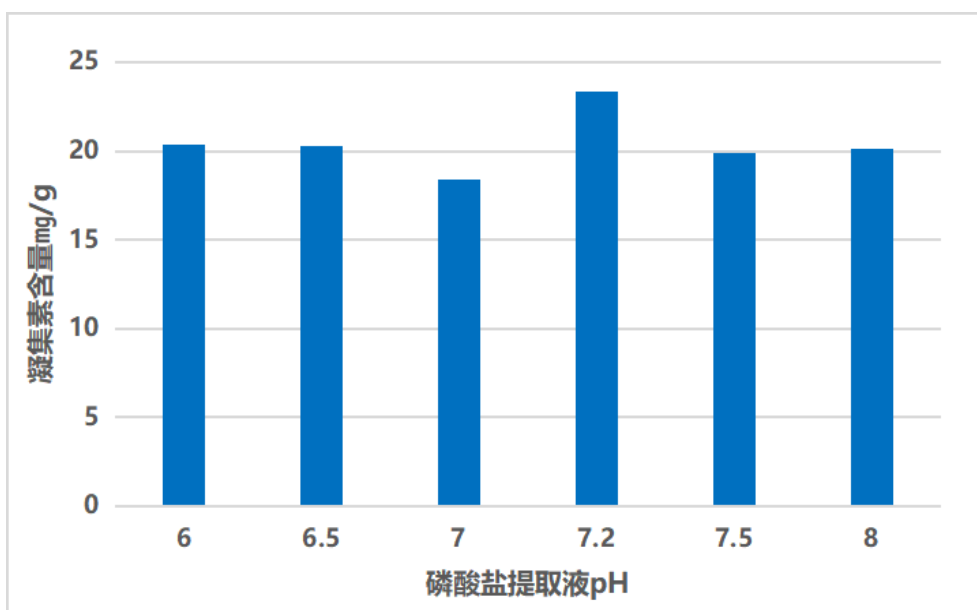


图 8

#### 6.10.5. 提取液浓度

干料：称取食用菌样品 1.00g，放入烧杯中，按照 6.9.2 进行菌菇凝集素的提取，以磷酸盐溶液为提取溶剂，其中溶剂浓度分别采用 0.01、0.02、0.05、0.10mol/L。

不同的磷酸盐缓冲液浓度对菌菇凝集素干料提取率的影响，结果如图 9 所示。当浓度 0.02mol/L 为时，菌菇凝集素提取率最高。

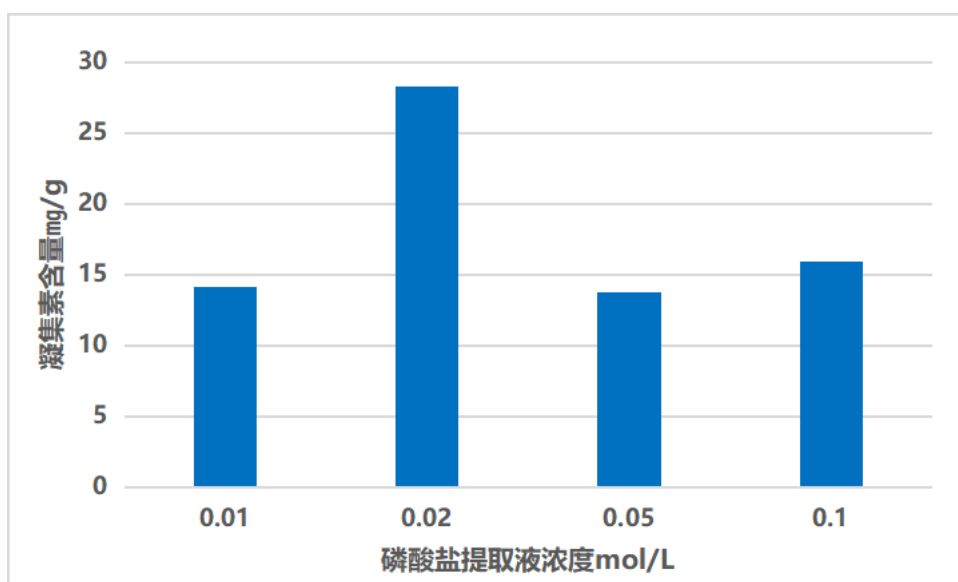


图 9

鲜样：称取食用菌样品 10.00g，放入烧杯中，按照 6.9.1 进行菌菇凝集素的提取，以磷酸盐溶液为提取溶剂，其中溶剂浓度分别采用 0.01、0.02、0.05、

0.10mol/L。

不同的磷酸盐缓冲液浓度对菌菇凝集素鲜料提取率的影响,结果如图 10 所示。当浓度为 0.02mol/L 时,菌菇凝集素提取率最高。

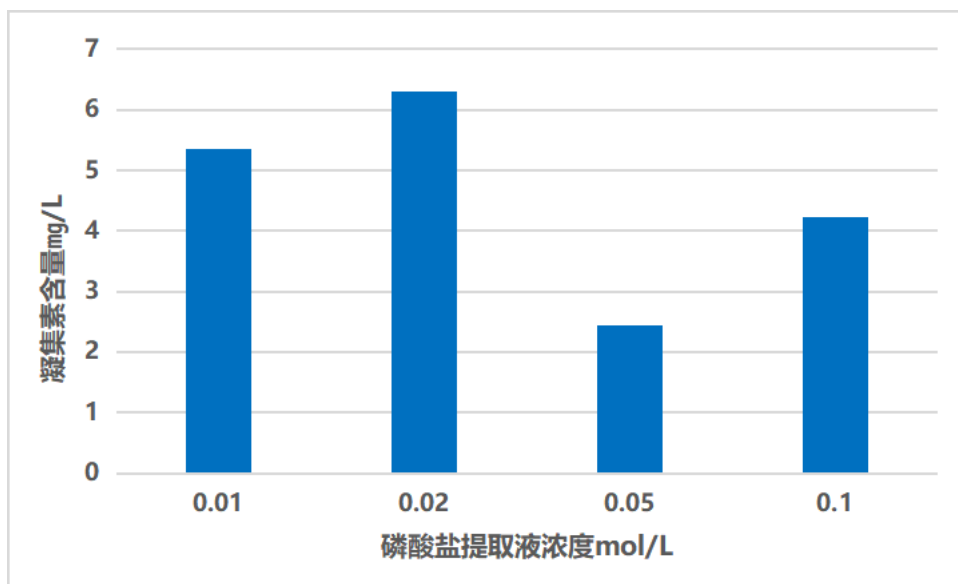


图 10

## 6.11. 凝集素 HPLC 定量分析方法的建立

### 6.11.1. 参考色谱条件

色谱柱: 凝胶色谱柱, TSKgel G2000SWXL, 7.8 mm I.D.×30 cm, 5μm, 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: 100μL

在该优化色谱条件下,对标准品实际食用菌样品中凝集素含量进行测定,典型的的标准品液相色谱谱图如图 1 所示,典型的食用菌样品液相色谱谱图如图 2 所示,可以看出凝集素与杂质分离很好。

### 6.11.2. 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 $\mu\text{g/mL}$ 、60 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$  的标准工作液，按参考色谱条件测定，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，求得方程为： $Y=11.359X-416.96$ ， $r^2=0.9999$ 。结果显示在 50 $\mu\text{g/mL}$ ~200 $\mu\text{g/mL}$  内，线性关系良好。

### 6.11.3. 测定

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。

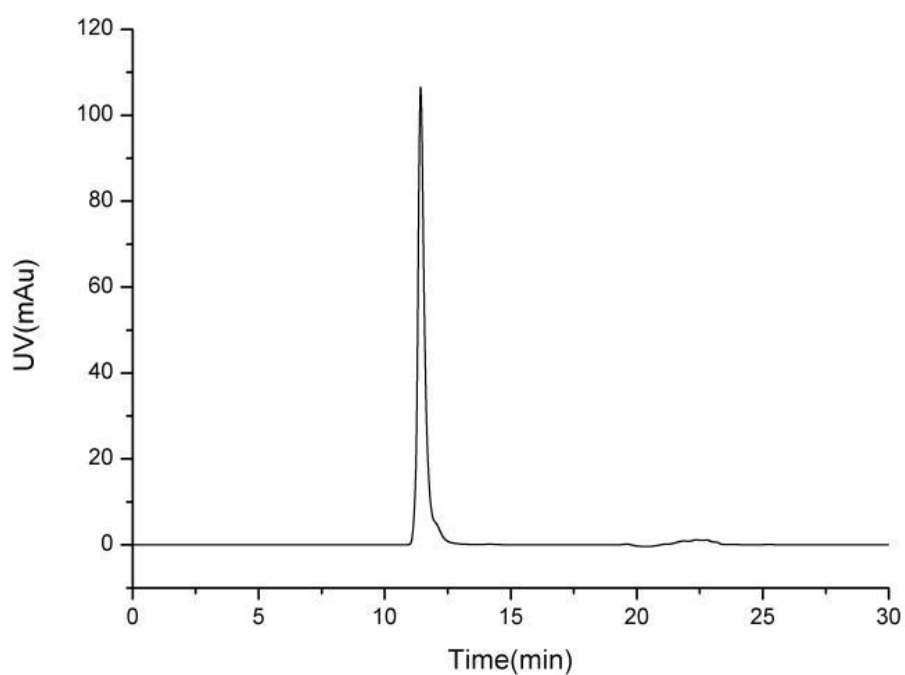


图 1 凝集素标准品液相色谱图

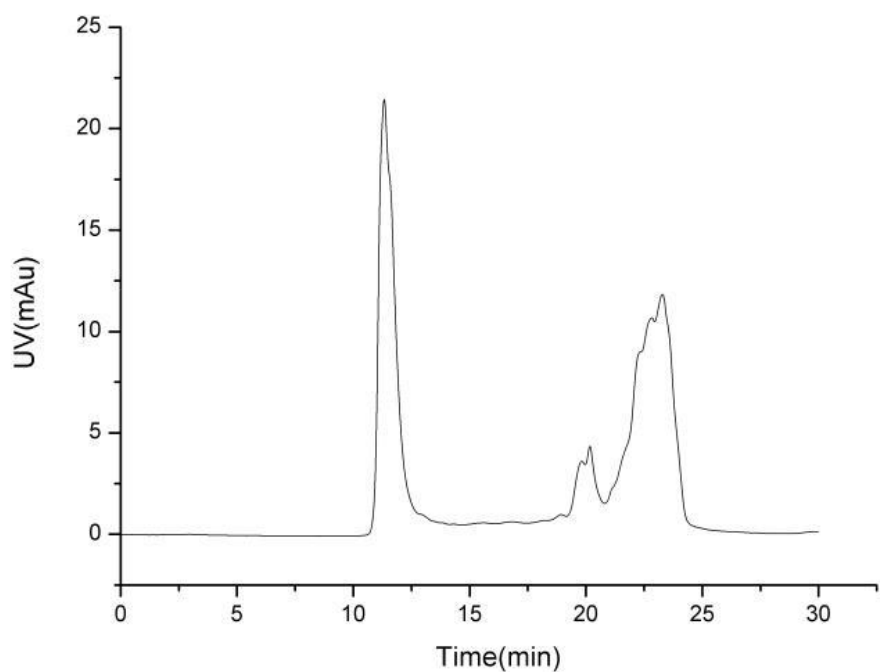


图 2 食用菌样品色谱图

#### 6.11.4. 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：

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

干样：

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

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

以两次平行测定值的算数平均值作为测定结果，计算结果保留三位有效数字。

#### 6.11.5. 检出限和定量限

将对照品溶液逐步稀释，进行液相色谱分析，计算其峰高与基线噪音高的比， $S/N=3$  ( $S$  为对照品峰高， $N$  为基线噪音高)时的对照品浓度为检出限(LOD)，得到菌菇凝集素的检出限鲜品为 6.20 mg/kg，干品为 9.20 mg/kg； $S/N=10$  时的浓度为定量限 (LOQ)，得到菌菇凝集素的定量限鲜品为 12.40 mg/kg，干品为 18.40 mg/kg。

#### 6.11.6. 精密度

取配制好的凝集素对照品溶液，用 0.22 $\mu$ m 微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析，连续进样 5 次，凝集素对照品 HPLC 分析结果相对标准偏差 RSD 为 0.79%，表明仪器精密度良好，该方法精密度符合要求。结果见表 1。

表 1 凝集素精密度实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	141.49	0.79
2	139.28	
3	138.80	
4	138.97	
5	140.11	

#### 6.11.7. 稳定性

配制浓度为约 90  $\mu\text{g/mL}$  的凝集素溶液，分别保存 0 h, 4h, 8h, 12 h, 24h 后，按照前述色谱条件进行检测，得到其峰面积，计算 5 次峰面积的相对标准偏差（即 RSD 值）。RSD 值为 1.55%，表明方法稳定性良好，该方法稳定性符合要求，结果见表 2。

表 2 凝集素稳定性实验结果

时间	峰面积 (mAU*s)	RSD%
0	350.96	1.55
4	343.92	
8	343.82	
12	335.09	
24	342.26	

#### 6.11.8. 重复性

取同一样品，共 5 份，分别制备供试品溶液，按照下色谱条件进样，测定峰面积，并计算菌菇凝集素浓度。结果见表 3，样品中凝集素的 RSD 为 0.64%（n 均为 5），表明本方法重复性良好。

表 3 菌菇凝集素重复性实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	153.19	0.64
2	155.79	
3	154.77	

4	155.32	
5	155.00	

#### 6.11.9. 方法的准确性

本方法同时也采用了菌菇凝集素样品进行加标回收率的测定,以检测该法对含有不同杂质的菌菇凝集素的检测精度,配制含有菌菇凝集素浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右的菌菇样品为本底进行加标,菌菇凝集素标准品添加量分别为实际样品中浓度的 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每个加标量检测 5 次,计算平均值和相对标准偏差。菌菇凝集素加样回收实验结果见表 4。实验结果表明,此方法加标回收率良好,菌菇凝集素的平均回收率为 88%~104%,RSD 范围为 0.80%~2.47%,说明方法准确度高。

表 4 菌菇凝集素加标回收结果 (n=5)

样品	添加量 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	检测值 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
1	50	225.05	103.95	103.32	1.96
2		222.45	102.96		
3		224.25	102.75		
4		137.95	106.27		
5		137.70	100.68		
1	100	137.65	92.29	90.93	2.47
2		138.53	94.13		
3		137.13	90.23		
4		158.10	88.78		
5		159.02	89.21		
1	200	157.07	89.19	88.25	0.80
2		156.35	88.65		
3		156.56	87.53		



4		201.15	88.26		
5		200.61	87.60		

#### 6.11.10. 小结

上述结果表明，高效液相色谱法测定食用菌中凝集素，菌菇凝集素的检出限鲜品为6.20 mg/kg，干品为9.20 mg/kg；定量限鲜品为12.40 mg/kg，干品为18.40 mg/kg。对食用菌实际样品进行加标回收实验，回收率在88%~104%之间，相对标准偏差在0.80%~2.47%之间，说明方法的精密度和准确度良好。

综上所述，本标准方法能够满足食用菌中凝集素含量测定要求。

### 6.12. 方法验证

选择 5 家具有验证资质的实验室参加方法的验证工作（表 8）。向验证单位提供方法草案、验证方案、标准溶液和验证报告格式。验证单位按照方法草案准备实验用品，在规定时间内完成验证实验并反馈验证结果报告。在方法验证前，参加验证的操作人员应熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流程。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤应符合方法相关要求。

表 5 验证单位与仪器型号

序号	验证单位	HPLC/检测器	色谱柱
1	河北中科同创科技发展有限公司	紫外检测器	凝胶色谱柱
2	青岛市资源化学与新材料研究中心	紫外检测器	凝胶色谱柱
3	北京化工大学	紫外检测器	凝胶色谱柱
4	江南大学	紫外检测器	凝胶色谱柱
5	广东药科大学	紫外检测器	凝胶色谱柱

#### 6.12.1. 方法验证结果

5 家实验室对食用菌样品进行了检出限和定量限、精密度、重复性、稳定性和加标回收率分析测定，结果列于表 6~表 25。

（单位 1）验证结果（表 6~9）表明，该方法的检出限鲜品为 6.23 mg/kg，干品为 9.25 mg/kg，定量限鲜品为 12.43 mg/kg，干品为 18.45 mg/kg；精密度

RSD 为 0.33%；稳定性 RSD 为 2.28%；重复性 RSD 为 0.22%；加标回收率平均回收率为 85 %~93%，RSD 范围为 0.5%~3%。

（单位 2）验证结果（表 10~13）表明，该方法的检出限鲜品为 6.26mg/kg，干品为 9.29mg/kg，定量限鲜品为 12.46mg/kg，干品为 18.49mg/kg；精密度 RSD 为 0.39%；稳定性 RSD 为 3.21%；重复性 RSD 为 0.25%；加标回收率平均回收率为 88 %~100%，RSD 范围为 1%~3%。

（单位 3）验证结果（表 14~17）表明，该方法的检出限鲜品为 6.29mg/kg，干品为 9.34mg/kg，定量限鲜品 12.49mg/kg，干品为 18.54mg/kg；精密度 RSD 为 0.61%；稳定性 RSD 为 3.32%；重复性 RSD 为 0.66%；加标回收率平均回收率为 85 %~101%，RSD 范围为 0.5%~4%。

（单位 4）验证结果（表 18~21）表明，该方法的检出限鲜品为 6.32mg/kg，干品为 9.38mg/kg，定量限鲜品为 12.52mg/kg，干品为 18.58mg/kg；精密度 RSD 为 2.32%；稳定性 RSD 为 3.49%；重复性 RSD 为 1.82%；加标回收率平均回收率为 88 %~105%，RSD 范围为 0.4%~4%。

（单位 5）验证结果（表 22~25）表明，该方法的检出限鲜品为 6.36mg/kg，干品为 9.43mg/kg，定量限鲜品为 12.56mg/kg，干品为 18.63mg/kg；精密度 RSD 为 0.44%；稳定性 RSD 为 1.73%；重复性 RSD 为 0.40%；加标回收率平均回收率为 84 %~110%，RSD 范围为 0.5%~2%。

验证单位 1

验证日期 2020.12.08

表 6 精密度实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	265.288	0.33
2	264.257	
3	264.058	
4	263.092	
5	263.281	

表 7 稳定性实验结果

时间	峰面积 (mAU*s)	RSD%
0	352.30	2.28
4	343.50	
8	339.05	
12	330.66	
24	335.26	

表 8 重复性实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	420.58	0.22
2	422.25	
3	423.04	
4	422.39	

5	421.68	
---	--------	--

表 9 方法的回收率

样品	添加量 μg/g	检测值 μg/g	回收率 %	平均回收率 %	相对标准偏差 %
1	50	121.69	87.51	85.37	2.56
2		121.52	86.83		
3		121.09	85.10		
4		120.28	81.86		
5		121.20	85.56		
1	100	147.35	95.08	92.67	2.22
2		146.60	93.57		
3		145.96	92.30		
4		144.55	89.48		
5		146.28	92.93		
1	200	192.36	92.55	92.68	0.69
2		193.13	93.31		
3		192.85	93.04		
4		192.65	92.84		
5		191.46	91.65		

验证单位 2

验证日期 2020.12.21

表 10 精密度实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	480.41	0.39
2	480.34	
3	481.47	
4	481.58	
5	479.92	

表 11 稳定性实验结果

时间	峰面积 (mAU*s)	RSD%
0	345.19	3.21
4	333.36	
8	325.06	
12	322.80	
24	315.83	

表 12 重复性实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	171.91	0.25
2	171.24	
3	172.33	
4	171.91	

5	171.47	
---	--------	--

表 13 方法的回收率

样品	添加量 μg/g	检测值 μg/g	回收率 %	平均回收率 %	相对标准偏差 %
1	100	119.79	98.39	97.24	1.00
2		119.45	97.71		
3		119.37	97.55		
4		118.91	96.63		
5		118.56	95.92		
1	150	138.14	90.06	88.47	2.46
2		138.71	90.82		
3		135.57	86.64		
4		137.39	89.06		
5		134.93	85.77		
1	200	168.02	97.42	96.00	1.76
2		163.88	93.28		
3		166.11	95.51		
4		167.77	97.17		
5		167.19	96.60		

验证单位 3

验证日期 2020.12.17

表 14 精密度实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	143.26	0.61
2	142.46	
3	142.37	
4	144.54	
5	143.45	

表 15 稳定性实验结果

时间	峰面积 (mAU*s)	RSD%
0	337.96	3.32
4	329.75	
8	325.06	
12	313.09	
24	310.54	

表 16 重复性实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	251.99	0.66
2	251.34	
3	252.85	
4	253.74	

5	251.86	
---	--------	--

表 17 方法的回收率

样品	添加量 μg/g	检测值 μg/g	回收率 %	平均回收率 %	相对标准偏差 %
1	50	70.33	93.65	96.36	3.63
2		71.83	99.63		
3		71.06	96.56		
4		69.94	92.07		
5		71.89	99.89		
1	150	112.90	87.97	85.67	1.82
2		111.81	86.53		
3		110.69	85.03		
4		110.35	84.57		
5		110.09	84.23		
1	250	173.27	101.08	100.34	0.62
2		172.83	100.73		
3		172.46	100.43		
4		171.91	99.99		
5		171.27	99.48		



验证单位 4

验证日期 2020.12.28

表 18 精密度实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	95.56	2.32
2	95.61	
3	93.37	
4	91.27	
5	91.22	

表 19 稳定性实验结果

时间	峰面积 (mAU*s)	RSD%
0	337.18	3.49
4	320.28	
8	325.06	
12	307.34	
24	309.27	

表 20 重复性实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	38.92	1.82
2	38.83	
3	37.87	
4	37.48	

5	39.01	
---	-------	--

表 21 方法的回收率

样品	添加量 μg/g	检测值 μg/g	回收率 %	平均回收率 %	相对标准偏差 %
1	50	70.92	93.00	88.48	3.38
2		69.97	89.22		
3		69.78	88.46		
4		69.29	86.50		
5		68.97	85.20		
1	200	138.82	91.15	90.18	0.90
2		138.36	90.69		
3		137.83	90.16		
4		137.49	89.83		
5		136.72	89.05		
1	300	204.85	104.79	104.18	0.41
2		204.09	104.28		
3		203.82	104.10		
4		203.82	104.11		
5		203.06	103.60		

验证单位 5

验证日期 2020.12.28

表 22 精密度实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	436.96	0.44
2	437.24	
3	437.00	
4	440.36	
5	434.97	

表 23 稳定性实验结果

时间	峰面积 (mAU*s)	RSD%
0	322.34	1.73
4	318.91	
8	321.55	
12	319.68	
24	307.78	

表 24 重复性实验结果

次数	峰面积 (mAU*s)	RSD%
1	478.25	0.40
2	476.24	
3	481.38	
4	477.29	

5	478.31	
---	--------	--

表 25 方法的回收率

样品	添加量 μg/g	检测值 μg/g	回收率 %	平均回收率 %	相对标准偏差 %
1	100	90.62	84.86	85.72	1.18
2		91.50	86.62		
3		91.50	86.62		
4		91.22	86.05		
5		90.41	84.44		
1	200	147.58	99.39	98.48	0.75
2		147.14	98.95		
3		146.74	98.54		
4		146.17	97.98		
5		145.75	97.55		
1	300	209.14	107.30	107.01	1.23
2		211.86	109.11		
3		208.15	106.64		
4		207.68	106.32		
5		206.68	105.66		

### 6.13. 实际样品检测

采用建立的凝集素含量测定 HPLC 方法，对三个食用菌品种金针菇、平菇、和白玉菇共 15 份样品中凝集素含量进行检测，结果列于下表。15 份食用菌样品中凝集素含量范围为 19.60~46.43 mg/g，RSD 范围为 0.35%~5.02%。

品种	样品编号	凝集素含量 mg/g			平均值 mg/g	RSD%
		1	2	3		
金针菇	1	27.44	27.61	27.60	27.55	0.35
	2	30.93	31.07	30.54	30.85	0.88
	3	46.43	45.04	44.37	45.28	2.32
平菇	1	36.95	34.53	33.54	35.01	5.02
	2	32.26	31.37	30.65	31.43	2.57
	3	33.29	32.76	32.15	32.73	1.75
白玉菇	1	20.18	20.30	19.60	20.03	1.86
	2	27.60	28.11	27.19	27.63	1.67
	3	31.05	29.97	29.62	30.22	2.47

### 6.14. 验证结论

验证结论：本方法在精密度与准确性高，检出限低，重复性好，同时方法简单、耗时短，该方法用于实际样品中凝集素含量检测得到了满意的结果。

## 7. 采用国际标准和国外先进标准程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况

目前凝集素含量测定方法无国际标准和国外先进标准可参照。本标准在制订过程中对以食用菌为原料的凝集素产品的质量、检测和市场进行了充分的调查研究，并广泛征求和采纳了国内相关领域专家的意见和建议，所制定的标准适合我国国情，具有先进性、科学性、实用性和可操作性，

## 8. 与现行法律法规和强制性标准的关系

标准所确定的各项技术指标和内容符合我国现行的有关方针、政策，并与相关法律、法规、标准吻合。

本标准颁布实施后，填补我国食用菌加工产业中凝集素测定方法的空白，更有利于行业应用；与现行的法律、法规及其他国家标准没有矛盾。

## 9. 标准作为强制性或推荐性标准的意见

建议本标准作为推荐性国家标准发布。

## 10. 实施标准的建议

如果本标准被批准并发布，为了贯彻好本标准，使其有效发挥作用，建议在标准发布后，在相关企业和检测机构进行宣传和贯彻，并组织有关部门和人员进行学习和培训。

## 11. 参考文献

- [1]肖俊琪,翟爱华,张东杰.赤小豆凝集素的分离纯化及电泳分析[J].食品与机械,2020,36(07):161-166+200.
- [2]王文君,王璐瑶,周华,韦萍.姬松茸凝集素的分离纯化及性质[J].生物加工过程,2020,18(03):318-323.
- [3]林勇,刘俊锋,唐小峦,张月芬,戴雅彬.长裙竹荪菌丝体凝集素的分离纯化及其理化性质[J].福建农业学报,2019,34(11):1342-1346.
- [4]张柏林,刘宁,王双双,吕朝燕,何臻.大豆凝集素纯化及凝集活性测定的研究[J].江苏农业科学,2019,47(12):221-224.
- [5]杨爱霞,李应彪,许程剑.阿魏菇凝集素分离纯化及理化性质的研究[J].食品与生物技术学报,2014,33(01):34-40.
- [6]邓政东,程爱芳,蒲玉婷.黑木耳凝集素的提取工艺[J].江苏农业科学,2015,43(03):259-260.
- [7]邓政东,程爱芳,郑廷金.猴头菇凝集素的提取工艺研究[J].北方园艺,2014(24):133-135.

[8]郭栋,潘芳芳,潘煜,王玉红,陈光,蒋圣娟.五种食用菌凝集素的提取及凝集活性测定[J].安徽科技学院学报,2014,28(03):35-40.

[9]陈珺霞,刘主.草菇凝集素提取研究[J].韶关学院学报,2013,34(04):46-49.

[10]王庆忠,鹭,吴耘红,欧阳亮,王亚军,秦玲玲.14 种蔬菜中凝集素的提取和生物活性研究[J].中国热带医学,2008(05):749-752+757.