

附件 6:

ICS 号 67.050

中国标准文献分类号 X83

团 体 标 准

T/GDBIHQDA XXXX-2024

灵芝及灵芝提取物中 β -葡聚糖的测定

(Determination of β -glucan in *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma lucidum* extracts)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

广东省生物医药产业高质量发展协会 发布

前 言

本文件按照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》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省生物医药产业高质量发展协会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

灵芝及灵芝提取物中 β -葡聚糖的测定

1 范围

本文件规定了灵芝及灵芝提取物相关产品中 β -葡聚糖的分光光度法检测方法。
本文件适用于灵芝实体，灵芝孢子粉和灵芝提取物中 β -葡聚糖的测定。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 β -葡聚糖 β -glucan

以 β -葡聚糖为主链，可溶于水的一系列高分子化合物。

4 原理

灵芝子实体，灵芝孢子粉和灵芝提取物中 β -葡聚糖和 α -葡聚糖经水提取，使用 α -淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶（糖化淀粉酶）酶解 α -葡聚糖成单糖和寡糖；使用纤维素酶酶解纤维素成单糖和寡糖；使用蛋白酶酶解蛋白质成氨基酸；乙醇沉淀 β -葡聚糖，单糖、寡糖和氨基酸溶于乙醇被除去； β -葡聚糖经水溶解，在硫酸的作用下，先水解成单糖，并迅速脱水形成糖醛化合物，与苯酚形成黄色化合物，在485 nm下具有特征吸收，与标准系列比较定量。

5 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T6682规定的三级水。

5.1 试剂

5.1.1 硫酸（ H_2SO_4 ）， $\rho=1.84\text{ g/mL}$ 。

5.1.2 无水乙醇（ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ）。

5.1.3 苯酚（ $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ）。

5.1.4 盐酸（ HCl ）。

5.1.5 β -葡聚糖对照品。

5.1.6 α -淀粉酶（CAS:9000-85-5，20000 - 60000 U/mL）。

5.1.7 纤维素酶（CAS:9012-54-8， $\geq 45\text{ U/mg}$ ）。

5.1.8 蛋白酶（CAS:9014-01-1， $\geq 200\text{ U/mg}$ ）。

5.1.9 淀粉葡萄糖苷酶（CAS:9032-08-0， $\geq 10\text{ 万 U/mL}$ ）。

5.1.10 盐酸溶液（0.2 mol/L）：取 18.00 mL 盐酸在搅拌状态下缓慢加入到 800 mL 水中，混匀，冷却后用水稀释至 1000 mL，即得。

5.1.11 氢氧化钠溶液（0.2 mol/L）：取 8.00 g 氢氧化钠在搅拌状态下缓慢加入到 800 mL 水中，混匀，冷却后用水稀释至 1000 mL，即得。

5.1.12 β-葡聚糖对照品溶液制备：精密称取β-葡聚糖对照品 10 mg，加水溶解并定容至 100 ml，混匀，即得 0.1 mg/mL 的β-葡聚糖对照品溶液。

5.1.13 苯酚溶液（50 g/L）：称取苯酚 5.0 g，加水溶解并定容至 100 ml，混匀，即得。

6 仪器与设备

6.1 紫外分光光度计。

6.2 分析天平：感量为 0.0001 g 和 0.01 g。

6.3 电热恒温水浴锅。

6.4 冰箱。

6.5 离心机：转速不低于 4000 r/min。

6.6 漩涡混合振荡器。

7 分析步骤

7.1 样品前处理

取样品约0.5 g放入锥形瓶或50 mL离心管中，加入10 mL水，将样品涡旋至完全溶解，用0.2 mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液至pH6.9，加入0.1 mL淀粉酶，并在20 ℃恒温水浴振荡2小时酶解。用0.2 mol/L 盐酸溶液将溶液的 pH值调至5.0加入 10 mg纤维素酶，并在37 ℃恒温水浴酶解2小时。用0.2 mol/L 氢氧化钠将溶液的pH 值调至7.5，向溶液中加入约50 mg 的蛋白酶，并在37 ℃恒温水浴振荡2小时酶解。用0.2 mol/L 盐酸溶液调节pH至4.8，将约 0.1 mL的淀粉葡萄糖苷酶添加到溶液，并在 60 ℃恒温水浴中振摇2小时酶解。酶解液转移并用水洗涤干净至50 mL容量瓶，用水定容至刻度。将溶液转移至50 mL离心管，将溶液离心（3000 rpm，10 min），取上清液5 mL于50 mL离心管，加入20 mL 无水乙醇，摇匀（多管式涡旋振荡器，转速：约2000 rpm，10 min），放置4 ℃沉淀过夜（8 h以上）。将溶液离心（3000 rpm，20 min），弃上清液。向沉淀中加入25 mL80%乙醇样品，并在4 ℃下沉淀1小时。将溶液离心（3000 rpm，20 min）。离心后弃去上清液，沉淀加水溶解，转移至100 mL容量瓶中，加水至刻度，摇匀，即得。

7.2 标准工作曲线的绘制

精密量取β-葡聚糖对照品溶液0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL分别置于25 mL具塞比色管中，准确补充水至1.0 mL，加入50 g/L苯酚溶液1.0 mL，混匀；继续加入浓硫酸5.0 mL后小心混匀，置沸水浴中煮沸15 min取出，置冰浴中冷却5min，用分光光度计在485 nm波长处以试剂空白溶液为参比，1 cm比色皿中测定吸光度值，以β-葡聚糖质量(μg)为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

7.3 试样的测定

准确量取供试品溶液1 mL，置25 mL具塞比色管中，照标准工作曲线绘制项下的方法，自“加入 50 g/L苯酚溶液1.0 mL”起，同法操作，测定吸光度值，从标准曲线上读出供试品溶液中β-葡聚糖的质量，计算即得。

8 结果计算

$$X = \frac{C \times V_1 \times V_3}{M \times V_2 \times 1000}$$

式中：

- X —— β -葡聚糖的含量，单位为毫克每克（mg/g）；
C ——从标准曲线查得样品的 β -葡聚糖的质量，单位为微克（ μg ）；
M ——样品的取样量，单位为克（g）；
 V_1 ——酶解液转移并用水洗涤干净后定容体积，单位为毫升（mL）；
 V_2 ——取上清液于 50mL 离心管的体积，单位为毫升（mL）；
 V_3 ——醇沉后获得沉淀物用水洗后定容的体积，单位为毫升（mL）；
1000 ——单位换算系数
计算结果保留三位有效数字。

9 精密度

重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的10%。