

杂质残留量对不同栽培方式下灵芝多糖肽定值的影响

林冬梅¹, 王联福¹, 罗虹建¹, 杨宝学², 林占熿¹, 林树钱¹, 王赛贞^{1*}

(1. 福建农林大学国家菌草工程技术研究中心, 福州 350002; 2. 北京大学基础医学院药理学系, 北京 100038)

摘要: **目的** 依据国家标准样品定值要求, 为提高标准样品纯度, 降低杂质残留量, 选择最佳栽培方式的灵芝子实体用于灵芝多糖肽(*Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide, GL-PPSQ₂)标准样品的研制。**方法** 基于高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC), 采用面积归一法对 GL-PPSQ₂ 主成分进行定量分析, 卡尔费休库伦法(K-F)测定水分, 热重分析法(thermo gravimetric analysis, TG)测定灰分, 微波消解-电感耦合等离子体质谱法(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)测定 14 种微量元素, 顶空-气相色谱法(headspace-gas chromatography, HS-GC)测量溶剂残留; 质量平衡法对菌草层架(A)、菌草覆土(B)、苡仁壳层架(C)、短段木覆土(D) 4 组不同栽培方式所得 GL-PPSQ₂ 进行定值。**结果** GL-PPSQ₂ 定值依次为: C (97.38%)>A (96.58%)>D (96.02%)>B (95.15%); 得率分别为: B (0.29%)>D (0.18%)>A (0.15%)>C (0.07%); 杂质残留量为: C (1.81%)<A (2.63%)<D (3.20%)<B (4.05%)。**结论** 宜选择短段木覆土或菌草层架栽培灵芝子实体作为 GL-PPSQ₂ 标准样品制备原料。

关键词: 灵芝多糖肽; 杂质残留量; 定值; 栽培方式; 质量平衡法

Effects of residual impurities on certification of *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptides under different cultivation methods

LIN Dong-Mei¹, WANG Lian-Fu¹, LUO Hong-Jian¹, YANG Bao-Xue²,
LIN Zhan-Xi¹, LIN Shu-Qian¹, WANG Sai-Zhen^{1*}

(1. National Engineering Research Center of JUNCAO Technology Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100038, China)

ABSTRACT: Objective To select the *Ganoderma lucidum* fruiting body under the best cultivation conditions for the preparation of *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide (GL-PPSQ₂) for improving the purity and reducing the residual amount of impurities according to the certification of national standards. **Methods** Area normalization method was used for quantitative analysis of the main component based on high performance liquid chromatography

基金项目: 中央引导地方科技发展专项(2021L3008)、福建省重大专项(2021NZ0101)、学科交叉融合推动菌草科学及产业高质量发展项目(XKJC 71202103A)

Fund: Supported by the Project for the Development of Local Science and Technology Guided by the Central Government (2021L3008), the Major Special Project of Fujian Province (2021NZ0101), and the Interdisciplinary Integration to Promote the High-quality Development of Juncao Science and Industry (XKJC 71202103A)

***通信作者:** 王赛贞, 高级工程师, 主要研究方向为食药用菌活性成分研究及质量评价。E-mail: wangszh46@163.com

***Corresponding author:** WANG Sai-Zhen, Senior Engineer, National Engineering Research Center of JUNCAO Technology Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China. E-mail: wangszh46@163.com

(HPLC), the moisture were determined by Karl Fischer (K-F) method, ash content were determined by thermo gravimetric analysis (TG), 14 kinds of trace elements were determined by microwave digestion-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and solvent residue was determined by headspace-gas chromatographic (HS-GC); the certification of GL-PPSQ₂ obtained by 4 kinds of different cultivation conditions including Juncao layer frame cultivation (A), Juncao covering soil cultivation (B), adlay husk layer frame cultivation (C) and short-segment wood covering soil cultivation (D) were obtained by mass balance method. **Results** The purities of GL-PPSQ₂ were as follows: C (97.38%)>A (96.58%)>D (96.02%)>B (95.15%); the yields were as follows: B (0.29%)>D (0.18%)>A (0.15%)>C (0.07%); and the residual impurities were as follows: C (1.81%)<A (2.63%)<D (3.20%)<B (4.05%). **Conclusion** It is advisable to choose the *Ganoderma lucidum* fruiting body cultivated in short-segment wood covering soil cultivation or Juncao layer frame cultivation as the raw materials for the preparation of GL-PPSQ₂ standard samples.

KEY WORDS: *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptides; residual impurities; certification; cultivation methods; mass balance method

0 引言

灵芝 [*Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Fr.) Karst.] 在《本草纲目》中列为上品, 是我国具有优势资源的中药材。灵芝多糖肽 (*Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide, GL-PPSQ₂) 是灵芝主要活性成分之一, 具有多种药理作用^[1-4]。从灵芝子实体中可分离出结构清晰、具有生物活性的天然产物灵芝多糖肽纯品。灵芝品质、活性成分及安全性与栽培方式息息相关, 不同栽培方式所得灵芝质量存在差异^[5-6]。为确保灵芝多糖肽标准样品的定值要求, 对不同栽培方式、不同栽培原料灵芝子实体制备的多糖肽的纯度及杂质进行分析十分必要, 这对灵芝质量标准提升和品质评价具有极其重要的意义。高效液相色谱法能有效规避辅料干扰, 可用于测定灵芝产品多糖肽含量^[7]。GL-PPSQ₂ 是一种足够均匀且相对容易确定特性值的材料或物质, 按 GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则(3) 标准样品定值的一般原则和统计方法》, 采用质量平衡法对其纯度进行赋值, 即对样品中各组分杂质(如水分、灰分、溶剂残留和无机元素等)进行分析后, 再从总量的 100% 中将其扣除后即为样品纯度^[8]。质量平衡法可用于有机标准物质的定值, 如马康等^[9]采用质量平衡法对 1, 2, 3, 4-四氯苯标准物质纯度定值, 袁健童等^[10]采用高效液相色谱法和质量平衡法计算根皮苷纯度为 98.48%。基于此, 本研究对不同栽培方式、不同栽培原料灵芝子实体制备获得的 4 组灵芝多糖肽的纯度及杂质进行分析, 采用质量平衡法对灵芝多糖肽纯度标准物质定值, 为灵芝多糖肽定值选择最佳栽培方式灵芝子实体原料提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

选择具有危害分析和关键环节控制点(hazard analysis

and critical control point, HACCP)和国际联盟认证的基地栽培有机灵芝, 按灵芝栽培方式和栽培基质不同设为 4 组 (A、B、C、D), 分别为菌草袋料层架栽培(简称菌草层架, 三明将乐)、菌草袋料覆土栽培(简称菌草覆土, 三明泰宁)、苡仁壳袋料层架栽培(简称苡仁壳层架, 南平蒲城)和仿野生林下短段木栽培(简称短段木覆土, 福州竹岐)。采收 4 组具有灵芝应有香气和滋味, 且无异味、无霉变、无虫蛀的干燥去柄成熟期灵芝子实体。灵芝多糖肽制备参照林冬梅等^[7]的方法制备。

纯硝酸、乙醇标准溶液、叔丁醇内标、甲醇、卡尔·费休试剂(色谱纯, 德国默克公司); 多元素校准标准溶液 2A [10 μg/mL, 批号: 4-163MKBY2, 含银(Ag)、铝(Al)、砷(As)、钡(Ba)等 27 种元素]、内标[批号: 23-170VYY2, 含铋(Bi)、锗(Ge)、铟(In)、锂(Li)、镧(Lu)、铈(Rh)、钪(Sc)、铊(Tb)元素](美国 Agilent 公司); 无水 Na₂SO₄(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

Thermo scientific iCAP RQ 电感耦合等离子体质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); 7697A 顶空-气相色谱仪(美国 Agilent 公司); TG209F1 热重分析仪(德国耐驰公司); C10SX 卡尔费休水分测定仪(瑞士梅特勒-托利多集团); Waters 2515 输液泵附 2489 紫外检测器高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); TSK G4000PW_{XL} 色谱柱(300 mm×7.5 mm, 17 μm)(日本 TOSOH 公司); 5% Carbowax 20M/Carbopack (80~120 目) 2 m×2 mm 玻璃柱(德国 Sigma 公司); CEM Mars6 微波消解仪(北京海鑫瑞科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 质量平衡法定值

质量平衡法是一种常用的纯度测量方法, 本研究参照“国家一级标准物质技术规范”, 采用质量平衡法对灵芝多糖肽纯度标准物质定值, 包括高效液相色谱面积归一法

测定灵芝多糖肽主成分纯度, 卡尔·费休库伦法测定水分, 顶空-气相色谱法测定溶剂残留, 以及电感耦合等离子体质谱法(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)测定微量元素^[11], 热重分析法(thermo gravimetric analysis, TG)测定灰分。为保证测量结果溯源性与准确性, 所用的仪器设备经过计量检定校准。定值按公式(1)计算^[12]:

$$P_{MB}/\% = P_0 \times (1 - X_v - X_w - X_a - X_e) \times 100\% \quad (1)$$

式中: P_{MB} 为纯度定值结果, %; P_0 为灵芝多糖肽主成分纯度, %; X_v 为溶剂残留, %; X_w 为水分, %; X_a 为灰分, %; X_e 为微量元素, %。

1.3.2 主成分纯度分析

精密称取灵芝多糖肽 1.0 mg, 用流动相溶解并定容至 10 mL, 溶液通过 0.22 μm 滤膜后上机测定。液相色谱条件: TSK G4000PW_{XL} 色谱柱(300 mm \times 7.5 mm, 17 μm); 流动相为 0.1 mmol/L Na_2SO_4 , 流速: 1 mL/min, 进样量 10 μL , 紫外检测波长 280 nm, 柱温 35 $^\circ\text{C}$, 运行 10 min。

1.3.3 微量元素分析

称取适量固体样品于微波消解内罐中, 加入 10 mL 硝酸, 加盖放置 1 h, 旋紧罐盖, 按照微波消解仪标准操作步骤进行消解(微波消解条件如表 1)。将消解罐放在超声水浴箱中, 300 W 超声脱气 5 min, 用水定容至 50 mL, 混匀备用, 同时做空白实验。用 1% 硝酸将多元素校准标准溶液 2A 和内标逐级稀释配制成 10、20、50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液^[13-14]。

质谱条件: 射频功率 1500 W, 采样深度 10.0 mm; 辅助气和载气(均为氦气)流速分别为 0.4、0.8 L/min; 等离子体气流速 15 L/min; 雾化器类型: 同心雾化器; 雾化室温度: 2 $^\circ\text{C}$; 扫描方式: 跳峰模式。

表 1 微波消解条件
Table 1 Microwave digestion conditions

步骤	控制温度/ $^\circ\text{C}$	升温时间/min	恒温时间/min
1	120	5	5
2	150	5	10
3	190	5	20

1.3.4 溶剂残留分析

样品前处理: 取 100 μL 样品溶液及叔丁醇内标工作液 500 μL 置于顶空小瓶内, 盖上硅橡胶垫, 用密封钳加封铝帽, 混匀, 待测。取 0.01 mg/L 乙醇标准溶液 100 μL 及叔丁醇内标工作液 500 μL 作为检出限添加样品, 另取空白水溶液 100 μL 及叔丁醇内标工作液 500 μL 作为空白样品, 按上述操作与样品平行进样分析^[15]。

样品测定: 将样品置于顶空自动进样器样品架上, 顶空自动进样器自动加热、进样。顶空自动进样器参考条件: 加热箱温度: 65 $^\circ\text{C}$; 定量环温度: 105 $^\circ\text{C}$; 传输线温度: 110 $^\circ\text{C}$; 气相循环时间: 8.5 min; 样品瓶加热平衡时间: 10.0 min; 样品瓶加压时间: 0.10 min; 定量环充满时间: 0.10 min; 定量

环平衡时间: 0.05 min; 进样时间: 1.00 min。由于灵芝多糖肽的制备工作中溶剂只用到水和无水乙醇, 所以仅考察乙醇残留量。

色谱条件: 色谱柱 5% Carbowax 20M/Carbopack (80~120 目) 2 m \times 2 mm 玻璃柱; 初始温度 70 $^\circ\text{C}$, 以 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 程序升温至 170 $^\circ\text{C}$, 保持 5 min; 进样口温度 150 $^\circ\text{C}$; 检测器温度 250 $^\circ\text{C}$; 载气为高纯氮气, 纯度 \geq 99.999%; 柱流量 4~8 mL/min。

1.3.5 灰分和水分分析

称取 10 mg 灵芝多糖肽样品放入热重分析仪的坩埚内, 热分析温度范围为 35~970 $^\circ\text{C}$, 升温速率 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$; 气氮: 高纯空气, 60 mL/min, 直接测定其失重和剩余量^[16]。

参照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》第四法卡尔·费休法, 通过标定卡尔·费休试剂、测定样品、测定漂移量, 计算样品中水分含量。

1.4 数据处理

使用 2017 版 Excel 和 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 对数据进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 纯度测定结果

实验样品共 2 瓶, 每瓶取样 3 份, 共 6 份, 应用峰面积归一化法计算纯度^[17]。4 种不同方式栽培灵芝多糖肽主成分纯度结果分别为: A (99.19 \pm 0.026)%、B (99.17 \pm 0.018)%、C (99.18 \pm 0.026)% 和 D (99.20 \pm 0.021)%, 灵芝子实体质量稳定, 制备工艺稳定, 符合标准样品制备要求。

2.2 微量元素测定结果

以各标准元素的质量浓度为横坐标(X , $\mu\text{g/L}$), 以响应值为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 计算各元素的在相应的质量浓度下其回归方程及相关系数(r^2), 结果见表 2。14 种微量元素在 10~200 $\mu\text{g/L}$ 线性范围内线性关系良好, 相关系数 $r^2 \geq 0.9983$, 检出限为 0.000~0.8970 ng/mL, 结果表明该方法准确、可靠, 可用于灵芝多糖肽中 14 种微量元素分析。

样品微量元素测定结果如表 3 所示, 不同栽培方式灵芝多糖肽的 14 种微量元素含量存在显著差异($P < 0.05$), 其含量大小依次为: 短段木覆土 > 苡仁壳层架 > 菌草覆土 > 菌草层架, 短段木和苡仁壳栽培的微量元素总量高于菌草栽培, 尤以碱土金属元素 Ba 含量居高。Pb、As、Cd 和 Hg 等重金属是影响灵芝质量安全的关键因素, 其影响因素包括栽培环境、培养基、富集率和溶出率^[18]。菌草灵芝生产过程中采用 HACCP 对各个环节危害因素进行分析, 并制定控制措施, 这可能是其微量元素含量偏低原因。4 种培养方式获得灵芝多糖肽的 14 种微量元素, 包括具有潜在生理毒性的重金属元素 Pb、As、Cd 和 Cu 皆小于 0.1%, 在标准样品定值中可忽略不计^[19]。

表 2 14 种微量元素回归方程及检出限
Table 2 Regression equations and limits of detection of 14 kinds of trace elements

元素	回归方程	R ²	检出限/(ng/mL)
锂(Li)	Y=55.4761X+56.6669	0.9998	0.8261
铍(Be)	Y=37.39.5X	0.9999	0.0000
铬(Cr)	Y=4765.9043X+1981.8283	1.0000	0.1071
钴(Co)	Y=8981.9789X+165.0013	1.0000	0.0077
镍(Ni)	Y=2393.3581X+2053.5058	1.0000	0.1258
铜(Cu)	Y=6405.7470X+5769.6822	1.0000	0.0366
砷(As)	Y=459.2184X+105.0006	1.0000	0.0680
硒(Se)	Y=9.6544X+1.6667	0.9993	0.8970
银(Ag)	Y=15915.9705X+226.6690	0.9983	0.0086
镉(Cd)	Y=2145.5139X+158.3348	1.0000	0.0161
铯(Cs)	Y=7982.1569X+101.6673	1.0000	0.0029
钡(Ba)	Y=1693.9089X+2641.9517	0.9998	0.1695
铅(Pb)	Y=25863.4736X+4839.2781	0.9991	0.0053
钒(V)	Y=4435.5008X+735341	0.9998	0.0079

表 3 不同栽培方式 GL-PPSQ₂ 微量元素测定结果(n=3, mg/kg)
Table 3 Determination results of trace elements in GL-PPSQ₂ under different cultivation methods (n=3, mg/kg)

元素	菌草层架 (A)	菌草覆土 (B)	苡仁壳层架 (C)	短段木覆土 (D)
锂(Li)	0.5986	0.5689	0.2074	0.1608
铍(Be)	ND	ND	ND	0.0254
铬(Cr)	2.0210	4.0522	8.9517	2.3797
钴(Co)	0.1206	0.3752	0.1538	0.1089
镍(Ni)	1.8858	3.8958	6.1193	2.4825
铜(Cu)	4.4454	6.6997	4.4231	9.2984
砷(As)	0.7244	1.8385	0.0205	0.0348
硒(Se)	0.2743	7.3094	0.2272	0.1491
银(Ag)	0.0593	0.2722	ND	ND
镉(Cd)	0.4377	0.8597	0.2198	1.1503
铯(Cs)	0.5158	0.1235	0.3108	1.1380
钡(Ba)	11.3700	18.4524	70.8809	87.9328
铅(Pb)	2.7612	6.3067	2.7542	2.3061
钒(V)	0.5114	0.3484	0.0957	0.0159
合计	25.7255	51.1022	94.3635	107.1829
百分含量/%	0.0026 ^a	0.0051 ^b	0.0094 ^c	0.0107 ^d

注: ND: 未检出; 不同小写字母代表显著性差异(P<0.05), 下同。

2.3 热重分析测定结果

热重分析是指在程序控制温度下, 测量物质的质量随温度变化的方法。微分热重(derivative thermo gravimetry, DTG)是 TG 曲线对温度或时间的一阶导数, DTG 曲线上峰

顶点(失重速率最大峰值)与 TG 曲线的失重台阶相对应, 且 DTG 曲线的峰面积与失重质量成正比^[20]。灵芝多糖肽的同步热分析曲线 TG 和 DTG 详见图 1 和表 4, 不同栽培方式灵芝子实体制备得到的灵芝多糖肽纯品热稳定性差异不大, 可作为制备灵芝多糖肽纯品的稳定原料。

从 TG 曲线上可以看出, 随着温度升高, 灵芝多糖肽有 3 个主要的失重台阶, 第一失重台阶温度范围为 35~160°C, 平均失重率为 7.19%, 这部分失重可能与样品中游离水分、结合水及有机挥发物的逸出有关^[21]。第二失重台阶温度范围为 160~350°C, 平均失重率为 66.87%; 第三失重台阶温度范围为 350~500°C, 平均失重率为 24.39%; 当温度在 500°C 之后, 灵芝多糖肽的失重率曲线几乎不再改变, 可能是由于温度过高, 均接近碳化, 所以热重曲线几乎不改变^[22]。第二失重台阶和第三失重台阶逸出部分尚待进一步研究。DTG 曲线显示有 3 个主要的失重最大速率峰, 与 TG 曲线的 3 个失重台阶相对应, 且峰面积与失重质量成正比; 失重温度峰值范围为 73~85、269~283、432~449°C^[22]。热分析温度从 35°C 程序升温至 970°C, 最后剩下的残留量即为灰分重量, 灰分结果见表 5, 4 种栽培条件灵芝多糖肽热分析剩余灰分残留物存在显著差异(P<0.05), 菌草层架栽培与短段木覆土栽培灰分相近, 而菌草覆土栽培灰分高达 2.60%, 可能是灵芝对菌草和土壤中微量元素均具有富集特性^[5]。

2.4 溶剂残留和水分测定结果

灵芝多糖肽在提取、分离、纯化过程中, 仅用去离子水和无水乙醇试剂, 所以有机溶剂残留量仅考察乙醇。溶剂残留结果见表 5, 4 组灵芝多糖肽仅检出微量或未检出溶剂残留; 层架栽培灵芝多糖肽溶剂残留为 0.2% 左右, 覆土栽培含量小于 0.1%, 可忽略不计。

水分的测定方法有多种, 卡尔·费休法(Karl-Fischer)是其中的一种。与直接干燥法相比, 卡尔·费休库伦法操作更为简单, 自动化程度高, 测试结果较为可靠, 因此得到了较为广泛的应用^[8]。水分结果见表 5, 覆土栽培水分高于层架栽培, 菌草层架栽培灵芝多糖肽水分在 1% 以下。

2.5 质量平衡法定值

不同栽培方式灵芝多糖肽定值、杂质残留量结果见表 5, 灵芝多糖肽定值结果与水分、溶剂残留、灰分及微量元素相关。按质量平衡法测定定值结果: 苡仁壳层架>菌草层架>短段木覆土>菌草覆土。其中溶剂残留由制备工艺引入、水分可能受灵芝多糖肽样品特性影响, 灰分和微量元素与子实体原料息息相关。覆土栽培灵芝多糖肽杂质残留总量均大于层架栽培, 可分析出覆土栽培会增加灵芝多糖肽样品的杂质残留, 其微观结构可能存在微小差异, 覆土栽培灵芝多糖肽可能存在更多的亲水功能团, 导致水分及溶剂残留高于层架栽培^[23-24]。

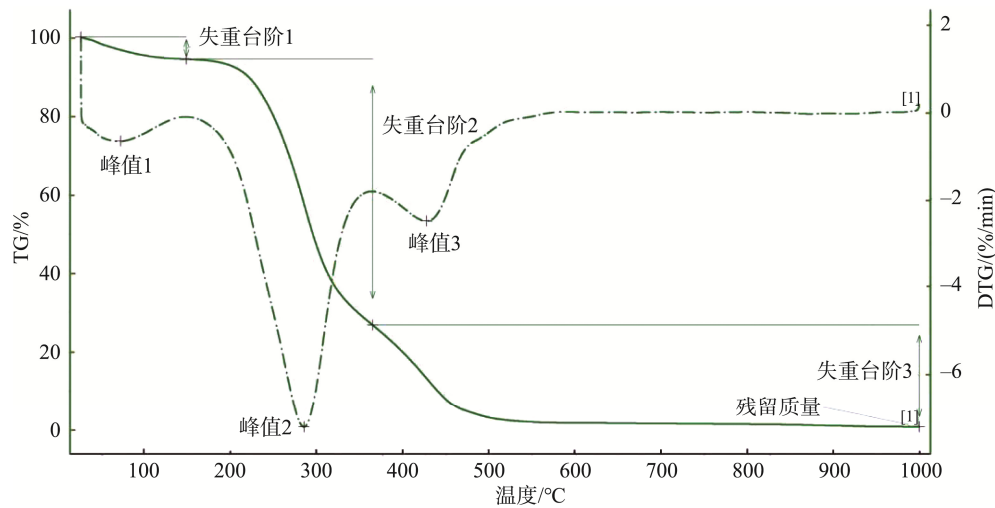


图 1 同步热分析曲线

Fig.1 Curves of synchronous thermal gravimetry

表 4 同步热分析结果

Table 4 Results of synchronous thermal gravimetry

栽培方式	失重率/%			失重最大速率峰值/°C		
	失重台阶 1	失重台阶 2	失重台阶 3	失重台阶 1	失重台阶 2	失重台阶 3
菌草层架(A)	7.98	70.74	19.54	77.8	282.8	445.6
菌草覆土(B)	6.89	65.45	25.05	82.4	269.0	448.4
苡仁壳层架(C)	6.90	68.08	24.50	73.9	278.5	432.1
短段木覆土(D)	6.98	63.22	28.45	84.4	282.4	446.2

表 5 不同栽培方式 GL-PPSQ₂ 杂质残留量和定值结果(%)Table 5 Impurity residues and certification results of GL-PPSQ₂ under different cultivation methods (%)

栽培方式	水分	灰分	微量元素	溶剂残留	杂质残留量	定值结果
菌草层架(A)	0.73 ^c	1.68 ^b	<0.1	0.22	2.63	96.58
菌草覆土(B)	1.45 ^{ab}	2.60 ^a	<0.1	<0.1	4.05	95.15
苡仁壳层架(C)	1.09 ^{bc}	0.52 ^c	<0.1	0.20	1.81	97.38
短段木覆土(D)	1.68 ^a	1.52 ^b	<0.1	<0.1	3.20	96.02

3 结 论

由质量平衡法定值公式可知, 杂质残留量越高, 定值结果越低, 因此寻找杂质含量较低的灵芝多糖肽尤为重要。选择不同栽培方式(覆土栽培和层架栽培)、不同栽培原料(短段木、苡仁壳和菌草)的灵芝子实体为原料, 用相同的分离提取纯化方法, 获得 4 组灵芝多糖肽纯品, 其得率分别为: 菌草覆土(0.29%)>短段木覆土(0.18%)>菌草层架(0.15%)>苡仁壳层架(0.07%)。综合定值结果及其得率, 宜选择段木覆土或菌草层架栽培灵芝子实体作为灵芝多糖肽纯品制备原料, 其杂质残留量较低, 得率高, 符合灵芝多糖肽纯度要求。

灰分元素(ash element)亦称矿质元素, 灵芝多糖肽有机物中的碳、氢、氧、氮等元素以二氧化碳、水、分子态

氮和氮的氧化物形式散失到空气中, 余下不能挥发的成分, 以氧化物、盐等形式存在的灰白色残烬。一些单体标准物质如肌酐灰分小于 0.1%(忽略不计)^[25], 芒果苷灰分为 0.159%^[17], 本研究获得的灵芝多糖肽为大分子天然产物, 灰分均高于 0.5%。4 组不同栽培方式其灰分均偏高, 主要有两方面的原因: 其一是环境因素如栽培基质、土壤、水、空气等; 其二, 灵芝对微量元素具有富集特性, 即使是使用土壤微量元素较低不超过国家标准限量的基地覆土栽培, 其子实体内灰分、微量元素残留量也会增加^[26]。同时也发现灵芝对有益微量元素的富集^[27-28], 经分析灵芝多糖肽 GL-PPSQ₂ 富含对人体有益的微量元素, 如钙、钾、镁、铁和锌等, 这也是灰分较高的原因。

不同栽培方式获得的灵芝多糖肽其杂质残留量不一, 导致其定值结果的差异。为确保灵芝多糖肽标准样品研制,

宜选择基地标准化 GAP 有机栽培^[29], 管控好基地土壤、水分、气候等自然条件、栽培方式、种植与采收时间及采收部位, 保证灵芝的药用、食用的安全性; 用杂质谱^[30]分析杂质残留量, 管控好灵芝多糖肽纯品纯度, 确保其均匀性、稳定性、溯源性与安全性。选择优质灵芝子实体投入纯品的研制, 对确保灵芝标准样品质量具有重要意义。

参考文献

- [1] 曹琦珍, 林树钱, 王赛贞. 灵芝多糖肽对人肺癌细胞侵袭的影响[J]. 北京大学学报(医学版), 2007, 39(6): 653–656.
CAO QZ, LIN SQ, WANG SZ, *et al.* Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide on the invasion of human lung cancer cells [J]. J Peking Univ (Health Sci), 2007, 39(6): 653–656.
- [2] ZHONG DD, WANG HK, LIU M, *et al.* *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide prevents renal ischemia reperfusion injury via counteracting oxidative stress [J]. Sci Rep, 2015, 25(5): 16910.
- [3] ZHONG DD, XIE ZW, HUANG BY, *et al.* *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide alleviates hepatocarcinoma via modulating bile acid metabolism dependent on FXR-SHP/FGF [J]. Cell Phys Biochem, 2018, 49(3): 1163–1179.
- [4] WANG CH, SHI SS, CHEN Q, *et al.* Antitumor and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in glioma-bearing rats [J]. Integr Cancer Ther, 2018, 17(3): 674–683.
- [5] 吴鸿雪, 吕旭聪, 唐庆九, 等. 栽培条件对灵芝子实体中四种重金属含量的影响[J]. 菌物学报, 2020, 39(1): 137–143.
WU HX, LV XC, TANG QJ, *et al.* Effects of cultivation conditions on triterpenoids composition and activities of *Ganoderma lingzhi* fruiting bodies [J]. Mycosystema, 2020, 39(1): 137–143.
- [6] 邢茜, 安文杰, 张江萍, 等. 不同栽培方式灵芝营养成分和安全性的分析研究[J]. 山西林业科技, 2019, 48(4): 8–11.
XING Q, AN WJ, ZHANG JP, *et al.* Analysis of nutritional composition and safety of *Ganoderma lucidum* under different cultivation methods [J]. Shanxi For Sci Technol, 2019, 48(4): 8–11.
- [7] 林冬梅, 罗虹建, 王赛贞, 等. 灵芝多糖肽 GL-PPSQ₂ 结构研究及其应用[J]. 中草药, 2019, 50(2): 336–343.
LIN DM, LUO HJ, WANG SZ, *et al.* Structure and application of *Ganoderma* polysaccharide peptide GL-PPSQ₂ [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2019, 50(2): 336–343.
- [8] 郑子繁, 刘卫晓, 金尧军, 等. 质量平衡法及其在标准物质定值中的应用进展[J]. 生物技术进展, 2020, 10(6): 623–629.
ZHENG ZF, LIU WX, JIN WJ, *et al.* Progress on reference materials based on mass balance method [J]. Curr Biotechnol, 2020, 10(6): 623–629.
- [9] 马康, 杨冉, 王海峰, 等. 质量平衡法分析 1,2,3,4-四氯苯的纯度分析与不确定度评定[J]. 岩矿测试, 2013, 32(2): 334–339.
MA K, YANG R, WANG HF, *et al.* Analysis of purity and uncertainty for 1,2,3,4-tetrachlorobenzene with the mass balance method [J]. Rock Miner Anal, 2013, 32(2): 334–339.
- [10] 袁健童, 刘布鸣, 柴玲, 等. 根皮苷候选化学对照品的制备及分析研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(17): 6221–6227.
YUAN JT, LIU BM, CHAI L, *et al.* Preparation and analysis of candidate chemical reference substance of phlorizin [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(17): 6221–6227.
- [11] 周剑, 李全发, 王敏, 等. 染料木苷纯度标准物质定值及不确定度评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(18): 6340–6348.
ZHOU J, LI QF, WANG M, *et al.* Characterization and uncertainty evaluation of genistin purity reference material [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(18): 6340–6348.
- [12] 黄挺, 贡慧, 张伟, 等. 3 种定值方法用于维生素 D₃ 纯度标准物质的研究[J]. 化学试剂, 2013, 35(7): 619–624.
HUANG T, GONG H, ZHANG W, *et al.* Three kinds of determination methods used in the study of vitamin D₃ purity standard material [J]. Chem Reag, 2013, 35(7): 619–624.
- [13] 刘慧燕, 沈会平, 张志平, 等. 电感耦合等离子体质谱检测牡蛎中 17 种无机元素的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 7424–7428.
LIU HY, SHEN HP, ZHANG ZP, *et al.* Determination of 17 inorganic elements in oyster by inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(20): 7424–7428.
- [14] 陈璐, 李霞, 李增梅, 等. 微波消解-电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法测定山东小麦中铬、镍、铜、砷、镉、铅、锌的含量[J]. 中国无机分析化学, 2020, 10(3): 66–70.
CHEN L, LI X, LI ZM, *et al.* Determination of chromium, nickel, copper, arsenic, cadmium, lead and zinc in wheat in Shandong Province by ICP-MS with microwave digestion [J]. Chin J Inorg Anal Chem, 2020, 10(3): 66–70.
- [15] 肖小武, 李婷婷, 程奇珍, 等. 顶空-毛细管柱气相色谱法测定盐酸艾司洛尔中有机溶剂的残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2012, 48(7): 848–850.
XIAO XW, LI TT, CHEN QZ, *et al.* Head space-capillary column GC determination of residual amounts of organic solvents in esmolol hydrochloride [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2012, 48(7): 848–850.
- [16] 段微微, 唐恩柱. 热重分析仪在钨碳催化剂灰分测定的应用[J]. 天津化工, 2009, 23(1): 58–59.
DUAN WW, TANG ENZ. The application of TGA in testing the ash of Pol carbon catalyst [J]. Tianjin Chem Ind, 2009, 23(1): 58–59.
- [17] 阳辛凤, 庞朝海, 田海, 等. 芒果苷标准样品的定值与不确定度测定[J]. 中成药, 2022, 44(1): 284–288.
YANG XF, PANG CH, TIAN H, *et al.* Determination on a certified reference material for purity of mangiferin and its uncertainty [J]. Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(1): 284–288.
- [18] 童金华, 林应兴, 李晶, 等. 菌草灵芝提取物的危害及控制措施[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2015, 44(6): 634–638.
TONG JH, LIN YX, LI J, *et al.* Hazard and control measures of *Juncao Ganoderma lucidum* extract [J]. J Fujian Agric For Univ (Nat Sci Ed), 2015, 44(6): 634–638.
- [19] 冯旌, 于辉, 付重敏, 等. 化学药品杂质控制的现状与展望[J]. 当代化工研究, 2020, 23: 9–10.

- FENG J, YU H, FU ZM, *et al.* Present situation and prospect of chemical impurity control [J]. *Mod Chem Res*, 2020, 23: 9–10.
- [20] 王琪, 李建涛, 于雪妮, 等. 差热/热重分析法鉴别不同的海参[J]. *中国海洋药物*, 2018, 37(6): 54–58.
- WANG Q, LI JT, YU XN, *et al.* Differential thermal analysis method/thermo gravimetric identification of different species of sea cucumbers [J]. *Chin J Mar Drugs*, 2018, 37(6): 54–58.
- [21] 陈祥. 基于热重-红外-质谱技术的煤热解产物定量分析研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- CHEN X. Research on quantitative analysis of coal pyrolysis products using TG-FTIR-MS technique [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [22] 李琴梅, 胡光辉, 陈新启, 等. 热分析-红外-质谱联用系统用于石墨烯材料成分分析[J]. *分析仪器*, 2018, (2): 65–68.
- LI QM, HU GH, CHEN XQ, *et al.* Application of STA-FTIR/MS in graphene materials [J]. *Anal Instrum*, 2018, (2): 65–68.
- [23] 郭中雅. 表面活性剂在褐煤表明吸附特性及其对煤润湿性的影响[D]. 太原: 太原理工大学, 2016.
- GUO ZY. Adsorption characteristic of surfactant onto lignite surface and its influence on coal wettability [D]. Taiyuan: Taiyuan University of Technology, 2016.
- [24] 王慧娟. 壳聚糖/黄精多糖酶解物的保湿性能及在卷烟中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- WANG HJ. Moisture retention properties of chitosan/polygonatum polysaccharide enzymatic hydrolysates and its application in cigarettes [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [25] 黄亮, 张伟, 黄挺, 等. 肌酐纯度标准物质的定值方法及其不确定度评定研究[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(7): 840–846.
- HUANG L, ZHANG W, HUANG T, *et al.* Research on a certified reference material for purity of creatinine and its uncertainty evaluation [J]. *J Instrum Anal*, 2014, 33(7): 840–846.
- [26] 张晓柠. 灵芝对四种重金属富集作用的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- ZHANG XN. Studies on the effects of four heavy-met als bioaccumulation in *Ganoderma lucidum* [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2007.
- [27] 向晖, 潘晓丽, 章从恩, 等. 金属微量元素的配合物在中药中的应用[J]. *中药与临床*, 2013, 4(5): 58–60, 64.
- XIANG H, PANG XL, ZHANG CEN, *et al.* The application of complexes of metal microelement in the traditional Chinese medicine [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med*, 2013, 4(5): 58–60, 64.
- [28] 王树勋. 不同产地灵芝中 16 种矿物元素的 TXRF 测定[J]. *江西科学*, 2014, 32(4): 503–505, 519.
- WANG SX. Determination of 16 mineral elements in *Ganoderma lucidum* by TXRF [J]. *Jiangxi Sci*, 2014, 32(4): 503–505, 519.
- [29] 刘国辉, 谢宝贵, 李晔, 等. 有机灵芝栽培技术[J]. *海峡药学*, 2010, 22(1): 71–73.
- LIU GH, XIE BG, LI Y, *et al.* Organic cultivation of *Ganoderma lucidum* [J]. *Strait Pharmaceutical J*, 2010, 22(1): 71–73.
- [30] 胡昌勤, 张夏. 化学药品杂质谱控制的现状与展望[J]. *药科学报*, 2019, 54(12): 2214–2231.
- HU CQ, ZHANG X. Current situation and the trend in impurity profiling of chemical drugs [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 54(12): 2214–2231.

(责任编辑: 郑丽黄周梅)

作者简介



林冬梅, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食药菌化学成分研究及菌草技术推广与应用。

E-mail: 982245079@qq.com



王赛贞, 高级工程师, 主要研究方向为食药菌活性成分研究及质量评价。

E-mail: wangszh46@163.com