

《银耳中银耳多糖的测定方法》
(征求意见稿)
编制说明

自然资源部第三海洋研究所

2024年8月1日

一、任务来源

本国家标准的制定任务是根据2023年8月6日《国家标准化管理委员会关于下达2023年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》（国标委发〔2023〕37号）文件精神，计划下达日期：2023-08-06，项目周期：18个月，应报批日期：2025-02-06。项目主管部门：中华全国供销合作总社。技术归口单位：全国银耳标准化工作组。本标准由自然资源部第三海洋研究所、厦门谱尼测试有限公司、古田县食用菌研发中心、全国银耳标准化工作组、福建省食用菌产品质量监督检验中心、福建省祥云科技发展有限公司、安发(福建)生物科技有限公司、安诺康(福建)生物科技科有限公司共同起草。

二、制订标准的意义和必要性

银耳(*Tremella fuciformis* Berk.) 又称白木耳，为担子菌门真菌银耳的子实体，是我国传统的真菌食药，享有“菌中之冠”的美誉，具有滋阴润肺、养胃生津、免疫调节、抗肿瘤、抗氧化衰老、降血糖血脂、清除羟基自由基、等众多保健功效，银耳中含有丰富的营养物质，如银耳多糖、蛋白质、膳食纤维、维生素和矿物质等，其中，大部分的生物活性均与银耳多糖相关。由于银耳的活性物质具有众多的保健功效，国内许多研究单位或企业已经开始以银耳为原料生产提取银耳多糖，研究了解银耳中主要单糖的含量组成情况，为了满足这一需求，本项目通过对银耳多糖的水解，以离子色谱法，准确地测定银耳多糖中单糖的组成和含量。基于银耳多糖中单糖组成比例能较为准确的将银耳多糖与其它多糖区分开，以弥补原有苯酚硫酸法测定总多糖带来的检测缺陷。近年来，国内外对银耳多糖功能研究报道很多，重在对其分子量、单糖组成、侧链位置、结合方式以及生理功能研究，而具体到银耳多糖的单糖组成及含量其含量测定研究则较少。

现有国内已有各级食用菌多糖类检测标准包括：《GB/T 15672-2009食用菌中总糖含量的测定》、《NY/T 1676-2023食用菌中粗多糖含量的测定》、《SN/T 4260-2015 出口植物源食品中粗多糖的测定苯酚-硫酸法》以及《银耳多糖产品中多糖含量的测定》、《银耳多糖》等团体标准。但这些标准有各自的适用范围、测试对象、测试方法、方法特点，如GB/T 15672-2009、NY/T 1676-2023的测试对象是食用菌中总糖及粗多糖，方法是苯酚-硫酸法，本项目的测定方法的测试对象是银耳中银耳多糖经酸水解后的5种特征性单糖，方法特点是采用离子色谱法对5种单糖进行定性及定量检测。本方法与苯酚-硫酸法，衍生化的气相色谱法，液相色谱-蒸发光检测器或示差荧光检测器法等测定方法比较，具有灵敏度高，操作简单，分离度好的等优点。离子色谱-脉冲安培检测法无需衍生即可分离测

定样品中的糖。

本项目拟制定银耳多糖中单糖组成测定的统一标准方法—离子色谱法，采用离子色谱法，通过对银耳多糖的水解，准确地测定单糖的组成和含量。基于银耳多糖中单糖组成比例能较为准确的将银耳多糖与其它多糖区分开，以弥补原有苯酚-硫酸法测定总多糖带来的检测缺陷。本标准建立的方法具有专属性强、稳定、无杂质干扰，此外，该方法简单、可实现自动化检测、操作安全等优点。

三、主要工作过程、标准主要起草人及其所做的工作。

3.1 标准预研阶段

(1) 准备阶段（2022年3月~2022年6月）

该阶段主要工作是会同参加起草单位成立标准起草工作组，明确各参与起草单位和主要起草人的分工，并制定工作方案。标准的主要起草人对过去各自的实际操作经验进行了总结和交流，同时查阅国内外最新的相关文献资料，为标准起草做好充分准备。

本技术标准于2022年3月由全国银耳标准化工作组提出策划，并于2022年6月1日成立《银耳中银耳多糖的测定方法》技术标准研究领导小组，由自然资源部第三海洋研究牵头制订，全国银耳标准化工作组等6家单位协作，开展标准制订、测试仪器分析等工作。

(2) 标准草案起草阶段（2022年6月~2023年3月）：

根据本标准涉及到的关键问题展开一系列实验。对测定银耳中银耳多糖涉及的提取方法中的提取时间、提取温度、提取次数、料液比等样品提取步骤进行优化，根据实验结果在本标准中给出推荐的方法，提高了本标准的适用性和可操作性。在上述实验基础上，通过主要起草人之间的实践工作与经验交流和讨论，完成了标准草案、标准试验验证等工作。

经过近一年多的标准预研，项目申报立项国家标准，于2023年3月6日通过国家标准评审，并于2023年8月16日收到标准研制立项文件（国标委发〔2023〕37号）。

(3) 标准主要起草人、负责人及其所做工作

张怡评(自然资源部第三海洋研究所)：负责标准的总体框架设计，负责资料收集，负责标准草案编写和编制说明的编写。

陈伟珠(自然资源部第三海洋研究所)：负责标准技术内容的整体审核，负责标准草案编写和编制说明的审核和修改，参与标准的总体框架设计、参与标准草案编写和编制说明的编写。

施丽君(自然资源部第三海洋研究所)：负责标准编制前样品提取方法、色谱条件等实

验分析。

3.2 标准起草阶段(2023年8月-2024年8月)

1、标准制定工作会议

根据《国家标准化管理委员会决定下达2023年第二批推荐性国家标准计划和推荐性国家标准外文版计划》(国标委发(2023)37号)的通知,《银耳中银耳多糖的测定方法》列入推荐性国家标准计划。2023年8月28日在福建省宁德市古田县召开《银耳中银耳多糖的测定方法》国家标准制定工作会议。

标准的制定、实施,将为银耳中的多糖测定提供可靠、规范、准确的测定方法,为银耳资源的开发利用、产业化生产和精深加工发挥重要作用。会议议定:

(1) 成立标准起草工作组。

根据2023年3月1日起施行的《国家标准管理办法》“国家标准起草,应当组建具有专业性和广泛代表性的起草工作组,开展国家标准起草的调研、论证(验证)、编制和征求意见处理等具体工作。”的规定,会议经充分协商,本标准起草工作组由:自然资源部第三海洋研究所、厦门谱尼测试有限公司、古田县食用菌研发中心、全国银耳标准化工作组、福建省食用菌产品质量监督检验中心、福建省祥云生物科技发展有限公司、安发(福建)生物科技有限公司、安诺康(福建)生物科技有限公司、福建省农业科学院农产品加工研究所等9个单位组成。起草工作组组长由自然资源部第三海洋研究所张怡评担任。

(2) 标准进度安排及起草单位职责与分工

主要进度安排如下:

标准计划下达时间:2023年8月6日;标准征求意见稿完成时间:2024年8月6日前;标准送审稿完成时间:2024年11月4日前;标准报批稿完成时间:2024年12月9日前;标准报批时间:2025年2月6日前。

起草单位职责与分工:

自然资源部第三海洋研究所:主导标准起草全过程的各项工作:

包括收集相关资料,开展调查研究、做好相关试验、(验证)论证、标准征求意见稿及各阶段标准文本及相关材料编写等方面的工作职责。

全国银耳标准化工作组:负责标准制定全过程的组织、协调,负责征求意见稿、送审稿、报批稿的审核、协助联系标准样品验证单位。指导、督促标准起草工作组

按计划完成标准制定工作。组织标准审查，负责标准报批等相关工作。

其他起草单位：协助收集相关资料，开展调查研究等预研工作；协助提供样品，开展标准试验验证工作。协助修改标准征求意见稿、送审稿、报批稿及其编制说明。参加相关研讨会、专家意见处理会、审查会。

（3）检测方法选取

用离子色谱法对银耳中银耳多糖进行定性检测，可显示5种单糖的特征性图谱，方法简单、可实现自动化检测；苯酚硫酸法可检测包含5种主要单糖含量以外的银耳粗多糖含量。国内相关食用菌多糖类检测标准情况见下表。

国内相关食用菌多糖类检测标准情况						
标准类别	相关多糖检测标准		适用范围	测试对象	测试方法	方法特点
国家标准	GB/T 15672-2 009	食用菌中总糖含量的测定	本标准适用于食用菌中总糖含量的测定。	食用菌中总糖	苯酚-硫酸法	有水解步骤，但是混合了所有单糖或淀粉糊精，不能测试单糖及显示相关特性糖图谱。
行业标准	NY/T 1676-20 23	食用菌中粗多糖含量的测定 分光光度法	<p>本文件规定了食用菌中粗多糖含量的分光光度测定方法。</p> <p>本文件适用于各种食用菌鲜品及干菇、片菇、碎菇、菇粉等初加工制品中粗多糖含量的测定；不适用于添加淀粉、糊精组分的食用菌产品，以及食用菌液体发酵或固体发酵等产品的测定。</p> <p>本文件粗多糖线性含量范围为 1.0g/100g~50g/100g.当含量超范围时,可酌情减少称样量或加大提取液定容体积。</p>	各种食用菌鲜品及干菇、片菇、碎菇、菇粉等初加工制品中粗多糖	分光光度法	用碘溶液进行定性鉴别淀粉、糊精；以苯酚-硫酸法测定粗多糖含量

行业标准	SN/T 4260-20 15	出口植物源食品中粗多糖的测定 苯酚-硫酸法	本标准规定了出口植物源性食品中粗多糖含量的比色测定法。 本标准适用于食用菌、枸杞、葡萄、枣类、果汁等植物源性食品中粗多糖含量的测定。 本标准不适用于添加淀粉、糊精组分的食品。	食用菌、枸杞、葡萄、枣类、果汁等植物源性食品中粗多糖（不适用于添加淀粉、糊精组分的食品。）	苯酚-硫酸法	用碘溶液进行定性鉴别淀粉、糊精；以苯酚-硫酸法测定粗多糖含量
行业标准	NY/T 2279-20 12	食用菌中岩藻糖、阿糖醇、海藻糖、甘露醇、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、核糖的测定 离子色谱法	本标准适用于食用菌中岩藻糖、阿糖醇、海藻糖、甘露醇、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、核糖含量的测定。	食用菌中岩藻糖、阿糖醇、海藻糖、甘露醇、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、核糖含量的测定	离子色谱法	无水解步骤来分解单糖及并测出各种单糖及其相应的图谱
团体标准	T/SFABA 3-2018	银耳多糖产品中多糖含量的测定	本标准规定了用苯酚硫酸法测定银耳多糖含量的方法。本标准适用于以门担子菌门真菌银耳的子实体为原料，经过水洗、热水浸提、过滤、沉淀分离、干燥、粉碎（和制粒）等工序而制成	纯化的银耳多糖制品	苯酚硫酸法	有水解步骤，但是混合了所有单糖或淀粉糊精，不能测试单糖及显示相关特性糖图谱。

			的银耳多糖粉剂或颗粒。			
团体标准	T/SFABA 4-2018	银耳多糖	本标准适用于以门担子菌门、异隔担子菌纲、银耳目、银耳科、银耳属真菌银耳子实体为原料，制成的银耳多糖。	银耳多糖制品	苯酚硫酸法	同上（T/SFABA3-2018）
团体标准	T/FJCA 002-202 4	银耳多糖	本文件规定了食品级与化妆品原料级银耳多糖产品的质量要求。 本文件适用于以银耳属真菌银耳的子实体为原料，经过提取、分离纯化、干燥等工序制成的银耳多糖产品。	银耳多糖制品	高效液相色谱法	有水解步骤，测试对象是银耳多糖制品
国家标准 计划项目	0230487 -T-442	银耳中银耳多糖的测定 (征求意见稿)	本文件描述了采用离子色谱法对银耳中银耳多糖的定性定量方法。 本文件适用于银耳中银耳多糖经酸水解后的特征性单糖——岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和甘露糖的测定。	银耳中银耳多糖	定性分析：采用离子色谱法；定量分析采用分光光度法	1) 用离子色谱法定性鉴别银耳多糖并显示相应图谱。 2) 用苯酚硫酸法检测粗多糖含量。

2、标准征求意见稿研讨会及调研活动

2024年7月15日在自然资源部第三海洋研究所海洋生物产业化中试技术研发公共服务平台会议室（厦门），全国银耳标准化工作组秘书处组织召开《银耳中银耳多糖的测定方法》推荐性国家标准（征求意见稿）讨论会。全国银耳标准化工作组、古田县食用菌研发中心、自然资源部第三海洋研究所、厦门谱尼测试有限公司、福建省食用菌产品质量监督检验中心、福建省祥云生物科技发展有限公司、安发（福建）生物科技有限公司、安诺康（福建）生物科技有限公司、福建省农业科学院农产品加工研究所、福建海旭福生物科技有限公司、宁德市产品质量检验所、太阳树（厦门）生物工程有限公司等12家单位的代表16人参加了会议。

会议讨论了自然资源部第三海洋研究所2024年5月27日提交的《银耳中银耳多糖的测定方法》推荐性国家标准征求意见稿（初稿），提出了修改意见。会议由工作组副秘书长郑瑜婷主持。

会后，全国银耳标准化工作组秘书处及部分参与标准制定的单位，对自然资源部第三海洋研究所、厦门谱尼测试有限公司、太阳树（厦门）生物工程有限公司、福建省祥云生物科技发展有限公司、福建海旭福生物科技有限公司、福建省农科院农产品加工研究所、安发（福建）生物科技有限公司、宁德市产品质量检验所、安诺康（福建）生物科技科有限公司、福建师范大学生命科学学院等10家单位，开展了与标准制定相关的调研工作。

一、会议认为

根据《国家标准化管理委员会关于下达2023年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》（国标委发〔2023〕37号）文件精神，计划下达日期：2023-08-06，项目周期：18个月，应报批日期：2025-02-06。本标准距离报批仅剩6个月，时间紧，任务重，各起草单位应高度重视，务必按时报批。

二、会议议定

1、进度安排

2024年8月15日前完成征求意见稿及编制说明的编写、审核、修改完善、定稿，并上传国家标准信息公共服务平台公开征求意见，同时启动线下征求意见程序；征求意见期间对有条件的起草单位同步开展各项技术指标试验验证工作；10月15日前将平台和线下征集的意见，整理分类。10月16日-11月15日完成征求意见处

理会及送审稿的编写；11月30日前完成送审稿审核、修改完善；12月31日前召开审查会；2025年1月30日前完成报批稿、报批程序。

2、技术指标修改意见

(1) 标准提出单位改为：“中华全国供销合作总社”。

(2) 范围改为：

“本文件描述了采用离子色谱法对银耳中银耳多糖的定性定量方法。

本文件适用于银耳中银耳多糖经酸水解后的特征性单糖——岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和甘露糖的测定。”

修改理由：增加“半乳糖、葡萄糖、木糖”的测定更能代表银耳多糖的主要成分。

(3) 结构调整

① “4.1原理”调整为“4原理”；“4.2试剂”调整为“5试剂和溶液”，“4.2.1-4.2.11”分别归类到“5.1标准品、5.2试剂、5.3试剂配制、5.4标准溶液的制备”；“4.3.9容量瓶”列入“5.5材料”中；“4.2.12单糖标准储备溶液”和“4.4.3标准溶液的配制”一并调整为“5.4标准溶液的制备”；“4.3仪器”调整为“6仪器设备”；“4.4分析步骤”调整为“7试验步骤”，其中“4.4.1检测样品的处理”和“4.4.2水解”列入“7.1样品前处理”的“7.1.1试样提取”、“7.1.2试样水解”。

② “4.5结果计算”改为“8分析结果的表述”；“4.6重复性”改为“9精密度”。

③ 删除“5 银耳中银耳多糖的定量测定分光光度法”条款。修改理由：本标准是检测银耳中岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和甘露糖5种特征性单糖的含量，而原有草案中分光光度法是由于检测粗多糖含量的，所以，草案中分光光度法不适用于单糖的测试，而采用离子色谱法适用于测试单糖的含量。

(4) 增加“7.2测定”条款，“4.4.4色谱条件”改为“7.2.1色谱条件”，并列项表述；增加“7.2.2标准曲线绘制、7.2.3试样溶液的测定、7.2.4空白试验”。

(5) “8分析结果的表述”中补充岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖5种糖总量的计算公式。

(6) 增加“10检出限和定量限”条款。

(7) “附录A”规范性改为资料性，标题改为“岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖标准溶液及银耳多糖溶液的离子色谱图”并A. 1、A. 2条款分别表述，增加图A. 1和图A. 2中1-5的标引序号说明。

(8) 添加终结线。

(9) 编制说明中增加“7.1 银耳多糖的提取”内容中参数依据料液比、水浴温度的确定依据（即单因素试验及响应面法选取过程）。

三、标准编制原则和确定标准主要内容

1 编制原则

在制定过程中，需要把握三项原则：一是需要明确标准化对象，本标准标准化对象是测定银耳中的银耳多糖，而不是已经提取的银耳多糖产品或制品中的银耳多糖；二是文件使用者原则：本标准的文件使用者为第三方检测机构、管理或认证机构，要求标准的试验步骤和程序应切实可操作，并得出明确的结论；三是目的导向原则就是要将测试银耳多糖的步骤程序化，并确保按程序检测误差小，重复性、再现性好。

在适用性方面本标准充分考虑了离子色谱的工作原理及特点，具有专属性、简单，操作安全，同时兼顾该仪器使用的环境、检测条件，可广泛应用于银耳多糖中单糖的定量定性分析。

本标准的制定准确地测定银耳多糖中单糖组成和含量，结合现代分析技术解析银耳多糖，加速对银耳多糖的组分及含量研究，为更好促进其在食品、化妆品、药品和保健品中的应用提供理论依据。

2. 确定标准主要内容的论据和理由

2.1 原理

银耳多糖提取液经三氟乙酸提取后水解为单糖，通过离子色谱仪进行测定。根据银耳多糖各单糖色谱图的保留时间和峰面积与各单糖标准品的保留时间和峰面积进行对比，通过加和得到银耳多糖的单糖总量，实现定性和定量分析。

2.2 色谱柱的选择

目的：为了选择合适的色谱柱，提高检测的分离度。

实验方法：选择三种型号的色谱柱：CarboPac™ PA10色谱柱(250×4.6 mm，

5 μm), CarboPac™ PA20色谱柱(50×2.3 mm, 5 μm)和CarboPac™ PA100色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm), 考察色谱柱对单糖分离度的影响(见图1~3)。结果表明, PA20和PA100色谱柱, 各个单糖标准品, 依次为岩藻糖(Fuc)、半乳糖(Gal)、葡萄糖(Glc)、木糖(Xyl)、甘露糖(Man), 可以达到分离效果, 由于PA20色谱柱的分析时间较短, 故选择型号为CarboPac™ PA20作为本实验色谱柱。

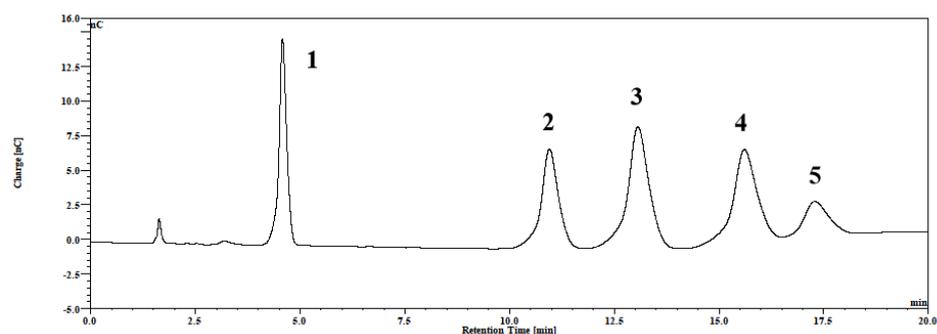


图1 PA100色谱柱的单糖离子色谱图

1. Fuc 2. Gal 3. Glc 4. Xyl 5. Man

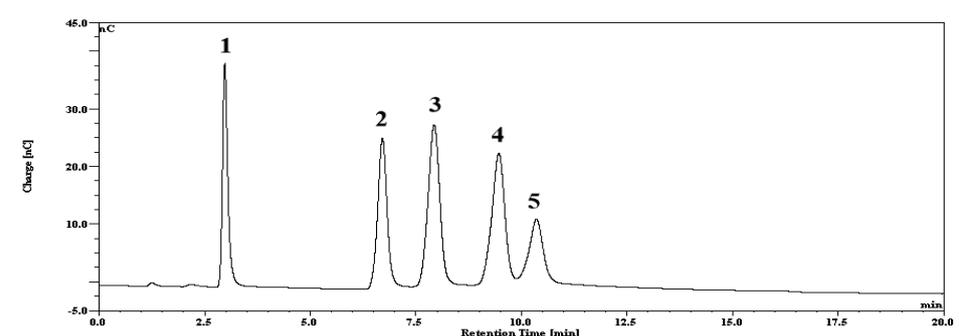


图2 PA20色谱柱的单糖离子色谱图

1. Fuc 2. Gal 3. Glc 4. Xyl 5. Man

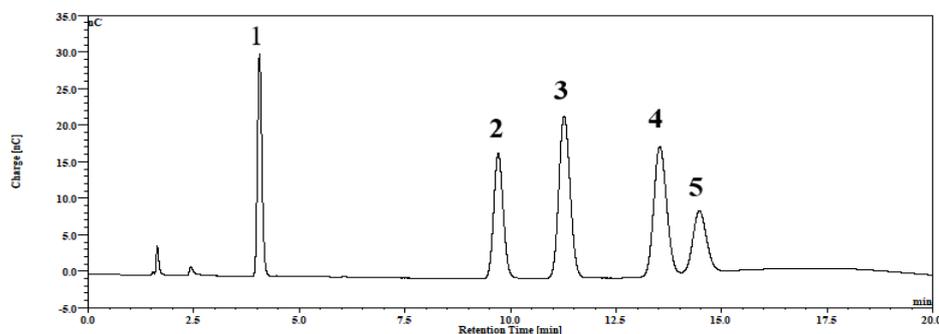


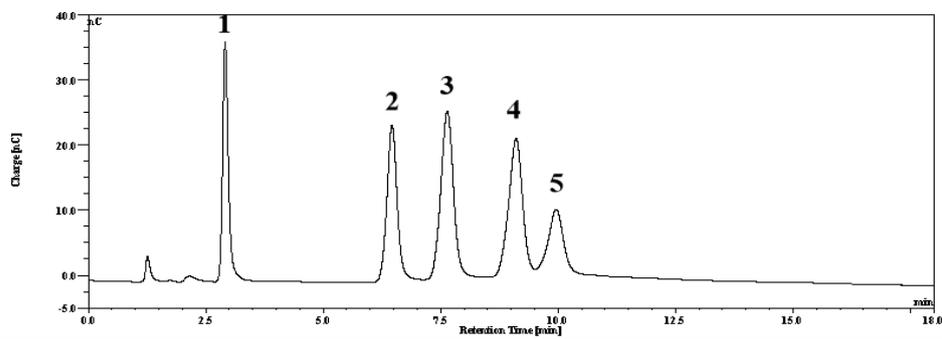
图3 PA100色谱柱的单糖离子色谱图

1. Fuc 2. Gal 3. Glc 4. Xyl 5. Man

2.3 流动相的选择

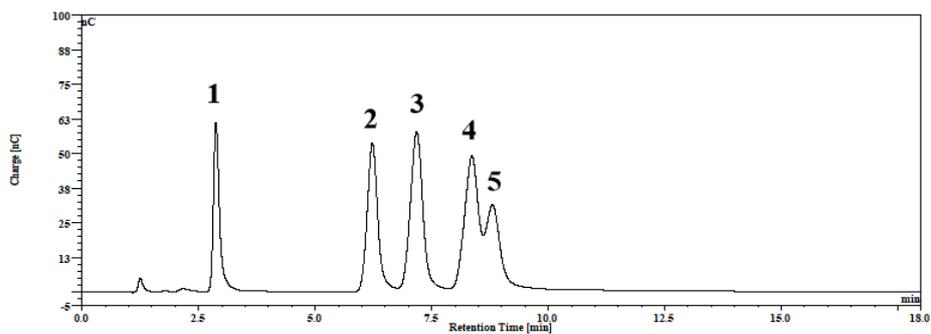
目的：为了选择适宜的流动相，提高方法的分离度和灵敏度。

实验方法：使用CarboPac™ PA20色谱柱(250×2.3 mm, 5 μm)，考察不同流动相浓度(1 mmol/L、5 mmol/L、20 mmol/L NaOH)对单糖标准品的保留时间和分离效果(见图4~6)，通过结果分析，随着NaOH浓度的增加，保留时间也有所缩短，但分离效果越差。在NaOH浓度为20 mmol/L时，各个单糖标准品之间都不能基线分离，在NaOH浓度为5 mmol/L时，木糖和甘露糖难以达到基线分离，在NaOH浓度为1 mmol/L时，各个单糖之间都能有较好的分离度。因此确定NaOH浓度为1 mmol/L。



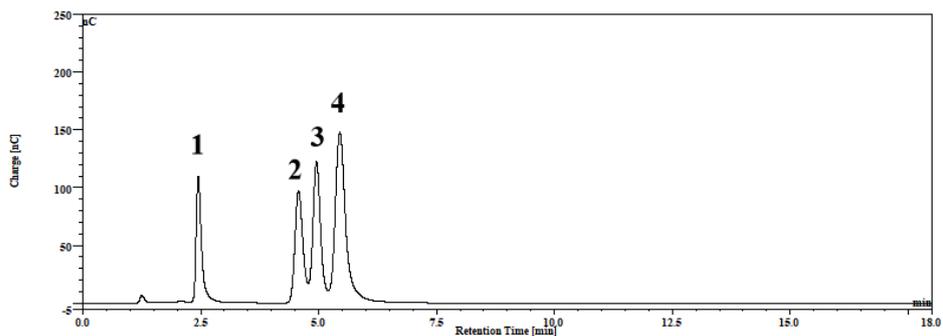
1. Fuc 2. Gal 3. Glc 4. Xyl 5. Man

图4 1 mmol/L的单糖离子色谱图



1. Fuc 2. Gal 3. Glc 4. Xyl 5. Man

图5 5 mmol/L的单糖离子色谱图



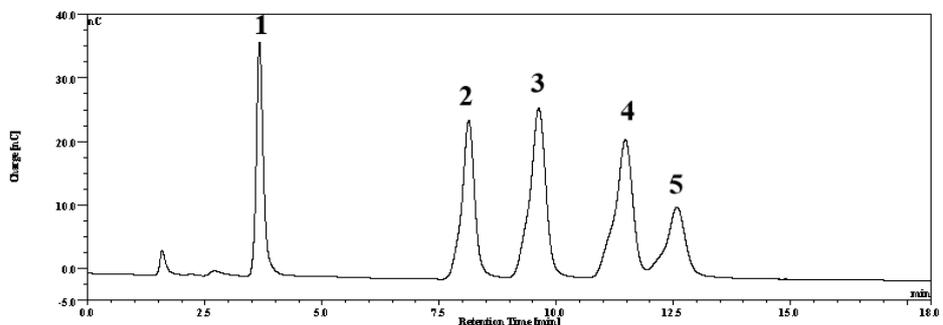
1. Fuc 2. Gal 3. Glc 4. Xyl+Man

图6 20 mmol/L的单糖离子色谱图

2.4 流速的选择

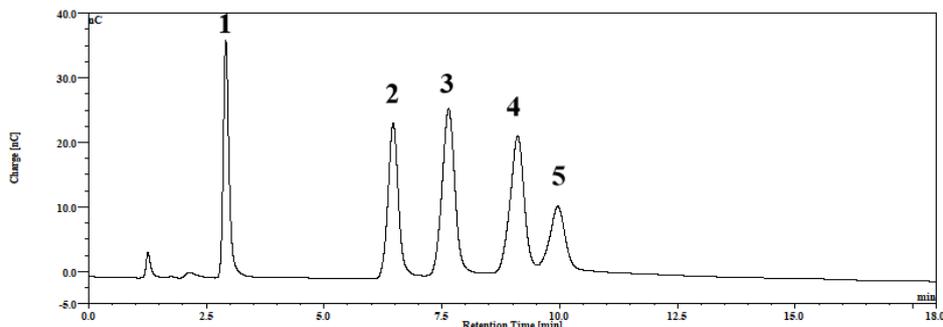
目的: 为了选择合适的流速, 提高方法的分离度和灵敏度。

实验方法: 本实验考察不同流速(0.4、0.5、0.6 mL/min)时对单糖标品的分离度影响(见图7~8), 随着流动相的流速增大时, 虽然保留时间也逐渐缩短了, 但其压力也在增大, 当流速增加到0.6 mL/min时, 压力过高导致仪器出错, 对色谱柱使用以及仪器的运行造成影响, 因此选择流速为0.5 mL/min。



1. Fuc 2. Gal 3. Glc 4. Xyl 5. Man

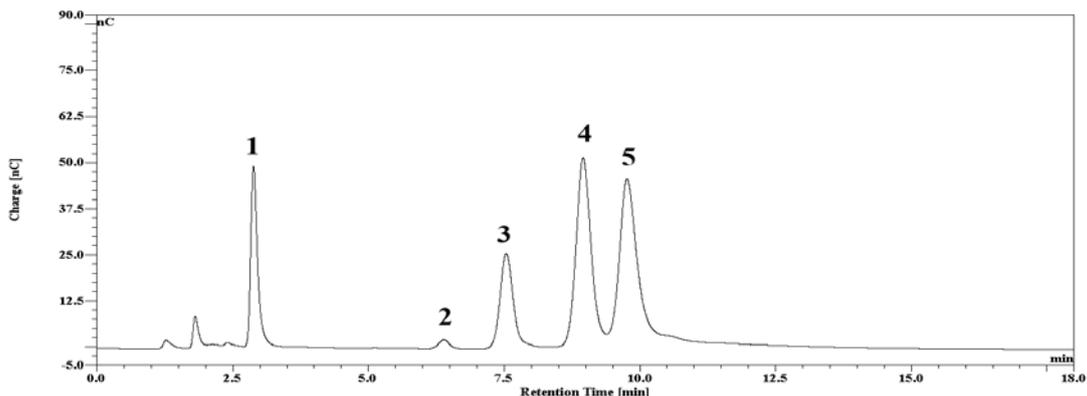
图7 0.4 mL/min的单糖离子色谱图



1. Fuc 2. Gal 3. Glc 4. Xyl 5. Man

图8 0.5 mL/min的单糖离子色谱图

通过对不同色谱条件的摸索，建立了银耳多糖中各单糖组分分析检测的色谱方法：色谱柱为CarboPac™ PA20色谱柱(250×2.3 mm, 5 μm)；流动相：1 mmol/L的NaOH；流速：0.5 mL/min，该方法简便，分离效果好，能较好的对单糖组分进行检测，可用于银耳多糖中单糖的鉴别，如图9。



1. Fuc 2. Gal 3. Glc 4. Xyl 5. Man

图9 银耳多糖中单糖成分的离子色谱图

2.5 色谱分析条件

色谱柱：CarboPac™PA20(250×2.3 mm, 5 μm)阴离子交换柱，配有保护柱 CarboPac™PA20(50×3mm, 5 μm)

使用DIONEX ICS-5000+ SP-5系统，检测器：脉冲安培电化学检测器(ED)

电极：AgCl

波形：Carbohydrates(Standard Quad)

柱温：30℃

进样体积：10 μL

流速：0.5 mL/min

流动相：以水、50 mmol/L NaOH溶液为淋洗液进行二元梯度淋洗，梯度淋洗程序见表1。

表1 银耳多糖梯度洗脱程序

时间(min)	H2O(%)	NaOH(%)
---------	--------	---------

0	98	2
20	98	2
20.1	50	50
25.0	50	50
25.1	98	2
35.0	98	2

2.6 前处理方法的优化

2.6.1 银耳多糖溶液与银耳多糖溶液醇沉的单糖含量比较

准确称取粉碎银耳样品（过二号筛）1.0017g，置于125 mL锥形瓶中，加入60 mL水，于92 °C水浴搅拌5 h，提取结束后，冷却离心，留取上清液0.5 mL，用于酸水解。

取上述步骤（1）剩余上清液加入3倍体积的95%乙醇醇沉，冷藏4h后，离心取沉淀，加水溶解至50 mL容量瓶中，并加水定容至刻度。

准确吸取步骤（1）（2）中提取液各0.5 mL，分别置于水解管中，加入2mol/L的TFA溶液0.5 mL，于110°C条件下水解3 h，反应结束后，冷却至室温，加入1mL甲醇，氮气吹干，加水溶解转移至5 mL容量瓶中，用水定容至刻度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。如图1所示。

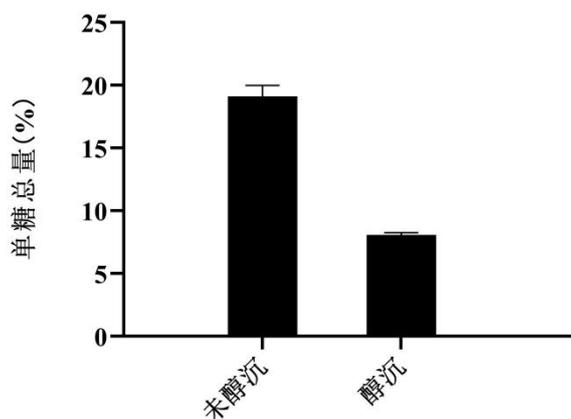


图1未醇沉与醇沉对单糖总量的影响

如图1可知，未醇沉与醇沉的单糖总量分别为19.11%、8.29%、醇沉的单糖总量与未醇沉的单糖总量相比偏少，可能是由于银耳多糖溶液中的多糖成分醇沉不完全，造成单糖总量减少。

考虑3倍量乙醇醇沉比例是否偏少，拟加大酒精比例进行醇沉，按照上述步骤重新

进行提取测定，把上清液分别加入4倍量、5倍量乙醇进行沉淀，分别溶解定容后按照上述方法进行测定，结果表明：未醇沉、加入3倍量乙醇沉淀、加入4倍量乙醇沉淀、加入5倍量乙醇沉淀单糖总量分别为：8.29%、9.25%、9.33%，从3-4倍量乙醇沉淀出多糖，所测定单糖总合略有增长；从4-5倍乙醇沉淀时，所测定的单糖总合基本不再增长。

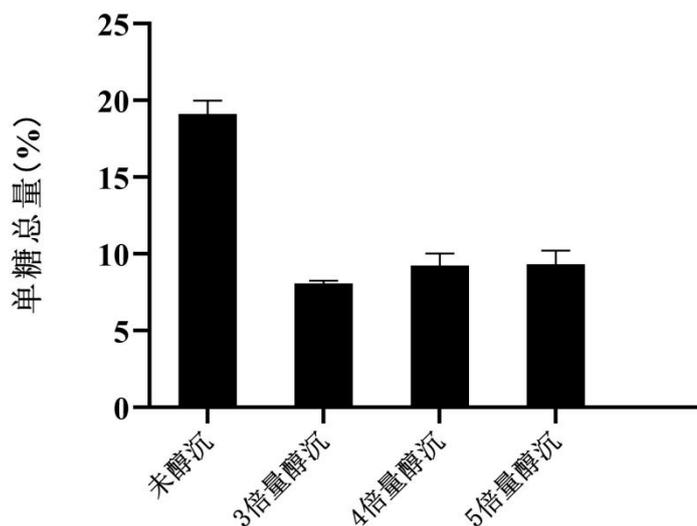


图1未醇沉与不同量醇沉对单糖总量的影响

针对水解可能会对单糖进行破坏问题，我们补充了单糖水解破坏试验，结果表明，在该条件下进行水解并未能破坏单糖。

2.6.2 单糖标准储备液酸水解的含量

精密称取岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖标准品各5 mg置于同一10 mL容量瓶中，用水定容至刻度，得浓度均为0.5 mg/mL的单糖标准储备液。吸取1mL储备液于5 mL容量瓶中，加水定容至刻度，即得各单糖浓度均为100 μg/mL的混合标准储备液，吸取0.5 mL混合标准储备液于水解管中，加入2mol/L的TFA溶液0.5 mL，于110℃条件下水解3 h，反应结束后，冷却至室温，加入1mL甲醇，氮气吹干，加水溶解转移至5 mL容量瓶中，用水定容至刻度，采用离子色谱分析，计算单糖含量。如表1所示。

表1 单糖标准储备液酸水解含量

名称	含量 (%)			平均含量 (%)
	1	2	3	

岩藻糖	96.20	100.07	101.71	99.54
半乳糖	100.57	98.95	100.50	100.01
葡萄糖	99.47	97.38	99.85	98.90
木糖	99.93	97.79	97.59	98.44
甘露糖	100.45	99.29	100.29	100.01

如表1可知，经酸水解后的各单糖含量均 $\geq 98\%$ ，酸水解对单糖含量无影响，不会造成损失。

2.6.3 银耳多糖溶液提取工艺优化

目的：通过对银耳多糖溶液的各因素考察，确定最佳的提取工艺条件。

实验方法：通过单因素试验，考察提取时间、提取温度、料液比对单糖总量的影响，并根据响应面法Box-Behnken设计原理，以提取时间(A)、提取温度(B)、料液比(C)三个因素为响应因子，以单糖总量为评价指标，设计三因素三水平试验进行响应面分析，确定最佳提取工艺。

2.6.3.1 单因素实验

2.6.3.1.1 时间

目的：确定最佳的提取时间

实验方法：准确称取粉碎银耳样品（过二号筛）1.0000g，置于125 mL锥形瓶中，加入50 mL水，于100℃水浴搅拌，分别提取1、2、3、4、5 h，提取结束后，冷却离心，取上清液加水定容至一定体积，各取0.5 mL提取液于水解管中，加入2mol/L的TFA溶液0.5 mL，于110℃条件下水解3 h，反应结束后，冷却至室温，加入1mL甲醇氮吹，用超纯水溶解，稀释至适宜浓度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。如图10所示。

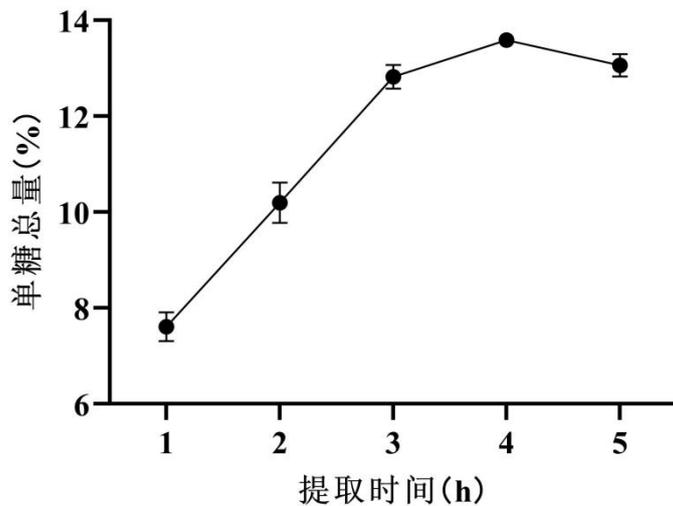


图10提取时间对单糖总量的影响

实验结果：由图10可知，当提取时间逐渐增加时，单糖总量也随之增加。提取时间在4 h之后，增长趋势不明显，单糖总量出现了下降。这可能由于当水浴时间逐渐延长时，使银耳中所含的多糖成分能够充分地向水中溶出。提取时间为4h时，银耳单糖总量达到13.59%。考虑实验时间造成的损耗，由实验结果综合考虑选取3 h为最佳提取时间。

2.6.3.1.2 温度

目的：确定最佳的提取温度

实验方法：准确称取粉碎银耳样品（过二号筛）1.0000g，置于125 mL锥形瓶中，加入50 mL水，分别于60、70、80、90、100℃水浴搅拌，提取4h结束后，冷却离心，取上清液加水定容至一定体积，各取0.5 mL提取液于水解管中，加入2mol/L的TFA溶液0.5 mL，于110℃条件下水解3 h，反应结束后，冷却至室温，加入1mL甲醇氮吹，用超纯水溶解，稀释至适宜浓度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。如图11所示。

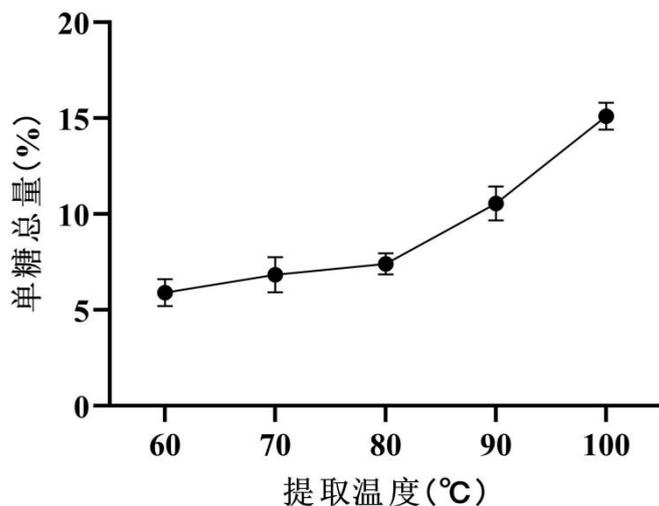


图11提取温度对单糖总量的影响

实验结果：由图11表明，随着温度的升高，银耳提取液中单糖含量也呈上升趋势，提取温度的升高会增加溶剂分子和溶质分子的运动，从而促进扩散作用，有利于提高多糖含量。因此，选择100 °C为最佳提取温度。

2.6.3.1.3 料液比

目的：确定最佳的料液比

实验方法：准确称取粉碎银耳样品（过二号筛）1.0000g，置于125 mL锥形瓶中，于100°C水浴中搅拌4h，分别选取料液比1：20、1：30、1：40、1：50、1：60（g/mL）加入水，提取结束后，冷却离心，取上清液加水定容至一定体积，各取0.5 mL提取液于水解管中，加入2mol/L的TFA溶液0.5 mL，于110°C条件下水解3 h，反应结束后，冷却至室温，加入1mL甲醇氮吹，用超纯水溶解，稀释至适宜浓度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。如图12所示。

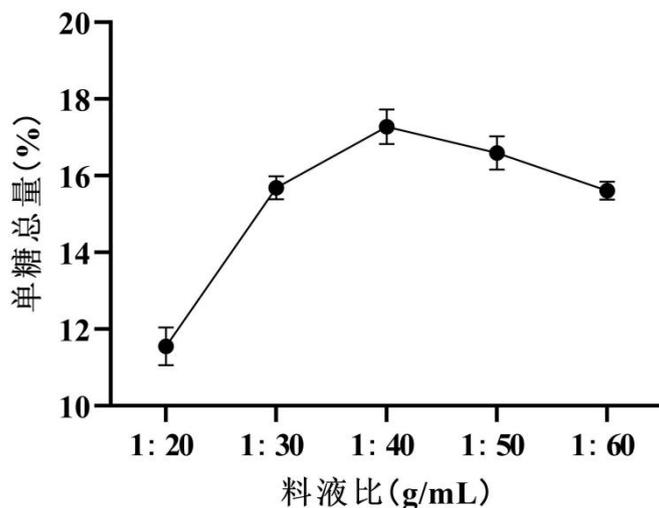


图12料液比对单糖总量的影响

实验结果：由图12可知，当液料比在1:20~1:40(g/mL)时，单糖总量呈上升趋势，在1:40(g/mL)时达到最大，为17.28%，之后逐渐下降。可能是料液比逐渐增加，有利于增大其与样品的接触面积，能使更多的多糖溶出，当料液比继续增大，单糖总量不再增加，多糖溶出达到饱和，会趋于平稳或者缓慢下降，因此最佳料液比选择1:40(g/mL)。

2.6.3.1.4 提取次数

目的：确定最佳的提取次数

实验方法：准确称取粉碎银耳样品（过二号筛）1.0000g，置于125 mL锥形瓶中，加入50mL水，于100℃水浴中搅拌4h，提取结束后，冷却离心，留取上清液。沉淀加入50mL水，按上述条件重复提取两次，每次取上清液加水分别定容至一定体积，各取0.5 mL提取液于水解管中，加入2mol/L的TFA溶液0.5 mL，于110℃条件下水解3 h，反应结束后，冷却至室温，加入1mL甲醇氮吹，用超纯水溶解，稀释至适宜浓度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。如图13所示。

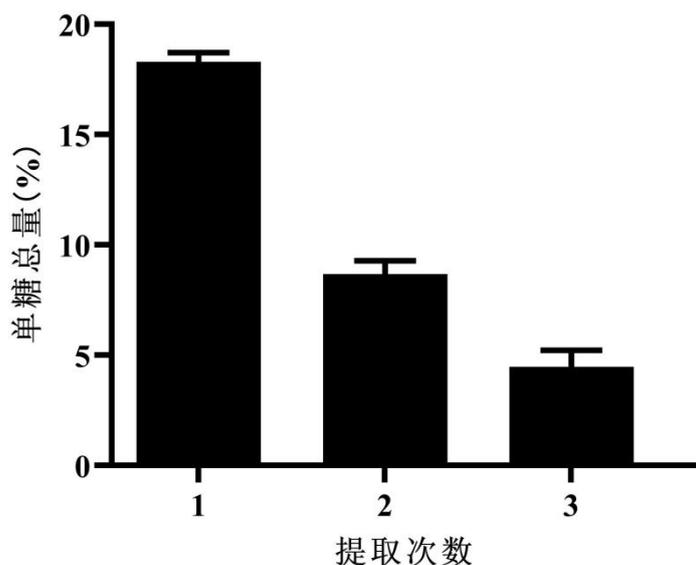


图13提取次数对单糖总量的影响

实验结果: 由图13可知, 单糖含量随提取次数的增大而减少。因此, 出于实验成本考虑, 确定提取次数为1次。

2.6.3.2 银耳多糖溶液响应面设计

目的: 为了确定最佳的提取条件

实验方法: 在单因素试验结果的基础上, 根据响应面法Box-Behnken设计原理, 以提取时间(A)、提取温度(B)、料液比(C)三个因素为响应因子, 以单糖总量为评价指标, 设计三因素三水平试验进行响应面分析, 响应面水平如表2所示。

表2银耳多糖溶液提取因素水平表

水平	因素		
	A/h	B/°C	C/(g/mL)
1	1	80	1:20
2	3	90	1:40
3	5	100	1:60

实验结果: 采用Design-Expert 8.0.6软件, 设计响应面优化试验方案得实验结果见表3。

表3 响应面优化银耳多糖提取的设计方案及结果

序号	A/h	B/°C	C/(g/mL)	单糖总量/%
1	1	0	-1	8.38
2	-1	-1	0	4.6
3	0	0	0	11.05
4	0	0	0	10.14
5	0	1	1	12.11
6	-1	0	1	4.58
7	0	0	0	10.46
8	-1	0	-1	7.16
9	0	0	0	11.19
10	0	-1	-1	1.32
11	1	0	1	18.74
12	0	-1	1	4.95
13	1	-1	0	4.56
14	0	0	0	10.76
15	-1	1	0	4.45
16	1	1	0	17.13
17	0	1	-1	8.34

采用 Design-Experts8.0.6 软件对表2所得数据进行二次多项式回归分析,得到单糖总量对提取时间(A)、提取温度(B)、料液比(C)的回归模型方程为:

单糖总量 (%)

$$=10.72+3.50A+3.33B+1.90C+3.18AB+3.24AC+0.035BC+0.000A^2-3.04B^2-1.01C^2$$

通过响应面试验得到的结果对银耳多糖溶液提取工艺的回归方程进行方差分析见表4。

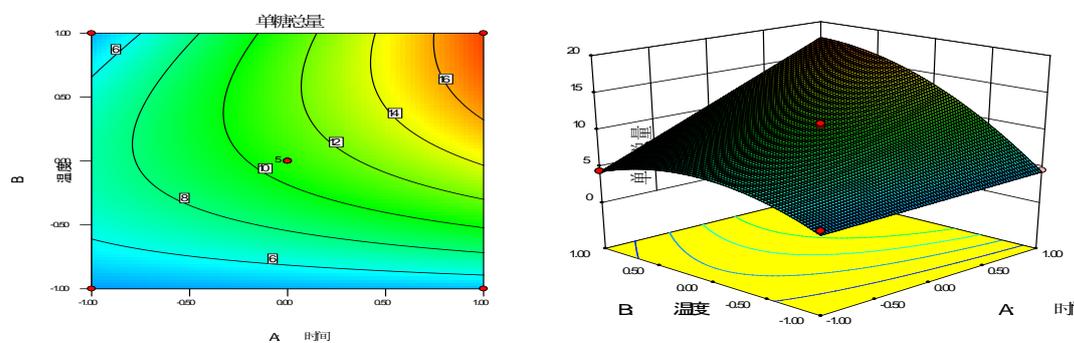
表4银耳多糖溶液提取工艺回归方程方差分析结果

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	342.4300	9	38.0500	128.100	< 0.0001	**

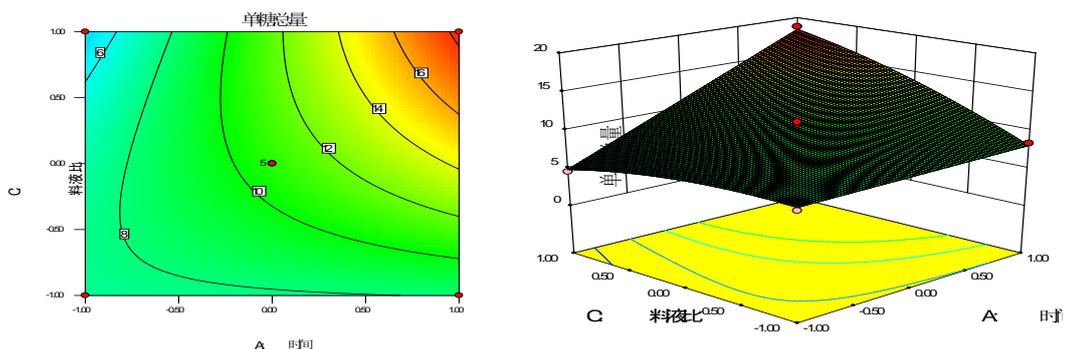
A	98.1400	1	98.1400	330.420	< 0.0001	**
B	88.4400	1	88.4400	297.780	< 0.0001	**
C	28.8000	1	28.8000	96.980	< 0.0001	**
AB	40.4500	1	40.4500	136.190	< 0.0001	**
AC	41.8600	1	41.8600	140.940	< 0.0001	**
BC	0.0049	1	0.0049	0.016	0.9014	
A ²	0.0000	1	0.0000	0.000	1.0000	
B ²	38.7800	1	38.7800	130.580	< 0.0001	**
C ²	4.2500	1	4.2500	14.320	0.0069	**
残差	2.0800	7	0.3000			
失拟项	1.3400	3	0.4500	2.440	0.2048	
净误差	0.7400	4	0.1800			
总离差	344.5100	16				

注：“*”表示差异显著(P<0.05)；“**”表示差异极显著(P<0.01)。

由方差分析表4可知，该方差模型F值为128.1，P值极显著(P<0.01)，失拟项的F值为2.440，P值为0.2048，不显著。在此回归方程模型中，提取时间、提取温度、料液比的P值均小于0.01，说明存在显著性。二次项中，A²影响不显著(P>0.05)，B²影响极显著(P<0.01)，C²影响极显著(P<0.01)。校正模型的相关系数R² = 0.9940可知试验考察值和模拟预测值之间的相关性很高，表明该方程的模拟性较好。根据三种因素F的值大小，可推断出影响提取率大小因素的排序为：提取时间(A) > 提取温度(B) > 料液比(C)。根据拟合模型绘制单糖总量各因素交互作用图见图14。



a: 提取时间与提取温度对单糖总量的交互作用图



b: 提取时间与料液比对单糖总量的交互作用图

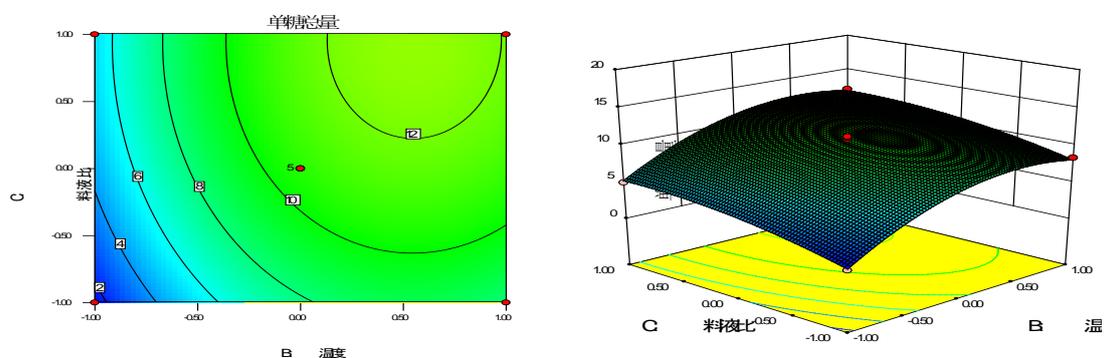


图14 提取时间、提取温度、料液比对单糖总量各因素间交互作用图

c: 提取温度与料液比对单糖总量的交互作用图

图14中，提取时间与提取温度、提取物时间与料液比对单糖总量的影响曲线较陡，说明其影响作用较为显著，提取温度与料液比的影响曲线较为平滑，说明影响不显著，因素间的相互作用影响不显著。

通过响应面试验得到最佳提取条件为提取时间 4.94 h、提取温度 92.2 °C、液料比1: 58.8 (g/mL)。为了验证工艺参数的可靠性，结合实际操作方便性，将试验工艺参数调整为提取时间5 h、提取温度 92 °C、液料比1: 59 (g/mL)，采取3组试验进行验证，多糖提取率19.15%，与预测结果相近，误差为0.52%，说明建立的模拟回归方程具有良好的预测性，其优选出的最佳提取工艺重复性良好。

2.6.4 水解条件优化

目的: 通过对多糖水解的各因素考察，确定最佳的酸水解条件。

实验方法: 采用酸水解方法，通过单因素试验，考察三氟乙酸浓度、料液比、水解温度、水解时间对多糖水解的影响，以三氟乙酸浓度、料液比、水解温度、水解时间四

个因素为响应因子建立正交实验，单糖总量为衡量指标，确定最佳水解条件。

2.6.4.1 单因素实验

2.6.4.1.1 提取溶剂考察

目的：确定最佳的酸溶剂

实验方法：准取吸取0.5 mL银耳多糖溶液于水解管中，加入0.5 mL不同的酸溶液（1 mol/L TFA、1 mol/L 硫酸、1 mol/L 盐酸、1 mol/L 醋酸），在110℃条件下反应2 h，反应结束后，冷却至室温，加入1 mL 甲醇氮吹，用超纯水溶解，稀释至适宜浓度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。结果见图15。

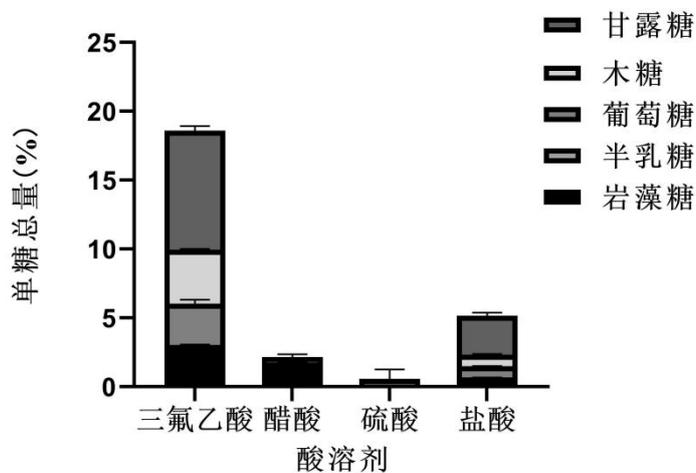


图15 不同酸溶剂对单糖总量的影响

实验结果：选取三氟乙酸、醋酸、硫酸、盐酸对多糖进行酸水解，其中三氟乙酸具有更易挥发的特性。图15表明，使用三氟乙酸进行酸水解，总量为18.79%，是酸溶剂中单糖组成最多，且单糖总量最高，因此，选择三氟乙酸为酸水解最佳溶剂。

2.6.4.1.2 三氟乙酸（TFA）浓度考察

目的：确定最佳的TFA浓度

实验方法：准取吸取0.5 mL银耳多糖溶液于水解管中，分别加入0.5、1、2、3、4 mol/L的TFA溶液0.5 mL，于110℃条件下水解2 h，反应结束后，冷却至室温，加入1 mL 甲醇氮吹，用超纯水溶解，稀释至适宜浓度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。如图16所示。

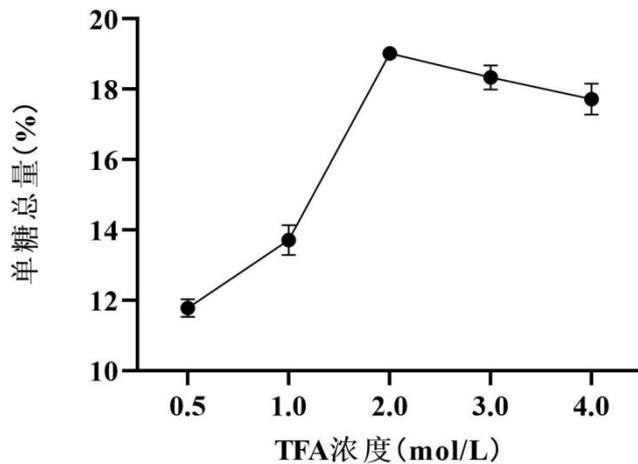


图16 TFA浓度对单糖总量的影响

实验结果：由图16可知，当TFA的浓度逐渐增加时，单糖总量也随之升高。当浓度超过2 mol/L，单糖总量出现了平缓下降情况。TFA浓度过低，多糖水解不完全，只能水解出少量的单糖，TFA浓度增加会使银耳多糖水解更完全，使其含量增加，但TFA浓度超过2 mol/L后部分单糖开始分解，以至于单糖总量有所下降。故选择2 mol/L为TFA最佳浓度。

2.6.4.1.3 TFA用量考察

目的：确定最佳的TFA用量

实验方法：准取吸取0.5 mL银耳多糖溶液于水解管中，分别加入0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL的2 mol/L TFA溶液，于110℃条件下水解2 h，反应结束后，冷却至室温，加入1mL甲醇氮吹，用超纯水溶解，稀释至适宜浓度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。如图17所示。

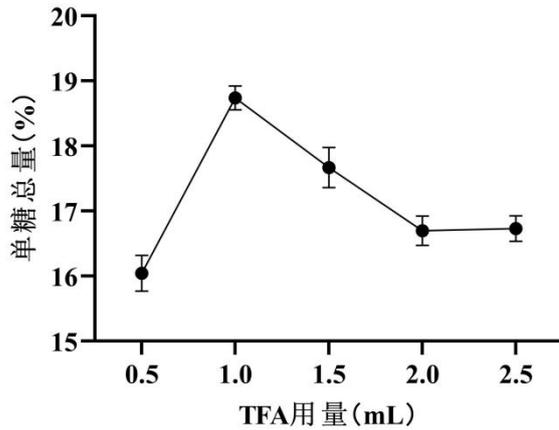


图17 TFA用量对单糖总量的影响

实验结果：由图17可知，当TFA用量为0.5~1.0 mL时，单糖总量随之升高。之后单糖总量出现了降趋势。这是TFA用量过低时，多糖水解还不够完全；用量过高时，水解产生的单糖又会发生过度水解，导致含量急剧减少。因此故选择TFA用量为1 mL为最佳。

2.6.4.1.4 水解温度考察

目的：确定最佳的水解温度

实验方法：准确称取银耳多糖样品适量，用超纯水溶解定容至10 mg/mL的银耳多糖溶液。取0.5 mL多糖溶液于螺纹管中，加入2 mol/L TFA溶液1.0 mL，分别于90、100、110、120、130 °C条件下水解2 h，反应结束后，冷却至室温，加入1mL甲醇氮吹，用超纯水溶解，稀释至适宜浓度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。如图18所示。

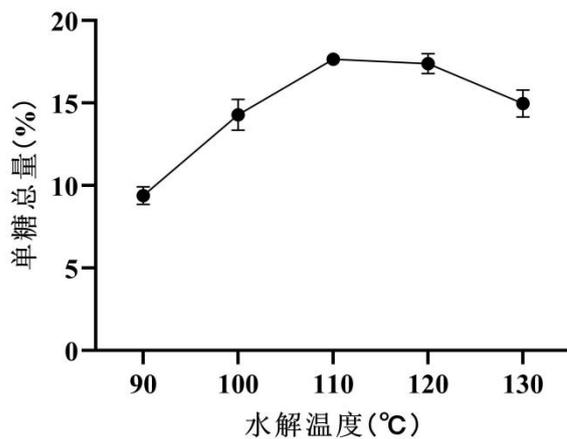


图18 水解温度对单糖总量的影响

实验结果：由图18表明，随着温度的升高，水解产生单糖含量出现先增加后减少的趋势，110 °C条件下单糖总量最高。这是因为温度较低导致多糖水解反应不充分，而温

度较高会使多糖碳化，出现分解不利于水解反应。因此，选择110 °C为最佳水解温度。

2.6.4.1.5 水解时间考察

目的：确定最佳的水解时间

实验方法：准确称取银耳多糖样品适量，用超纯水溶解定容至10 mg/mL的银耳多糖溶液。取0.5 mL多糖溶液于螺线管中，加入2 mol/LTFA溶液1.0 mL，分别于110 °C条件下水解0.5、1、2、3、4 h，反应结束后，冷却至室温，加入1mL甲醇氮吹，用超纯水溶解，稀释至适宜浓度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。如图19所示。

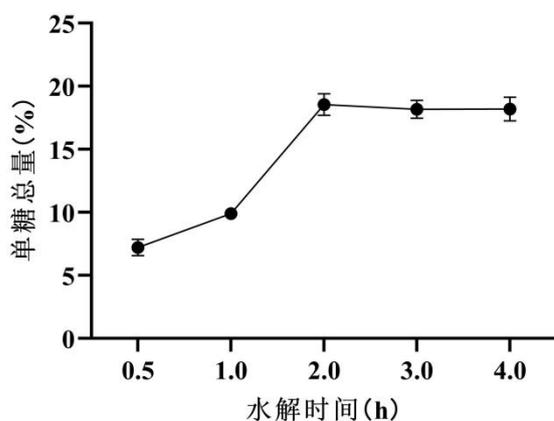


图19 水解时间对单糖总量的影响

实验结果：由图19表明，随着时间的增加，单糖含量出现逐渐增加情况，当水解时间为2 h时，单糖总量最高，之后不再增加，单糖总量较平缓。可能是由于时间过短时，多糖还未完全水解，之后时间逐渐延长，多糖的水解成单糖程度更完全。因此，选择2 h为最佳水解时间。

2.6.4.1.6 氮吹次数考察

目的：确定最佳的氮吹次数

实验方法：准确称取银耳多糖样品适量，用超纯水溶解定容至10 mg/mL的银耳多糖溶液。取0.5 mL多糖溶液于螺线管中，加入2 mol/LTFA溶液1.0 mL，于110 °C条件下水解2 h，反应结束后，冷却至室温，加入1mL甲醇氮吹分别氮吹1、2、3次，用超纯水溶解，稀释至适宜浓度，采用离子色谱分析，以单糖总量为衡量指标。如图20所示。

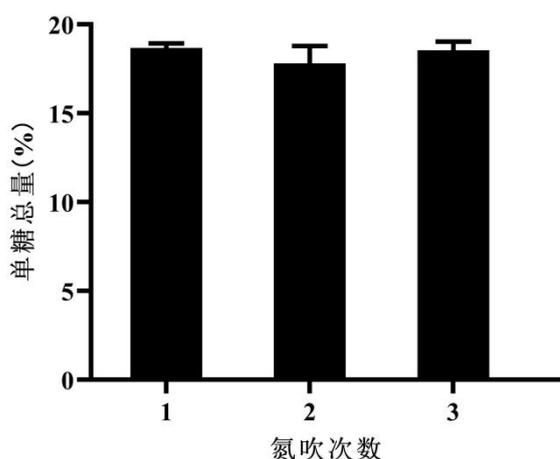


图20 氮吹次数对单糖总量的影响

实验结果: 由图20可知, 单糖含量随氮吹次数增加没有明显变化。因此, 出于时间成本考虑, 确定氮吹次数为1次。

2.6.4.2 多糖水解正交试验设计

目的: 为了确定最佳的提取条件

实验方法: 在单因素实验结果基础上, 选取TFA浓度(A)、TFA用量(B)、水解温度(C)、水解时间(D)为四个实验因素, 每个因素选取3个水平, 以单糖总量为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 试验因素水平见表5。

表5 多糖水解提取因素水平表

水平	因素			
	A/(mol/L)	B/mL	C/°C	D/h
1	1.0	0.5	100	1.0
2	2.0	1.0	110	2.0
3	3.0	1.5	120	3.0

按照正交试验设计进行实验, 得到正交试验结果及分析(见表6)。

表6 正交试验结果及分析

实验号	A	B	C	D	单糖总量/%
1	1	1	1	1	6.87
2	1	2	2	2	16.04
3	1	3	3	3	18.26

4	2	1	2	3	19.21
5	2	2	3	1	17.66
6	2	3	1	2	14.02
7	3	1	3	2	16.43
8	3	2	1	3	16.64
9	3	3	2	1	15.89
K1	13.723	14.170	12.510	13.473	
K2	16.963	16.780	17.047	15.497	
K3	16.320	16.057	17.450	18.037	
R	3.240	2.610	4.940	4.564	

实验结果：从正交实验结果分析表中可以看出，各因素对单糖总量影响的顺序依次为C>D>A>B，即水解温度对单糖总量的影响最大，水解时间和TFA浓度的影响次之，TFA用量的影响最小。本实验的最佳组合为A₂B₁C₂D₃，即TFA浓度为2 mol/L、TFA用量0.5 mL、水解温度110 °C、水解时间3 h。对最佳组合实验进行验证，在此条件下，平均单糖总量为19.18%。

2.6.4.3 提取溶液的稳定性

目的：考察提取溶液的稳定性

实验方法：将酸水解得到的银耳提取液放置于室温，分别于0、2、4、6、8、16、24 h 取样测定。结果见表7。

表7 样品室温放置24 h的稳定性结果

时间/h	单糖总量 /%	RSD/%
0	18.11	
2	18.74	
4	18.74	2.44
6	19.17	

8	19.08
16	18.86
24	17.98

实验结果：本标准规定样品溶液在室温下放置24 h，结果表明银耳提取液在24 h内基本保持稳定。

2.6.4.4 提取溶液的精密度

目的：考察提取溶液的精密度

实验方法：将酸水解得到的银耳提取液作为供试品溶液，连续进样6次，记录岩藻糖(Fuc)、半乳糖(Gal)、葡萄糖(Glc)、木糖(Xyl)、甘露糖(Man)各单糖峰面积，结果见表8。

表8 样品中单糖的精密度结果

名称	峰面积						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
Fuc	6.86	7.10	7.06	7.16	7.21	7.21	1.88
Gal	0.58	0.60	0.60	0.59	0.61	0.61	2.31
Glc	7.07	7.38	7.51	7.39	7.60	7.58	2.61
Xyl	15.85	16.34	16.50	16.22	16.67	16.20	1.73
Man	17.70	17.97	18.07	17.63	18.18	17.72	1.27

实验结果：通过测定银耳水解液中的各单糖的峰面积，结果可看出岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖的峰面积RSD分别为1.88、2.31、2.61、1.73、1.27%，精密度良好。

3 方法检出限和定量限的确定

目的：为了确定方法的检出限和定量限。

实验方法：按照上述确定的最佳水解条件提取后的溶液，作为供试品溶液。将供试品溶液稀释成不同浓度级别的溶液分别进样，当检测获得的各单糖的主峰信号为检测器

噪音水平的3倍时，得其检出限；同样用储备液稀释成不同浓度级别的溶液分别进样，各单糖的主峰信号为检测器噪音水平的10倍时，得其定量限。

实验结果：经测定，各单糖的检测限定量限结果见表9。

表9 样品的检出限定量限结果

名称	浓度/($\mu\text{g/g}$)	
	S/N=3	S/N=10
Fuc	0.02	0.08
Gal	0.04	0.10
Glc	0.05	0.07
Xyl	0.04	0.13
Man	0.15	0.49

4 工作曲线的拟合方式的确定

目的：为了使实验结果更可信和准确。

实验方法：取岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖配制成一系列的混合标准溶液，摇匀，作为标准曲线溶液。进样量10 μL ，按照色谱条件进样分析，以混合标准溶液的浓度 X ($\mu\text{g/mL}$)为横坐标，各色谱峰的峰面积积分值Y (mAU)为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表10。

表10 各单糖线性方程

名称	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	R^2
Fuc	0.5~20.0	$Y=0.5734X+0.1814$	0.9994
Gal	0.25~10.0	$Y=0.7209X+0.0957$	0.9992
Glc	0.5~20.0	$Y=0.9905X+0.6326$	0.9982
Xyl	0.5~20.0	$Y=0.8461X+0.1493$	0.9997
Man	5.0~80.0	$Y=0.3041X+1.2188$	0.9990

5 回收率试验

目的：为了考察方法的准确性。

实验方法：吸取银耳多糖溶液，分别根据其各单糖含量水平，按照低、中、高浓度分别加入单糖标准样品，每个浓度平行三份，然后按照酸水解方法进行实验，经色谱进

样分析，其回收率结果见表11~15。

表11 岩藻糖加样回收率测定结果

组别	加入量/ μg	检测量/ μg	回收率/%	回收率 均值/%	RSD/%	
	1	96.01	283.35	95.10		
低	2	96.01	280.93	92.59	93.78	1.35
	3	96.01	281.97	93.66		
	1	192.01	366.84	91.03		
中	2	192.01	367.26	91.25	92.25	2.08
	3	192.01	373.43	94.47		
	1	288.02	478.88	99.59		
高	2	288.02	482.35	100.80	99.89	0.81
	3	288.02	477.95	99.27		

表12 半乳糖加样回收率测定结果

组别	加入量/ μg	检测量/ μg	回收率/%	回收率 均值/%	RSD/%	
	1	5.14	16.01	93.86		
低	2	5.14	15.78	89.50	91.66	2.38
	3	5.14	15.89	91.62		
	1	10.28	21.34	98.84		
中	2	10.28	21.13	96.81	96.98	1.84
	3	10.28	20.98	95.28		

	1	15.42	25.74	94.44		
高	2	15.42	25.93	95.67	94.35	1.45
	3	15.42	25.51	92.94		

表13 葡萄糖加样回收率测定结果

组别		加入量/ μg	检测量/ μg	回收率/%	回收率 均值/%	RSD/%
	1	96.00	287.25	99.50		
低	2	96.00	285.88	98.07	98.58	0.81
	3	96.00	285.98	98.17		
	1	192.00	390.19	103.36		
中	2	192.00	378.92	97.50	100.46	2.92
	3	192.00	384.73	100.52		
	1	301.00	484.60	97.30		
高	2	301.00	499.49	102.24	99.82	2.48
	3	301.00	492.44	99.90		

表14 木糖加样回收率测定结果

组别		加入量/ μg	检测量/ μg	回收率/%	回收率 均值/%	RSD/%
	1	122.08	363.19	100.63		
低	2	122.08	362.70	100.23	100.16	0.52
	3	122.08	361.93	99.61		

	1	244.17	473.98	95.70		
中	2	244.17	464.31	91.73	94.42	2.47
	3	244.17	474.31	95.83		
	1	378.00	617.35	99.74		
高	2	378.00	625.26	101.83	101.05	1.13
	3	378.00	624.28	101.57		

表15 甘露糖加样回收率测定结果

组别		加入量/ μg	检测量/ μg	回收率/%	回收率 均值/%	RSD/%
	1	310.20	865.42	100.61		
低	2	310.20	862.12	99.54	100.53	0.96
	3	310.20	868.03	101.45		
	1	602.40	1120.24	94.11		
中	2	602.40	1116.54	93.49	93.09	1.27
	3	602.40	1105.56	91.67		
	1	903.60	1375.38	90.98		
高	2	903.60	1349.88	88.15	89.13	1.60
	3	903.60	1350.88	88.26		

实验结果: 经测定, 银耳多糖中岩藻糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖的加样回收率良好。结果表明, 本法重复性、回收率良好。

6 质量控制

本标准与国内硫酸-苯酚法及衍生化方法进行液相测定的优点

标准检测方法均是苯酚硫酸法及衍生化方法进行液相测定测定多糖含量，苯酚硫酸法测定方法较为普遍，但结果准确性、重现性较不稳定，操作方法繁琐；衍生化方法所需试剂及操作流程也较为繁琐，并没有很大程度上节省时间，两者使用试剂较为危险、有异味，对环境及操作人员都有影响。本标准采用对银耳多糖样品进行水解，运用离子色谱法可准确地测定单糖的组成和含量，以弥补现有方法带来检测的不足及繁琐的实验流程，通过离子色谱分析技术解析银耳多糖中单糖组成，此方法稳定性、重复性好，且检测方法简便、可自动批量检测。

五、主要试验(或验证)的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果。

1 主要试验的分析、综述和论证

本标准的编制，可以使银耳中银耳多糖含量测定的方法规范化，能够准确地测定银耳中银耳多糖含量，使其更好地应用于生活和生产中，促进银耳产业的发展。

2 预期的经济效果

本标准规范银耳多糖中单糖组成及含量的检测方法，提供银耳多糖中单糖组成测定的统一标准方法——离子色谱法，可对银耳多糖进行有效的定性鉴别及定量测定。

六、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况。

目前尚未发现国外有与本项目相关的检测标准。

七、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系。

标准符合现行有关法律、法规和强制性标准。

八、重大分歧意见的处理经过和依据。

无

九、标准作为强制性或推荐性国家（或行业）标准的建议。

作为推荐性国家标准。

十、贯彻该标准的要求和措施建议(包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容)。

本文件是关于银耳多糖中单糖组成及含量的检测方法标准，它的制定与颁布将为银耳多糖中单糖组成测定提供统一标准检测方法，建议该标准作为食品与药品行业的推荐性标准，并在今后的工作中贯彻实施。

十一、废止现行有关标准的建议。

无

十二、其他应予说明的事项。

本标准制定过程中参考了以下相关标准和文献：

- [1] GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》
- [2] GB/T 20001.4-2015 《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》
- [3] T/SFABA3-2018 《银耳多糖产品中多糖含量的测定》
- [4] T/SFABA4-2018 《银耳多糖》
- [5] T/FJCA 002-2024 《银耳多糖》
- [6] 马素云, 姚丽芬, 叶长文, 等. 1种银耳多糖的分离纯化及结构分析 [J]. 中国食品学报, 2013, 13 (01): 172-177.
- [7] 吴振亚. 银耳多糖的提取纯化、理化性质及抗氧化活性研究[D]. 四川农业大学, 2015.
- [8] 张先廷. 银耳多糖的提取及抗氧化性研究[J]. 辽宁化工, 2015, 44 (09): 1158-1159+1162.
- [9] 徐文清. 银耳孢子多糖结构表征、生物活性及抗肿瘤作用机制研究[D]. 天津大学, 2006.
- [10] 谢昊霖. 银耳多糖不同途径给药对环磷酰胺抗肿瘤的减毒增效作用研究[D]. 吉林大学, 2012.
- [11] HAN C K, CHIANG H C, LIN C Y, et al. Comparison of immunomodulatory and anticancer activities in different strains of *Tremella fuciformis* Berk [J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2015, 43 (8): 1637-1655
- [12] CHO E J, HWANG H J, KIM S W, et al. Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in obese mice [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75 (6): 1257-1265.
- [13] ZHANG S, XU X L, CAO X, et al. The structural characteristics of dietary fibers from *Tremella fuciformis* and their hypolipidemic effects in mice [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2023, 12 (2): 503-511
- [14] 沈洁, 周尹文辉, 梁增澜, 张睿, 等. 银耳多糖分离提取工艺的优化研究 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41 (09): 93-97.

[15] 光明,于璐. 离子色谱-脉冲安培检测法测定原桃胶中的多糖含量 [J]. 食品工业科技, 2016, 37 (05): 298-301+307.

[16] 安玲艳. 银耳多糖的提取优化、体外模拟消化特性及酵解规律研究[D]. 成都大学, 2022.