

《灵芝及灵芝提取物中 β -葡聚糖的测定》

团体标准编制说明

一、任务来源与起草单位

2023年9月28日，广东省生物医药产业高质量发展协会接受无限极(中国)有限公司、天方健药业有限公司、浙江科达灵芝有限公司、金寨乔康有限公司、广东省科学院生物与医学工程研究所、广州中医药大学、广东药科大学、广州市食品检验所、南昌市食品检验所等单位关于《灵芝及灵芝提取物中 β -葡聚糖的测定》团体标准的立项申请，开启标准编制工作。该团标由无限极(中国)有限公司、天方健药业有限公司、浙江科达灵芝有限公司、金寨乔康有限公司、广东省科学院生物与医学工程研究所、广州中医药大学、广东药科大学、广州市食品检验所、南昌市食品检验所等单位共同起草和编制。

二、目的和意义

现代药理研究表明，灵芝具有补益安神、止咳平喘、抗癌、免疫调节、抗病毒、抗氧化、抗过敏、抗高血压、保肝、降血糖等方面的药理作用，在临床中发挥着重要作用，2020年版《中国药典》将灵芝分列为赤芝与紫芝。目前从灵芝属中分离鉴定出600多种化合物，包括三萜、多糖、甾醇、生物碱、核苷酸、类固醇等类别。其中，多糖是灵芝子实体中的主要有效成分之一，目前已经从不同来源的灵芝材料中分离获得200多个多糖组分，大部分为葡聚糖，还有以葡萄糖甘露糖、半乳糖、岩藻糖和阿拉伯糖等单糖组成的杂多糖。 β -葡聚糖是灵芝中主要的活性多糖种类，在免疫调节和抑制肿瘤方面发挥着重要作用，因此，提纯并检测灵芝提取物中的 β -葡聚糖方面的研究具有很大的意义。

现有技术中的研究主要集中在如何以灵芝原料提取出富含 β -葡聚糖的灵芝提取物，例如：采用热水浸提法、超声辅助提取法、微波辅助提取法、亚临界水提取法等。热水浸提法是工业生产常用的方法，但提取时间长和能耗高限制其产业化发展；超声辅助提取以超声高频振荡产生的空穴效应破坏细胞壁使多糖溶出，但中试及产业化投资成本高；微波辅助提取以微波破坏细胞壁，但对设备要求高，样品处理量小，会产生大量蒸汽，难以大规模应用；亚临界水提取法温度和压力要求更高，高温易导致 β -葡聚糖生物活性的下降。本标准方法操作简单，大幅度提高 β -葡聚糖的提取率，能适用于灵芝及灵芝提取物中 β -葡聚糖的测定，可广泛推广在行业内使用，为我国生物医药产业的健康持续发展提供技术支撑。

三、项目主要过程

1、申请立项阶段

2023 年 9 月，由无限极(中国)有限公司、天方健药业有限公司、浙江科达灵芝有限公司、金寨乔康有限公司、广东省科学院生物与医学工程研究所、广州中医药大学、广东药科大学、广州市食品检验所、南昌市食品检验所向广东省生物医药产业高质量发展协会提出团体标准编制申请，并于 2023 年 9 月 28 日获准立项。

2、起草阶段

2023 年 9 月，在获准立项后，无限极(中国)有限公司、天方健药业有限公司、浙江科达灵芝有限公司、金寨乔康有限公司、广东省科学院生物与医学工程研究所、广州中医药大学、广东药科大学、广州市食品检验所、南昌市食品检验所成立了“灵芝及灵芝提取物中 β -葡聚糖的测定”起草工作组，确定工作方案。项目小组成立后，起草工作组迅速开展工作，在工作过程中广泛收集有关 β -葡聚糖含量测定的资料，在认真研究了国内外相关标准及资料的基础上，开发出了灵芝及灵芝提取物中 β -葡聚糖的分光光度检测方法，并对灵芝提取物样品进行了一系列的比对验证实验，在遵循先进性、科学性、实用性的基础上编制出《灵芝及灵芝提取物中 β -葡聚糖的测定》标准草案初稿，经组织内部有关专家研讨后，对标准草案初稿进行了认真地修改，于 2024 年 5 月形成了标准征求意见稿，由组长审核后报各起草组。

3、标准方法验证

2024 年 3 月-5 月，起草小组完成本方法的研究工作，根据相关参与单位修改意见，完成验证报告。收集相关验证样品，将验证样品分别寄往验证单位，进行标准方法的室间验证工作。

4、征求意见阶段

经各起草组同意，2024 年 5 月 22 日，为了能使本标准有效地应用于市场相关方，进行公开征求意见，共发送 10 家单位，收回 5 家单位 10 条意见，其中采纳 8 条，未采纳 2 条。5 家单位无意见。

四、标准编制原则和技术内容说明

1、标准编制原则

遵循规范性、适用性和可操作性原则，遵循政策性和协调统一性的原则，以满足国家强制性标准为前提，结合政府监管部门、检测机构、生产企业等的需求，以国家有关相关法律法规、规章、技术政策和规划为依据，促进环境效益、经济效益和社会效益的统一，体现重点突出和市场需求的原则；标准制定工作遵循“面向市场、服务产业、自主制定、适时推出”的原则，本标准制定与技术创新、试验验证、产业推进、应用推广相结合，统筹推进。

依据《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1-2020），在标准修订过程中力求做到技术内容的叙述准确无误，文字表达准确、简明、易懂，标准的构成严谨合理，内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

2、标准技术内容说明

标准方法的开发研究、验证、技术指标等主要参照《中国药典 2020 年版》四部 9101 分析方法验证指导原则、GB/T 27404-2008 《实验室质量控制规范 食品理化检测》等代表性标准。

五、标准主要技术内容

1、范围

本文件规定了灵芝及灵芝提取物中 β -葡聚糖的分光光度检测方法。

本文件适用于灵芝子实体，灵芝孢子粉和灵芝提取物中 β -葡聚糖的测定。

2、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；使用蛋白质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。

3、样品前处理

取样品 0.5 g（精确到 0.01 g），放入锥形瓶或 50 mL 离心管中，加入 10 mL 水，将样品涡旋至充分混合，用氢氧化钠溶液调节溶液至 pH6.9，加入 0.1 mL 淀粉酶，并在 20 °C 恒温水浴振荡 2 小时酶解。用盐酸溶液将溶液的 pH 值调至 5.0 加入 10 mg 纤维素酶，并在 37 °C 恒温水浴酶解 2 小时。用氢氧化钠溶液将溶液的 pH 值调至 7.5，向溶液中加入约 50 mg 的蛋白酶，并在 37 °C 恒温水浴振荡 2 小时酶解。用盐酸溶液调节 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 °C 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（漩涡混合振荡器，转速：约 2000 rpm，10 min），放置冷藏沉淀过夜（8 h 以上）。将溶液离心（3000 rpm，10 min），弃上清液。向沉淀中加入 25 mL 80% 乙醇溶液混匀，并在 4 °C 下沉淀 1 小时。将溶液离心（3000 rpm，10 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。

4、标准工作曲线的绘制

精密量取β-葡聚糖对照品溶液 0 mL、0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL、1.00 mL 分别置于 25 mL 具塞比色管中，准确补充水至 1.0 mL，加入苯酚溶液 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，室温放置 3min 后再置冰浴中冷却 5min，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。

5、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。

6、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 3 位有效数字。

7、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%。

六、实验室间方法验证

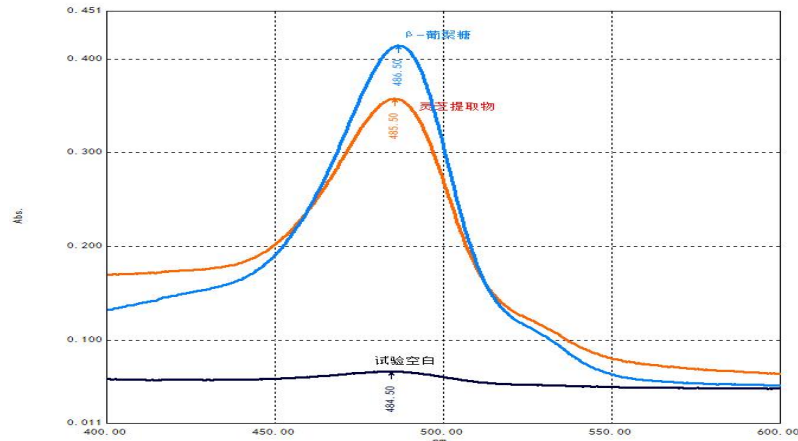
本标准的验证工作分别由五家机构或组织进行，验证单位名称详见表 1。分别就方法的专属性、方法线性范围、精密度、准确定、耐用性进行验证。

表 1 参与验证单位及参与人员

编号	验证单位	参与人员
1	广东省科学院生物与医学工程研究所	张志强、刘志鹏
2	南昌市检验检测中心	陈春艳、周洁

3	广州市食品检验所	张豪
4	广州中医药大学	周静、向艳
5	广东药科大学	葛瑾雯、鲁丽丽

1. 专属性考察



分别对空白试剂（超纯水）、β-葡聚糖标准品溶液，灵芝及灵芝提取物供试品溶液按照方法进行处理，利用紫外可见分光光度计在 400-600 nm 波长范围内对上述三种溶液进行光谱扫描，结果为图 1 所示，β-葡聚糖标准品溶液，灵芝及灵芝提取物供试品溶液在 485 nm 处均有最大吸收，而试验空白无吸收，且在 400-600 nm 波长范围内未出现主要吸收峰，所以选择β-葡聚糖标准品的最大吸收波长 485 nm 作为方法学考察的测定波长。

2. 线性考察

按照方法绘制标准曲线，各验证单位结果如表 2 所示。结果表明在质量为 0μg~100.0 μg 的范围内β-葡聚糖质量与吸光度值线性关系良好。

表 2 验证单位方法线性考察结果（β-葡聚糖质量范围：0μg~100.0 μg）

编号	验证单位	线性方程	相关系数	是否满足线性要求
1	广东省科学院生物与医学工程研究所	$y=0.0093x+0.0014$	0.9997	是
2	南昌市检验检测中心	$y = 0.0099x - 0.0046$	0.9998	是
3	广州市食品检验所	$y = 0.0078x + 0.002$	0.999	是

4	广州中医药大学	$y=0.009x-0.005$	0.9995	是
5	广东药科大学	$y=0.0082x-0.0046$	0.999	是

3. 精密度考察

称取样品约 0.5 g，按照方法处理，重复测定 6 次，结果如表 2 所示。根据中国药典 2020 年版“分析方法验证指导原则”规定样品中待测成分含量在 100 mg/g 范围时，重复性 RSD 限度为<1.5%。因此，该分析方法的重复性良好。

表 3 验证单位方法精密度考察结果

编号	验证单位	含量平均值 (mg/g)	RSD(%)
1	广东省科学院生物与医学工程研究所	73.5	1.2
2	南昌市检验检测中心	70.9	1.3
3	广州市食品检验所	73.8	0.8
4	广州中医药大学	74.4	0.6
5	广东药科大学	74.4	0.9

4. 准确度考察

取已测定含量的灵芝提取物约 0.5 g，精密称定，平行称定 9 份，加入一定量的β-葡聚糖对照品，测定计算β-葡聚糖加样回收率，见表 4。结果显示，β-葡聚糖加样回收率为 95.1~99.6%，根据中国药典 2020 年版“分析方法验证指导原则”规定，样品中待测成分含量在 100 mg/g 范围时，回收率限度为 95%~102%，表明回收率良好。

表 4 验证单位方法准确度考察结果

编号	验证单位	加入对照品量 (mg)	平均回收率 (%)
1	广东省科学院生物与医学工程研究所	30	98.3
		40	98.6
		50	98.5
2	南昌市检验检测中心	30	95.1
		40	95.4
		45	95.5

3	广州市食品检验所	10	95.2
		25	96.1
		50	95.2
4	广州中医药大学	30	98.7
		40	98.4
		50	98.9
5	广东药科大学	30	98.8
		40	98.2
		50	99.6

5. 耐用性考察

5.1 不同取样量的考察

比较不同取样量，分别为 0.40 g、0.50 g 和 0.60 g 对灵芝及其提取物中 β -葡聚糖含量测定的影响。结果显示(见表 5)，取样量 ± 0.1 g，测得 β -葡聚糖含量 RSD 值均小于 3%，说明该方法对取样量的较小变动耐用性良好。

表 5 验证单位对样品不同取样量的考察结果

编号	验证单位	取样量 (g)	含量 (mg/g)	RSD (%)
1	广东省科学院生物与医学工程研究所	0.40	73.0	1.0
		0.50	74.0	
		0.60	74.5	
2	南昌市检验检测中心	0.40	72.1	1.3
		0.50	73.9	
		0.60	72.6	
3	广州市食品检验所	0.40	74.1	0.7
		0.50	73.1	
		0.60	73.6	
4	广州中医药大学	0.40	75.0	0.3
		0.50	75.0	
		0.60	75.4	
5	广东药科大学	0.40	74.2	1.0
		0.50	73.6	
		0.60	75.1	

5.2 不同厂家的酶的考察

以蛋白酶为考察对象，比较不同的厂家，分别为上海麦克林生化科技有限公司、上海源叶生物科技有限公司和 sigma 对灵芝及其提取物中 β -葡聚糖含量测定的影响。结果如表 6。结果显示，不同厂家的蛋白酶，测得 β -葡聚糖含量 RSD 均小于 3.0%，说明该分析方法对于不同

厂家的蛋白酶耐用性良好。

表 6 验证单位对不同厂家蛋白酶的考察结果

编号	验证单位	蛋白酶厂家	含量 (mg/g)	RSD (%)
1	广东省科学院生物与医学工程研究所	上海麦克林	74.0	0.8
		上海源叶	73.0	
		sigma	74.0	
2	南昌市检验检测中心	上海麦克林	72.6	0.8
		上海源叶	73.1	
		sigma	71.9	
3	广州中医药大学	上海麦克林	73.9	0.4
		上海源叶	73.2	
		sigma	73.8	
4	广东药科大学	上海麦克林	74.2	1.0
		上海源叶	73.6	
		sigma	75.1	

5.3 醇沉洗涤浓度的考察

分别以 75%、80%、85%乙醇溶液进行洗涤沉淀，考察醇沉洗涤浓度对灵芝及其提取物中 β -葡聚糖含量测定的影响。结果如下表 7，结果显示，不同醇沉洗涤浓度，测得 β -葡聚糖含量 RSD 均小于 3.0%，说明该分析方法对于醇沉洗涤浓度 $\pm 5\%$ 范围内耐用性良好。

表 7 验证单位对不同浓度乙醇溶液考察结果

编号	验证单位	乙醇浓度 (%)	含量 (mg/g)	RSD (%)
1	广东省科学院生物与医学工程研究所	75	75.0	1.4
		80	73.0	
		85	73.5	
2	南昌市检验检测中心	75	72.6	0.7
		80	73.4	
		85	72.5	
3	广州中医药大学	75	74.0	0.6
		80	73.2	
		85	73.8	
4	广东药科大学	75	75.8	1.5
		80	76.7	
		85	74.5	

综上，在 0~100.0 μg 范围内， β -葡聚糖质量与吸光度值线性关系良好，整个分析方法经专属性、精密度、准确度及耐用性考察，结果均符合要求，说明建立的方法能很好的用于灵

芝及其提取物中 β -葡聚糖含量测定。

七、贯彻标准的要求、措施和建议

β -葡聚糖作为一种重要的免疫调节剂，已成为当今医药和保健品行业关注的焦点，对 β -葡聚糖的定量检测是进行灵芝相关产品质量控制的重要手段。为了推动广东省生物医药产业高质量发展，建议标准发布后，做好宣传培训、加大贯彻实施、向省市场监督管理局建议认库作为计量认证（CMA）检测依据、建立检查监督机制等工作。

《灵芝及灵芝提取物中 β -葡聚糖的测定》

团体标准工作组

2024年7月25日