

暗褐脉柄牛肝菌发酵液多糖的分离纯化与结构表征

Isolation, purification and structure characterization of the polysaccharide from the fermentation broth of *Phlebopus portentosus*

潘章超^{1,2,3}

王 勇^{1,2,3}

吴 莉^{1,2,3}

曾念开^{1,2,3}

PAN Zhangchao^{1,2,3}

WANG Yong^{1,2,3}

WU Li^{1,2,3}

ZENG Niankai^{1,2,3}

(1. 热带转化医学教育部重点实验室, 海南 海口 571199; 2. 海南省热带药用植物研究

开发重点实验室, 海南 海口 571199; 3. 海南医学院药学院, 海南 海口 571199)

(1. Key Laboratory of Tropical Translational Medicine of Ministry of Education, Haikou, Hainan 571199, China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory for Research and Development on Tropical Herbs, Haikou, Hainan 571199, China; 3. School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China)

摘要: [目的] 高效利用暗褐脉柄牛肝菌资源, 开发其多糖功能性食品。 [方法] 取暗褐脉柄牛肝菌菌丝发酵培养, 低温减压浓缩, 乙醇沉淀, DEAE-52 纤维素柱色谱分离纯化, 透析袋透析除去小分子杂质制备多糖。总糖含量采用苯酚—硫酸显色法测定, 液质联用法测定单糖组成, 紫外分光光度法判断是否存在核酸和蛋白等杂质; 通过红外光谱和核磁共振波谱, 对多糖的结构进行分析。 [结果] 制备的多糖总糖含量为 84%, 主要单糖种类有: 葡萄糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖, 其物质的量比为 2.07 : 1.95 : 1.00 : 1.58。红外光谱和核磁共振波谱分析具有多糖吸收峰, 含 α 型吡喃糖。 [结论] 从暗褐脉柄牛肝菌发酵液中制备的多糖主要由 4 种单糖组成, 结构中含 α 型吡喃糖。

关键词: 暗褐脉柄牛肝菌; 发酵液; 多糖; 分离; 纯化; 结构表征

Abstract: [Objective] This study aimed to efficiently utilize the resources of *Phlebopus portentosus* and develop its polysaccharide functional food. [Methods] The mycelium of *P. portentosus* was cultured and fermented, and the combined fermentation broth was concentrated at low a temperature and reduced pressure. Then, precipitated by ethanol, separated, purified by DEAE-52 cellulose column chromatography, and the polysaccharide was

finally refined by dialysis to remove the small molecular impurities. The total sugar content was determined by phenol-sulfuric acid colorimetry, the monosaccharide composition was determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and the impurities such as nucleic acid and protein were detected by ultraviolet spectrophotometer. The structure of polysaccharides was analyzed preliminarily by infrared spectroscopy (IR) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). [Results] The content of total sugar was 84%. The main monosaccharides of the polysaccharide were glucose, mannose, galactose, and arabinose, the molar ratio of which was 2.07 : 1.95 : 1.00 : 1.58. Obvious polysaccharide absorption peaks were shown in the infrared spectrum and nuclear magnetic resonance spectra, through which an α -type pyranose can be inferred in the polysaccharide. [Conclusion] The polysaccharides prepared from the fermentation broth of *P. portentosus* were mainly composed of four monosaccharides, the structure of which contained α -pyranose.

Keywords: *Phlebopus portentosus*; fermentation broth; polysaccharide; separation; purification; structural characterization

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目 (编号: 820RC623)

作者简介: 潘章超, 男, 海南医学院在读硕士研究生。

通信作者: 王勇 (1982—), 男, 海南医学院研究员, 硕士。

E-mail: wangyong1982_2004@163.com

收稿日期: 2023-10-30 **改回日期:** 2024-03-14

暗褐脉柄牛肝菌 [*Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn] 是牛肝菌目 (Boletales) 成员之一, 隶属于小牛肝菌科 (Boletinellaceae) 脉柄牛肝菌属^[1]。因该种的菌盖表面常呈黑褐色, 故在云南西双版纳等地称之为“黑牛肝菌”^[2], 又名暗褐网柄牛肝菌、异样脉柄牛肝菌^[3], 是世界上第一个实现人工栽培的牛肝菌^[4]。其物种资源丰富, 主要分布于热带和亚热带地区^[5]。在中国

的海南、云南的热带地区、贵州、广西等省区也均有分布^[6]。现代研究表明,暗褐脉柄牛肝菌含有丰富的营养成分(糖、脂肪、蛋白、纤维、氨基酸和矿物质元素等)^[7]以及多种药用活性成分(生物碱^[8]、酚类^[9]、黑色素^[10]、挥发油^[11]、核苷和甾醇^[12]等),具有急性肝损伤保护作用、抗氧化、抗高血糖症(α -葡萄糖苷酶抑制剂)、抗高血压、神经细胞保护、抗菌、抗肿瘤等活性,是一种极具研究和开发价值的食药两用真菌^[13-14]。

多糖存在于真菌子实体、菌丝体及其发酵液中,具有抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、降糖降脂和提高免疫力等多种生物活性。Kamchattat 等^[14]利用水提醇沉法得到的多糖蛋白质复合物(PPC-P11)具有很强的抗氧化活性,此外,对 5 种人类细胞系也有相对较强的体外抗增殖作用,可能具有较好的抗肿瘤活性。Kaewnarin 等^[13]发现通过水提醇沉法和回流法提取得到的暗褐脉柄牛肝菌粗多糖同样具有一定的抗氧化活性,并且可以抑制 α -葡萄糖苷酶,具有一定的降血糖活性,还可以抑制血管紧张素转换酶,可能具有抗高血压的活性。目前,国内外学者主要集中于暗褐脉柄牛肝菌子实体多糖的研究,而对其菌丝体发酵液中多糖研究较少。与子实体相比,菌丝体生长期短,更具有开发优势。研究拟从暗褐脉柄牛肝菌菌丝体发酵液中分离、纯化多糖,并对其初级结构进行表征,比较其与子实体多糖组成差异,以期为高效利用暗褐脉柄牛肝菌资源及开发多糖功能性食品提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

暗褐脉柄牛肝菌新鲜发酵液:从暗褐脉柄牛肝菌菌丝发酵制备,实验室自制;

透析袋 MD34:截留相对分子质量 3 500,北京索莱宝科技有限公司;

DEAE-52 纤维素:浙江联硕生物科技有限公司;

氯化钠、乙醇、无水乙醇、硫酸、苯酚、磷酸、三氟乙酸:分析纯,西陇科学股份有限公司;

重水(D₂O):上海麦克林生化科技有限公司;

葡萄糖、氢氧化钠:优级纯,上海阿拉丁化学试剂公司。

1.2 主要仪器与设备

全自动部分收集器: CBS-A 型,上海沪西分析仪器有限公司;

旋转蒸发器: N-1300S-WB 型,日本东京理化器械株式会社;

冷冻真空干燥机: Benchtop 6.0KEL 型,美国 Virtis 公司;

紫外可见分光光度计: 新世纪 T6 型,北京普析通用仪器有限责任公司;

紫外可见分光光度计: V650 型,日本 JASCO 公司;

核磁共振谱仪: JNM-ECZ400S/L1 型,日本电子株式会社;

超高效液相色谱—质谱联用仪(UPLC-MS/MS): Xevo G3 Qtof 型,沃特世科技上海有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵液多糖的提取 在无菌条件下,用直径为 10 mm 的打孔器,在暗褐脉柄牛肝菌菌丝的培养皿上打孔,镊子夹取两片菌丝接种于盛有 100 mL 发酵培养基的三角瓶中,28 ℃,150 r/min 恒温培养 6 d,取出后滤去菌丝,合并发酵液后进行浓缩(60 ℃,60 r/min)。量取暗褐脉柄牛肝菌发酵液(6 L),低温减压浓缩(60 ℃,60 r/min),离心(4 000 r/min,15 min)合并上清液,边搅拌边缓慢地加入 4 倍体积乙醇,4 ℃冰箱沉淀 24 h。醇沉后进行离心处理,离心乙醇沉淀后,上清液合并装入烧杯中,置旋转蒸发器中浓缩,回收乙醇;醇沉离心后沉淀放入冷冻真空干燥机,冷冻干燥 24 h(-68 ℃,0.35 Pa),得到暗褐脉柄牛肝菌粗多糖。

1.3.2 多糖的分离纯化 将预处理后的 DEAE-52 纤维素湿法装柱,用去离子水平衡 12 h。称取 0.5 g 暗褐脉柄牛肝菌发酵液粗多糖,加水溶解,离心(12 000 r/min,3 min),取上清液,上样。分别用蒸馏水、NaCl 溶液(0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mol/L)洗脱,控制洗脱速度,设定自动收集装置每 9.5 min 收集一次,9 mL/管,用苯酚—硫酸法检测。将各级洗脱液浓缩至 10~20 mL^[15],透析、冷冻干燥 24 h(-68 ℃,0.35 Pa),即得暗褐脉柄牛肝菌精制多糖。

1.3.3 总糖含量测定 采用苯酚—硫酸法^[16]。

(1) 葡萄糖标准曲线绘制:称取 10 mg 干燥至恒重的葡萄糖标准品,少量蒸馏水溶解后,定容至 100 mL,配成 0.1 mg/mL 的标准葡萄糖溶液。吸取 0.1,0.2,0.4,0.5,0.7,0.8,1.0 mL 的标准溶液于比色管中,补水至 2 mL,再加 1.0 mL 5% 苯酚,迅速加入 5 mL 浓硫酸,摇晃均匀,在沸水浴中煮沸 15 min,取出后放入冰水中冷却至室温,以相同处理的蒸馏水为空白,在 490 nm 下测定吸光度值,以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

(2) 多糖含量测定:取醇沉干燥物 10 mg,配成 0.1 mg/mL 的多糖样品溶液,同上述方法测定样品中总糖含量。

1.3.4 单糖组成分析 参考文献^[16]。

1.3.5 紫外光谱分析 参考文献^[17],将暗褐脉柄牛肝菌发酵液粗多糖配成 1 mg/mL 的水溶液,在 200~400 nm 范围内扫描。

1.3.6 红外光谱分析 参考文献^[18],取暗褐脉柄牛肝菌粗多糖 2 mg 与 200 mg 的 KBr 混合,压片,在 4 000~400 cm⁻¹测定红外吸收光谱。

1.3.7 核磁共振波谱分析 参考文献[19]。

1.4 数据统计分析

试验结果采用 Microsoft Office Excel 2021 软件进行数据处理,采用 Origin 2021、MestRe Nova 软件进行数据分析并作图。

2 结果与分析

2.1 多糖的提取

暗褐脉柄牛肝菌发酵液通过水提醇沉法得到粗多糖 0.32 g/L,低于子实体多糖的提取率。秦如冰等^[3]通过响应面法优化了暗褐脉柄牛肝菌粗多糖的提取工艺,最终提取条件为温度 79 ℃,时间 78 min,液料比 20 : 1 (mL/g),多糖提取率为 15.95%。因此,在后续也可对发酵培养条件进一步优化,以期提高发酵液中多糖的提取率。

2.2 多糖的分离纯化

暗褐脉柄牛肝菌发酵液多糖洗脱曲线如图 1 所示。粗多糖经过 DEAE-52 纤维素柱色谱后,得到 3 个明显的洗脱峰,含量各有不同。其中,蒸馏水洗脱峰面积最大,

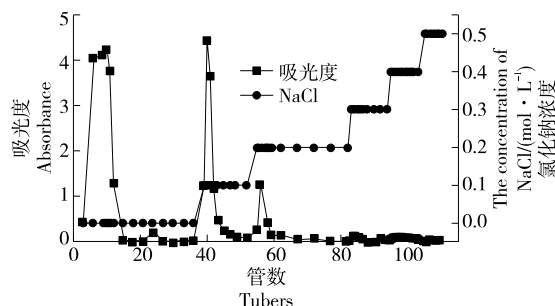
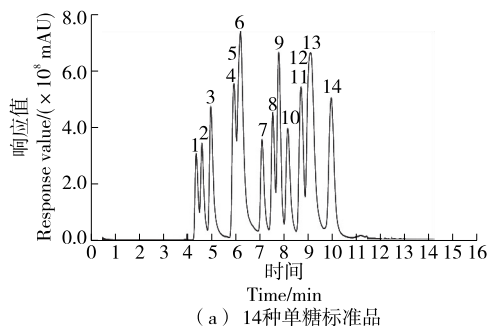
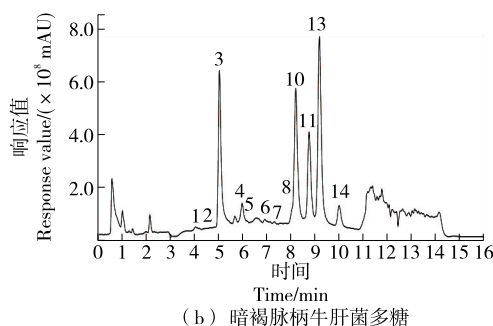


图 1 暗褐脉柄牛肝菌多糖的 DEAE-52 纤维素色谱洗脱曲线

Figure 1 Elution curve of polysaccharide from *P. portentosus* by DEAE-52 cellulose column chromatography



(a) 14种单糖标准品



(b) 暗褐脉柄牛肝菌多糖

1. L-古洛糖醛酸 2. D-甘露糖醛酸 3. D-甘露糖 4. D-核糖 5. L-鼠李糖 6. D-氨基半乳糖 7. D-葡萄糖醛酸 8. D-半乳糖醛酸 9. D-氨基葡萄糖 10. D-葡萄糖 11. D-半乳糖 12. D-木糖 13. L-阿拉伯糖 14. L-岩藻糖

图 2 14 种单糖标准品及暗褐脉柄牛肝菌多糖的超高效液相色谱—质谱联用色谱图

Figure 2 UPLC-MS/MS chromatograms of 14 monosaccharide standards and polysaccharide of *P. portentosus*

含量相对较多,故将蒸馏水洗脱液进行合并、浓缩、透析和冻干后称得蒸馏水组分多糖 0.107 1 g,用于后续的结构表征。与伍燕等^[20]暗褐网柄牛肝菌精制多糖(AHP)的 DEAE-纤维素离子交换柱色谱洗脱曲线相似,均为水洗脱组分含量最多,但两者含量存在明显不同。

2.3 多糖的总糖含量测定

标准曲线拟合方程为 $Y = 1.8669x + 0.0038$, $R^2 = 0.9991$ 。粗多糖总糖含量为 47.57%;蒸馏水洗脱组分多糖总糖含量为 84%。

2.4 多糖的单糖组成分析

由图 2 和表 1 可知,与 14 种单糖混合对照品进行比对,可以检测到 12 种单糖,表明暗褐脉柄牛肝菌发酵液多糖是一种杂多糖,其中含量较高的 4 种单糖分别为 D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖和 L-阿拉伯糖,其物质的量比为 2.07 : 1.95 : 1.00 : 1.58,以 D-葡萄糖为主,而伍燕等^[20]从暗褐网柄牛肝菌子实体中提取的多糖的单糖组成为半乳糖、甘露糖、岩藻糖、葡萄糖、鼠李糖,物质的量比为 1.72 : 1.54 : 0.96 : 0.25 : 0.07,由此表明暗褐脉柄牛肝菌发酵液多糖与子实体多糖存在显著差异,因此可能会有不同的生物活性,有待进一步研究。

2.5 多糖的紫外光谱分析

暗褐脉柄牛肝菌发酵液多糖的紫外扫描图谱如图 3 所示。暗褐脉柄牛肝菌多糖的紫外扫描曲线较为平滑,在 260,280 nm 处无明显吸收峰,表明暗褐脉柄牛肝菌发酵液多糖不含有杂蛋白、多肽和核酸^[16],说明多糖中大部分蛋白质和核酸已被除去。

2.6 多糖的红外光谱分析

暗褐脉柄牛肝菌发酵液多糖的红外光谱图如图 4 所示。在 3386 cm^{-1} 处出现强而宽的吸收峰,为典型的多糖羟基(O—H)伸缩振动峰; 2928 cm^{-1} 处的吸收峰为多糖 C—H 键的伸缩振动峰; 1641 cm^{-1} 处为 C=O 的伸缩振动峰; 1411 cm^{-1} 处为 C—H 键的弯曲振动,吸收峰

表 1 暗褐脉柄牛肝菌多糖的单糖组成

Table 1 Monosaccharide composition of polysaccharide from *P. portentosus*

样品	摩尔质量/ ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	检测离子 (m/z)	标准品含量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	样品含量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
L-古洛糖醛酸	194.140	525	0.003 0	0.005 6
D-甘露糖醛酸	194.140	525	0.006 0	0.011 1
D-葡萄糖醛酸	194.140	525	0.006 0	0.011 1
D-半乳糖醛酸	194.140	525	0.003 0	0.005 6
D-甘露糖	180.155	511	0.940 0	1.740 7
D-葡萄糖	180.160	511	0.998 0	1.848 1
D-半乳糖	180.160	511	0.482 0	0.892 6
D-氨基半乳糖	215.500	510	0.007 0	0.013 0
L-鼠李糖	164.160	495	0.009 0	0.016 7
L-岩藻糖	164.160	495	0.103 0	0.190 7
D-核糖	150.130	481	0.097 0	0.179 6
L-阿拉伯糖	150.130	481	0.761 0	1.409 3

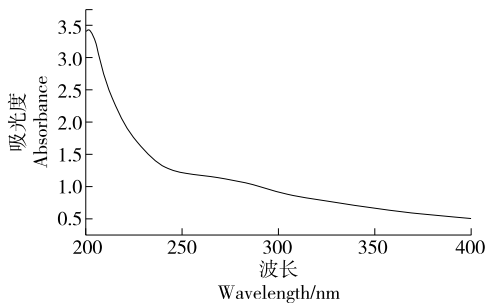


图 3 暗褐脉柄牛肝菌多糖的紫外光谱图
Figure 3 UV spectrum of polysaccharide from *P. portentosus*

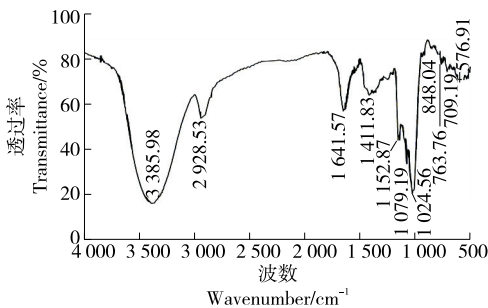


图 4 暗褐脉柄牛肝菌多糖的红外光谱图
Figure 4 Infrared spectrum of polysaccharide from *P. portentosus*

较弱;在 $1\,152, 1\,079, 1\,025\text{ cm}^{-1}$ 3 处吸收峰为多糖骨架 C—O—H 和 C—O—C 键的伸缩振动,表明存在吡喃糖环结构。在 $848, 763\text{ cm}^{-1}$ 处的信号表明多糖中存在 α 构型。在 576 cm^{-1} 处是硫酸酯键的吸收峰,吸收峰微弱,表明多糖含有硫酸基团^[13]。红外光谱数据分析暗褐脉柄牛肝菌发酵液多糖为吡喃糖,糖苷键类型为 α 构型,与伍燕等^[20]对暗褐脉柄牛肝菌多糖 AHP 的分析结果类似。

2.7 多糖的核磁共振波谱分析

利用核磁共振波谱法来鉴定暗褐脉柄牛肝菌多糖的糖苷键构型,其¹H-NMR 和¹³C-NMR 如图 5、图 6 所示。在¹H-NMR 中,多糖的质子信号主要在 $\delta\ 3.40\sim 5.50$,异头质子氢的信号在 $\delta\ 4.3\sim 5.9$,H2~H6 的化学位移出现在 $\delta\ 3.33\sim 4.21$,其中 β -糖苷键构型的异头氢信号主要分布在 $\delta\ 4.4\sim 4.9$, α -糖苷键构型的异头氢信号主要分布在 $\delta\ 4.8\sim 5.5$ 。由图 5 可知,暗褐脉柄牛肝菌多糖的质子信号集中在 $\delta\ 3.37\sim 5.35$,为典型的多糖质子吸收峰。其中异头质子的化学位移为 $\delta\ 4.7\sim 5.5$,表明此多糖主要含 α -糖苷键构型,与伍燕等^[20]研究暗褐网柄牛肝菌子实体多糖的构型相似。非异头氢信号均集中在 $\delta\ 3.2\sim 4.2$ 。 $\delta\ 1.18$ 处弱信号峰是 C-6 位脱氧糖的甲基质子信号峰,可能为组成中含量较少的岩藻糖或鼠李糖的甲基质子信号。以上结果与红外光谱分析结果一致。

在核磁共振碳谱中, $\delta\ 103\sim 106$ 无信号,表明结构中无吡喃糖残基的 β -D 构型, $\delta\ 99.71$ 的信号峰说明其主链的糖苷键类型为吡喃糖残基的 α -D 型; $\delta\ 82\sim 84$ 无明显信号,说明无呋喃糖,在小于 $\delta\ 80$ 处有信号峰,为吡喃糖的 C3 和 C5 的化学位移。 $\delta\ 60.57$ 处有较强的信号峰,说

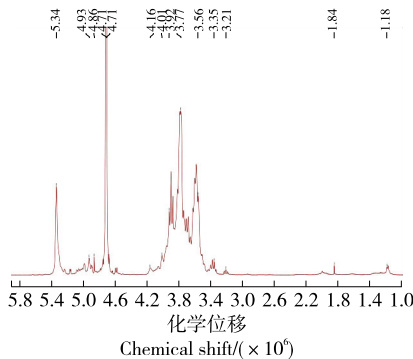


图 5 暗褐脉柄牛肝菌多糖的¹H-NMR
Figure 5 ¹H-NMR of polysaccharide from *P. portentosus*

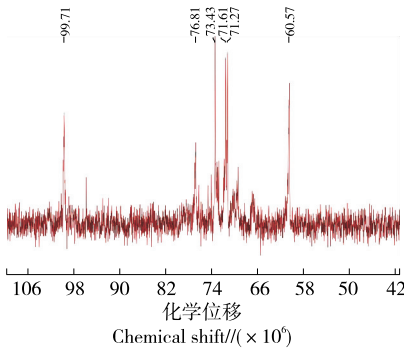


图 6 暗褐脉柄牛肝菌多糖的¹³C-NMR
Figure 6 ¹³C-NMR of polysaccharide from *P. portentosus*

明存在未发生取代的 C6。综合以上结果可知,该多糖只存在一种构型为 α -D 型,由于天然多糖结构复杂,其具体结构还需结合甲基化和二维核磁进一步解析。

3 结论

暗褐脉柄牛肝菌发酵液多糖含有 12 种单糖,是一种杂多糖,含量较高的有 4 种:葡萄糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖,其物质的量比为 2.07 : 1.95 : 1.00 : 1.58。紫外光谱分析不含蛋白质、多肽和核酸。红外光谱和核磁共振波谱数据分析该多糖结构以吡喃糖为主,其糖苷键类型为 α 构型。

研究仅对暗褐脉柄牛肝菌发酵液多糖进行了分离纯化和初级结构表征,其二级分子结构、生物学活性及其作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 曹畅, 纪光燕, 罗顺珍, 等. 暗褐网柄牛肝菌人工驯化研究的回顾与前瞻[J]. 菌物学报, 2021, 40(12): 3 064-3 080.
CAO Y, JI G Y, LUO S Z, et al. Domestication and artificially cultivation of *Phlebopus portentosus*: retrospect and prospect[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(12): 3 064-3 080.
- [2] KUMLA J, DANELL E, BUSSABAN B, et al. Suitable growth conditions and nutrition factors on in vitro culture of *Phlebopus portentosus* (Boletales) [J]. *Chiang Mai Journal of Science*, 2011, 38(1): 156-159.
- [3] 秦如冰, 叶丽, 尹嘉梁, 等. 响应面法优化暗褐脉柄牛肝菌粗多糖提取工艺[J]. 食品工业, 2022, 43(6): 199-203.
QIN R B, YE L, YIN J L, et al. Optimization of extraction process for crude polysaccharide from the fruiting bodies of *Phlebopus portentosus* based on response surface methodology[J]. *The Food Industry*, 2022, 43(6): 199-203.
- [4] CHUANKID B, SCHREY H, THONGBAI B, et al. Secondary metabolites of *Phlebopus* species from northern Thailand [J]. *Mycological Progress*, 2020, 19: 1 525-1 536.
- [5] KUMLA J, HOBBIE ERIK A, SUWANNARACH N, et al. Theectomycorrhizal status of a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, assessed using mycorrhizal synthesis and isotopic analysis[J]. *Mycorrhiza*, 2016, 26: 333-343.
- [6] 胡生华, 朱志钢, 李文佳, 等. 暗褐网柄牛肝菌研究进展[J]. 食用菌, 2018, 40(1): 6-8.
HU S H, ZHU Z G, LI W J, et al. Research progress of *Phlebopus portentosus*[J]. *Edible Fungi*, 2018, 40(1): 6-8.
- [7] ZHANG C X, HE M X, LIU J, et al. Brief introduction to a unique edible bolete: *Phlebopus portentosus* in southern China[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 2017, 7(6): 386-394.
- [8] SUN Z C, HU M G, SUN Z H, et al. Pyrrole alkaloids from the edible mushroom *Phlebopus portentosus* with their bioactive activities[J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1 198.
- [9] KAEWNARIN K, SUWANNARACH N, KUMLA J, et al. Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities [J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 27: 352-364.
- [10] 王振娟, 刘思婕, 王杰. 黑牛肝菌黑色素抗氧化活性和稳定性及染发效果[J]. 食用菌学报, 2023, 30(4): 67-77.
WANG Z J, LIU S J, WANG J. Antioxidant activity, stability and application of melanin obtained from *Phlebopus portentosus* [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2023, 30(4): 67-77.
- [11] TIAN R, LIANG Z Q, WANG Y, et al. Analysis of aromatic components of two edible mushrooms, *Phlebopus portentosus* and *Cantharellus yunnanensis* using HS-SPME/GC-MS[J]. *Results in Chemistry*, 2022, 4: 100282.
- [12] 钱正明, 黄琦, 沈千汇, 等. 暗褐网柄牛肝菌尿苷和麦角甾醇含量测定及指纹图谱分析[J]. 菌物研究, 2019, 17(2): 103-109.
QIAN Z M, HUANG Q, SHEN Q H, et al. Content determination and HPLC fingerprint analysis of uridine and ergosterol in *Phlebopus portentosus* [J]. *Journal of Fungal Research*, 2019, 17(2): 103-109.
- [13] KAEWNARIN K, SUWANNARACH N, KUMLA J, et al. Characterization of polysaccharides from wild edible mushrooms from Thailand and their antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive activities [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2020, 22(3): 221-233.
- [14] KARNCHANATAT A, APHICHART S, SONGCHAN P, et al. Antioxidation and antiproliferation properties of polysaccharide-protein complex extracted from *Phaeoglyphopus portentosus* (Berk. & Broome) McNabb[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, 7(17): 1 668-1 680.
- [15] 李燕平, 袁永俊, 张黎明, 等. 苯酚—硫酸法测定牛肝菌多糖含量[J]. 西华大学学报(自然科学版), 2009, 28(3): 76-78, 84.
LI Y P, YUAN Y J, ZHANG L M, et al. Determination of the contents of polysaccharides in *Boletus* by phenol-sulfuric acid method[J]. *Journal of Xihua University (Natural Science)*, 2009, 28(3): 76-78, 84.
- [16] 江飞凤, 谭晓辉, 胡鹏刚, 等. 超声—微波协同提取柚子皮多糖工艺优化及单糖组成、结构和抗氧化活性分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 196-204.
JIANG F F, TAN X H, HU P G, et al. Optimization of ultrasonic-microwave extraction process of pomelo peel polysaccharide and analysis of monosaccharide composition, structure and antioxidant activity [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(2): 196-204.
- [17] 周蓉, 尹军华, 翁榕安, 等. 黑柄炭角菌水溶性多糖 XNW-1 的分离纯化与结构分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2011, 34(5): 75-79.
ZHOU R, YIN J H, WENG R A, et al. Isolation, purification and structure analysis of water-soluble polysaccharides of *Xylaria nigripes* [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2011, 34(5): 75-79.

(下转第 62 页)

- 中三唑类杀菌剂残留[J]. 合成材料老化与应用, 2022, 51(6): 41-44.
- YAN X N, LI C R. Determination of triazole fungicide residues in tomato based on solid phase extraction-high performance liquid chromatography[J]. Synthetic Materials Aging and Application, 2022, 51(6): 41-44.
- [13] 刘炜, 刘行, 张富丽, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法快速测定黄瓜中 8 种甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的残留[J]. 食品科技, 2020, 45(11): 306-311.
- LIU W, LIU X, ZHANG F L, et al. Determination of eight strobilurin fungicide residues in cucumber by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(11): 306-311.
- [14] 陈景春. 液相色谱—串联质谱法测定番茄和黄瓜中敌菌灵残留量[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 75-78.
- CHEN J C. Determination of anilazine in tomatoes and cucumbers by LC-MS/MS[J]. Food & Machinery, 2019, 35(11): 75-78.
- [15] 李巧莲, 罗景阳, 张宏宏, 等. 多壁碳纳米管改进 QuEChERS-液相色谱—串联质谱法测定豆类中 12 种酰胺类杀菌剂残留量[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(1): 157-162.
- LI Q L, LUO J Y, ZHANG H H, et al. Determination of 12 amide fungicides in legumes by multi-walled carbon nanotubes QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Cereals & Oils, 2023, 36(1): 157-162.
- [16] 张周莉, 黎东, 罗斯, 等. 超高效液相色谱—三重四极杆质谱法测定黄瓜中双炔酰胺菌胺残留[J]. 食品与机械, 2023, 39(11): 72-78.
- ZHANG Z L, LI D, LUO S, et al. Determination of mandipropamid residues in cucumber by UPLC-MS[J]. Food & Machinery, 2023, 39(11): 72-78.
- [17] 康兆广, 李梓源, 李延臻, 等. 气相色谱—三重四级杆串联质谱法测定易腐果蔬中的环酰菌胺残留量[J]. 中国果菜, 2022, 42(9): 10-15.
- KANG Z G, LI Z Y, LI Y Z, et al. Determination of fenhexamid residues in fruits and vegetables by GC-MS/MS[J]. China Fruit & Vegetable, 2022, 42(9): 10-15.
- [18] 张倩, 刘燕嶙, 童跃聪, 等. QuEChERS 结合气相色谱—串联质谱法测定果蔬中 13 种新型酰胺类杀菌剂[J]. 中国食品工业, 2023(4): 78-83.
- ZHANG Q, LIU Y D, TONG Y C, et al. Determination of 13 new amide fungicides in fruits and vegetables by QuEChERS combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China Food Industry, 2023(4): 78-83.
- [19] 毕思远, 曹涛, 朱志强, 等. QuEChERS-气相色谱—串联质谱法测定葡萄等浆果中 7 种酰胺类杀菌剂残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2020, 56(9): 955-959.
- BI S Y, CAO T, ZHU Z Q, et al. QuEChERS-GC-MS/MS determination of residual amount of 7 amide fungicides in berries [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2020, 56(9): 955-959.
- [20] 高洁, 陈达伟, 赵云峰. 分散微固相萃取—超高效液相色谱—高分辨质谱法测定葡萄酒和啤酒中多菌灵和噻菌灵[J]. 色谱, 2018, 36(2): 143-149.
- GAO J, CHEN D W, ZHAO Y F. Determination of carbendazim and thiabendazole in wine and beer by ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry coupled with dispersive micro solid-phase extraction[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2018, 36(2): 143-149.
- [21] 赵妍, 辛少鲲, 杨军, 等. 测定果汁饮料中甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂残留量的超高效液相色谱—高分辨质谱法[J]. 中国卫生工程学, 2020, 19(6): 803-807.
- ZHAO Y, XIN S K, YANG J, et al. Determination of strobilurin fungicides in fruit juice beverages by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Public Health Engineering, 2020, 19(6): 803-807.
- [22] 张朋杰, 张宪臣, 李云松, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱—四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速测定禽畜肉中 157 种农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(16): 5 391-5 400.
- ZHANG P J, ZHANG X C, LI Y S, et al. Rapid determination of 157 kinds of pesticide residues in livestock and poultry meat by QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(16): 5 391-5 400.
-
- (上接第 16 页)
- [18] 彭慧群, 徐小刚, 陈昭月, 等. 红缘拟层孔菌多糖分离纯化、结构表征及其免疫活性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(3): 152-159.
- PENG H Q, XU X G, CHEN Z Y, et al. Isolation, purification, structural characterization and immunological activity of *Fomitopsis pinicola* polysaccharides[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(3): 152-159.
- [19] 粟思源. 美国柄牛肝菌的鉴定及其多糖(BRS-X)的结构鉴定、免疫活性及抗肿瘤活性机制的研究[D]. 南充: 西华师范大学, 2019: 14-15.
- SU S Y. Identification of *Boletus reticulatus* Schaeff and studies on structure identification, immunological activity and the mechanism of anti-tumor activity of the polysaccharide (BRS-X) [D]. Nanchong: China West Normal University, 2019: 14-15.
- [20] 伍燕, 朱家豪, 汪伟, 等. 暗褐网柄牛肝菌多糖 AHP 分离纯化和结构研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 92-96.
- WU Y, ZHU J H, WANG W, et al. Isolation, purification and structural elucidation of AHP polysaccharide from *Phlebopus portentosus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(8): 92-96.