

微波消解-ICP-MS 分析不同破壁方法灵芝孢子粉中无机元素含量

徐靖^{1,2,3}, 刘志风^{1,2}, 王瑛³, 朱惠照^{3*}, 郑化先³, 李明焱^{1,2,3}, 李振皓²(1.浙江省珍稀植物药工程技术研究中心, 浙江 武义 321200; 2.浙江寿仙谷珍稀植物药研究院, 浙江 武义 321200; 3.浙江寿仙谷医药股份有限公司, 浙江 武义 321200)

摘要: 目的 建立电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定灵芝孢子粉中无机元素的方法, 比较不同破壁方法灵芝孢子粉中 V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Pb、As、Se、Cd、Sn、Sb、Ti、Hg 16 种元素的含量。方法 微波消解处理灵芝孢子粉, 采用 ICP-MS 同时测定样品中 16 种元素的含量。结果 16 种元素方法检出限为 0.000 2~0.101 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 线性关系良好($r>0.999\ 0$), 平均回收率为 80%~120%, RSD 均 $<5\%$ 。与原料相比, 破壁后样品中 Cr、Fe、Ni、Co 等元素含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但超音速气流破壁样品升高倍数比振动磨破壁样品低 1.75~48 倍。结论 本方法灵敏度高、快速准确, 可用于灵芝孢子粉中无机元素的测定。超音速气流法不易引入重金属污染, 是一种安全可靠的破壁工艺。

关键词: 灵芝孢子粉; 破壁方法; 电感耦合等离子体质谱; 无机元素

中图分类号: R284.1; R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)07-0813-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.010

Determination of Inorganic Elements in *Ganoderma Lucidum* Spore Powder with Different Treatments of Wall-broken Methods by Microwave Digestion-ICP-MS

XU Jing^{1,2,3}, LIU Zhifeng^{1,2}, WANG Ying³, ZHU Huizhao^{3*}, ZHENG Huaxian³, LI Mingyan^{1,2,3}, LI Zhenhao²
(1.Zhejiang Engineering Research Center of Rare Plant Medicine, Wuyi 321200, China; 2.Zhejiang Shouxiangu Institute of Rare Plant Medicine, Wuyi 321200, China; 3.Zhejiang Shouxiangu Pharmaceutical Co., Ltd., Wuyi 321200, China)

基金项目: 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2012C12911-7); 浙江省食药用药产业技术创新战略联盟(2011LM201)

作者简介: 徐靖, 男, 助理工程师 Tel: (0579)87988503 E-mail: jing2577x@vip.qq.com ***通信作者:** 朱惠照, 女, 副研究员 Tel: 18368665559 E-mail: zhenhao6@126.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an ICP-MS method to determine the inorganic elements including V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Pb, As, Se, Cd, Sn, Sb, Ti and Hg in *Ganoderma lucidum* spore powder, and to compare the effects of two different wall-broken methods on the contents of above 16 elements. **METHODS** Microwave digestion coupled with ICP-MS were carried out to experiment on simultaneous determination of 16 inorganic elements in spore powder. **RESULTS** The validated method indicated that correlative coefficients(*r*) for all elements were >0.999 0, and the limits of detection ranged from 0.000 2–0.101 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The average spiked recoveries were 80%–120% with the RSD<5%. Compared with the crude spore powder, the contents of Cr, Fe, Ni, Co increased remarkably after treated with wall-broken methods ($P<0.05$ or $P<0.01$). However, the multiples of supersonic stream samples were 1.75–48 times smaller than those of vibration mill ones. **CONCLUSION** The established method is proved to be accurate, rapid and sensitive. Moreover, supersonic stream method reduces heavy metal contamination during wall breaking, which can be further developed as a safe and reliable wall-broken method for spore powder.

KEY WORDS: *Ganoderma lucidum* spore powder; wall-broken methods; ICP-MS; inorganic elements

灵芝孢子为担子菌纲多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst 或紫芝 *Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang 在生长成熟期, 从菌褶中弹射出的极其微小的卵形生殖细胞。近年来, 灵芝孢子粉的临床和保健应用逐渐增多, 这也促进了其物质基础及药效作用的研究。灵芝孢子粉主要活性成分包括多糖、三萜、甾醇、生物碱和无机元素等, 具有抗肿瘤、抗癫痫、增强免疫、调节血糖血脂等一系列药理作用^[1-3]。从显微结构上看, 灵芝孢子具有由几丁质和葡萄糖构成的双层细胞壁^[4], 质地坚韧。为提高活性成分在体内的吸收, 绝大多数产品都采用不同工艺对其进行破壁处理。目前最常用的破壁方法为振动磨超微粉碎, 该法破壁率高、能耗小, 但有可能引入铬等重金属^[5]。采用物料自身碰撞粉碎的超音速气流法无需使用介质, 能在一定程度上避免重金属污染。

无机元素是生物体的基本组成之一, 体内含量一般 $\leq 5\%$, 对生长和代谢起着重要作用^[6], 但当其浓度过高时, 则有可能使细胞失去正常功能, 产生不良反应^[7]。因此测定生物体内无机元素的含量, 对于保证有效性和安全性都有重要意义。已有学者对灵芝孢子粉中无机元素进行分析^[8-9], 但分析的元素较少, 且不同破壁工艺之间的差异尚未见报道。电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)是近年来发展迅速的一项技术, 灵敏度高、分析范围广, 已被广泛应用于食品、卫生、医药等行业^[10]。本实验运用 ICP-MS 分析灵芝孢子粉中 16 种无机元素, 并比较了振动磨超微粉碎和超音速气流粉碎 2 种不同破壁工艺对无机元素含量的影响, 为灵芝孢子粉的物质基础研究和生产工艺改进提供依据和参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 7700X ICP-MS(美国 Agilent 公司); MARS6-XP55T 微波消解系统(美国培安公司); Direct Q-5 纯水设备(美国密理博公司); BT125 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 标准物质及试剂

元素标准溶液 V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Pb、As、Se、Cd、Sn、Sb、Ti、Hg, 混合内标溶液 Sc、Ge、Bi、In, HNO_3 (优级纯)均购自美国 Agilent 公司; 超纯水自制; HCl(分析纯, 上海国药化学试剂公司)。

1.3 样品

灵芝孢子粉原料(YL)采收于浙江武义, 过 100 目筛除去杂质, 经浙江寿仙谷珍稀植物药研究院李明焱研究员鉴定为赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst 的干燥孢子; 振动磨破壁样品(ZD)、气流粉碎破壁样品(QL)为采用上述原料, 经相应破壁工艺制备而得, 由浙江省珍稀植物药工程技术研究中心提供。

2 方法与结果

2.1 ICP-MS 测定条件

等离子体气 $15\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 载气 $0.7\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 补偿气 $0.45\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 雾化室温度 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 碰撞气模式(He) $4.5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 射频功率 $1\ 550\text{ W}$, 积分时间 0.3 s , 数据采集次数 3 次。

2.2 溶液的配制

2.2.1 供试品溶液制备 精确称取样品 0.2 g 置于聚四氟乙烯消解罐中, 加入 4.5 mL 70%浓 HNO_3 , 0.5 mL 60%浓盐酸, 密闭后进行微波消解: 5 min 升至 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并维持 2 min , 3 min 升至 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并维持 2 min , 5 min 升至 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并维持 2 min , 5 min 升

至 210 ℃, 2 min 升至 220 ℃并维持 10 min。消解完全后冷却, 转移至 25 mL 量瓶并用超纯水定容, 摇匀即供试品溶液。

2.2.2 标准溶液制备 精密吸取 16 种待测元素的标准溶液适量, 用 2% HNO₃ 配制成储备液, 再用 2% HNO₃ 稀释成 2 组工作溶液: Hg 单标溶液的浓度为 0.5, 1, 2, 5 μg·L⁻¹; 其余 15 种元素为混标, 其中 Fe 的浓度为 10, 50, 100, 500 μg·L⁻¹, 其他元素的浓度为 1, 5, 10, 50 μg·L⁻¹。空白溶液为 2% HNO₃ 溶液。

2.2.3 内标溶液制备 精密吸取 Sc、Ge、Bi、In 混合内标溶液适量, 用 2% HNO₃ 配制成浓度为 100 μg·L⁻¹ 的内标工作液。

2.3 方法学验证

2.3.1 标准曲线和检出限 取“2.2.2”项下标准溶液, 按“2.1”项下方法进行测定, 同时采用在线内标加入法校正信号响应, 消除基体效应或仪器漂移。以待测元素和内标元素的计数值比值为纵坐标, 待测元素的浓度为横坐标, 绘制 16 种元素的标准曲线, 计算相关系数, 并计算仪器的检出限, 公式为: 检出限(μg·L⁻¹)=[3σ/(S-B)]×ρ, 式中 σ 为空白溶液中各元素每秒计数值的标准偏差(n=10); ρ 为各元素标准溶液的浓度; S 和 B 分别为各元素在标准溶液和空白溶液的每秒计数值。结果见表 1。各元素线性良好, 检出限低, 能满足痕量分析要求。

表 1 16 种无机元素的标准曲线和检出限

Tab. 1 Calibration curves and LOD of the elements

元素	内标	标准曲线	相关系数(r)	检出限/μg·L ⁻¹
V	Sc	Y=0.029 5X+0.000 3	1.000 0	0.001 2
Cr	Sc	Y=0.038 0X+0.000 7	1.000 0	0.008 2
Mn	Sc	Y=0.026 3X+0.000 2	1.000 0	0.006 8
Fe	Sc	Y=0.037 0X+0.017 6	1.000 0	0.021 3
Co	Sc	Y=0.068 5X+0.000 1	1.000 0	0.000 4
Ni	Ge	Y=0.025 1X+0.000 8	1.000 0	0.012 6
Cu	Ge	Y=0.063 4X+0.001 9	1.000 0	0.007 4
Zn	Ge	Y=0.012 3X+0.001 8	0.999 9	0.057 7
As	Ge	Y=0.007 2X+0.000 1	0.999 9	0.016 1
Se	Ge	Y=0.000 9X+0.000 1	1.000 0	0.101 5
Cd	Ge	Y=0.062 9X+0.000 5	1.000 0	0.000 5
Sn	In	Y=0.003 6X+0.000 2	0.999 9	0.002 8
Sb	In	Y=0.004 1X+0.007 1	0.999 7	0.077 9
Hg	Bi	Y=0.001 0X+0.000 1	0.999 7	0.002 2
Tl	Bi	Y=0.011 5X+0.000 6	0.999 9	0.000 2
Pb	Bi	Y=0.008 1X+0.000 2	1.000 0	0.004 4

2.3.2 仪器精密度实验 取低、中、高 3 个浓度的标准溶液(Hg 0.5, 2, 5 μg·L⁻¹, Fe 10, 100, 500 μg·L⁻¹, 其他元素 1, 10, 50 μg·L⁻¹), 连续测定 6 次, 计算响应值的 RSD 值。结果所有元素的 RSD 值为 0.35%~3.45%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性实验 精密称取 YL 样品 6 份, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 测定各元素含量并计算 RSD 值。结果 6 份样品各元素 RSD 值 1.78%~6.82%, 表明重复性较好, 能满足测试要求。

2.3.4 加样回收率实验 精密称取 YL 样品 7 份, 置于聚四氟乙烯消解罐中, 根据样品实际测得元素含量加入“2.2.2”项下标准溶液适量, 再按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率及 RSD 值, 结果见表 2, 表明各元素的加样回收率在 80%~120%, RSD<5%, 满足分析要求。

表 2 16 种无机元素的加样回收率

Tab. 2 The spiked recoveries of the elements

元素	原有值/μg	加入值/μg	测得值/μg	平均回收率/%	RSD/%
V	0.028 2	0.050 0	0.082 9	106.0	2.32
Cr	0.033 0	0.050 0	0.083 4	100.5	4.77
Mn	0.652 4	0.500 0	1.168 6	101.4	1.04
Fe	7.875 6	5.000 0	12.67 2	98.4	0.55
Co	0.008 9	0.005 0	0.013 5	97.6	1.26
Ni	0.022 8	0.050 0	0.080 9	111.2	1.62
Cu	3.574 1	1.000 0	4.328 5	94.6	0.41
Zn	3.324 8	1.000 0	4.165 7	96.3	1.02
As	0.019 5	0.010 0	0.030 4	103.4	3.10
Se	0.012 2	0.010 0	0.017 9	80.9	1.01
Cd	0.065 0	0.050 0	0.106 1	92.3	2.41
Sn	0.025 7	0.050 0	0.090 4	119.4	2.01
Sb	0.055 8	0.050 0	0.104 3	98.6	0.19
Hg	0.005 2	0.010 0	0.015 1	99.2	2.53
Tl	0.000 2	0.000 1	0.000 3	100.7	4.89
Pb	0.018 1	0.010 0	0.029 8	106.1	1.76

2.4 样品无机元素含量测定

取 YL、ZD、QL 样品 3 份, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定。将样品管插入供试品溶液中, 取 3 次读数的平均值, 代入标准曲线计算相应的元素含量, 结果见表 3。

3 讨论

本实验采用微波消解-ICP-MS 建立了灵芝孢子粉中 16 种无机元素的定量分析方法, 并优化了消解条件和内标选择。结果表明该方法分析速度

快、回收率高、灵敏度好,为灵芝孢子或其他中药材的元素分析和质量控制提供了科学依据和技术手段。实验中还发现,Hg 容易在仪器中残留,对后续分析造成影响。可以采用单标分析、稀释高浓度 Hg 样品、消解前加少量浓盐酸并在清洗液中加入适量 Au 溶液来抑制 Hg 的吸附效应。

表3 灵芝孢子粉原料及2种不同破壁工艺样品中16种无机元素含量($n=3$)

Tab. 3 The contents of 16 inorganic elements in *Ganoderma lucidum* spore powder and samples with two treatments of wall-broken methods($n=3$)

元素	样品含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$					
	YL	RSD/%	ZD	RSD/%	QL	RSD/%
V	0.136	1.31	0.173	0.78	0.105	2.32
Cr	0.209	1.33	27.11 ²⁾	1.07	0.573 ²⁾	2.31
Mn	3.142	0.47	7.072 ²⁾	0.65	3.832	1.67
Fe	37.91	0.79	141.2 ²⁾	1.01	76.12 ²⁾	1.88
Co	0.043	1.22	0.182 ²⁾	0.98	0.104 ²⁾	1.67
Ni	0.110	1.89	13.12 ²⁾	1.67	0.273 ²⁾	1.95
Cu	17.21	0.65	19.34	2.13	10.92	1.64
Zn	16.01	0.35	18.70	0.21	13.53	1.83
As	0.094	1.64	0.943 ²⁾	2.45	0.083	3.76
Se	0.059	3.31	0.771 ²⁾	0.99	0.052	7.48
Cd	0.313	1.02	0.301	1.73	0.207	0.74
Sn	0.124	1.34	0.157	2.45	0.122	1.06
Sb	0.269	0.9	0.568 ¹⁾	0.09	0.346	0.50
Hg	0.025	1.62	0.029	1.05	0.019	1.43
Tl	0.001	5.24	0.001	2.64	0.001	6.92
Pb	0.087	0.40	0.087	0.33	0.096	0.54

注:与YL组相比,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with YL group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

分析结果显示,灵芝孢子粉中Mn、Fe、Cu、Zn 含量较为丰富。Mn 可促进骨骼的生长,维持正常糖脂代谢,改善机体造血功能。Fe 是血红蛋白、肌红蛋白和细胞色素的主要组成,对免疫系统有着重要的影响。Cu 和 Zn 也是生物体中不可缺少的微量元素,在生长发育、吸收、代谢等方面都起着重要作用^[11]。此外,灵芝孢子粉中还含有Se、Sn 等对机体有益的元素,具有较高的营养价值。

振动磨超微粉碎和超音速气流粉碎 2 种不同破壁工艺对无机元素含量的影响差异较大。ZD 样品中, Cr、Fe、Mn、Ni、Co、As、Se、Sb 的含量与 YL 相比显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 主要因为破壁过程中原料与设备的长时间接触及猛烈

震动使不锈钢容器中 Cr、Fe、Mn、Ni 等元素对物料造成了污染。而 QL 样品中虽然 Cr、Fe、Ni、Co 的含量相比 YL 也明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但与 ZD 相比, 升高倍数减小 1.75~48 倍。因为超音速气流粉碎是利用超音速低温气流的巨大能量使原料发生互相冲击、碰撞和摩擦, 减少与设备的直接接触, 避免了重金属污染。而 As、Se 含量的升高还需进一步确认和研究, 可能同样源自设备或不锈钢容器的杂质元素。

参照 GB 2762-2012《食品中污染物限量》, 食用菌及其制品中 $\text{Pb}\leq 1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{Cd}\leq 0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{Hg}\leq 0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{As}\leq 0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{Ni}\leq 1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (参照油脂及其制品), $\text{Cr}\leq 1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (参照谷物及其制品), YL 和 QL 符合要求, ZD 中 As、Ni、Cr 超标。这表明与传统振动磨粉碎相比, 超音速气流粉碎不易引入重金属污染, 是一种相对更优的破壁工艺。近年来屡有研究报道中药材及其制品造成的不良反应或器官损伤^[12], 这其中有源于药材自身化学成分的原因, 但种植生产加工过程中引入的重金属、农药、真菌毒素等也同样是一个不容忽视的因素。目前针对这方面的监管力度较弱, 相关标准也尚未完善。国家和行业应制订出台符合产业发展需求的标准体系, 促进中药产业的健康发展, 提高国际竞争力。

REFERENCES

- [1] PATERSON R R. *Ganoderma*-a therapeutic fungal biofactory [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(18): 1985-2001.
- [2] SANODIYA B S, THAKUR G S, BAGHEL R K, et al. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 10(8): 717-742.
- [3] WANG S Q, LI X J, ZHOU S, et al. Intervention effects of *ganoderma lucidum* spores on epileptiform discharge hippocampal neurons and expression of neurotrophin-4 and N-cadherin [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61687.
- [4] LIN Z B, WANG P Y. The pharmacological study of *Ganoderma* spores and their active components [J]. *J Peking Univ Health Sci* (北京大学学报医学版), 2006, 38(5): 541-547.
- [5] ZHAO X Y, NI W F, XING Z T, et al. Effect of sporoderm breakage on the quality of *Ganoderma lucidum* spore powders [J]. *Acta Edulis Fungi*(食用菌学报), 2011, 18(3): 71-73.
- [6] FALANDYSZ J, BOROVICKA J. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 92(2): 477-501.
- [7] HAYDON M J, COBBETT C S. Transporters of ligands for essential metal ions in plants [J]. *New Phytol*, 2007, 173(3): 499-506.
- [8] CHEN J H, WU F Q, LI W L, et al. Comparison of contents of triterpenoids, polysaccharides and heavy metals in *Ganoderma lucidum* sporule powder and *Ganoderma lucidum* [J]. *China*

Pharm(中国药房), 2008, 19(33): 2585-2587.

- [9] CHENG Q L, YANG S P, XIAHOU G L. Determination of trace elements in *Ganoderma lucidum* by atomic absorption spectrometry [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(4): 878-880.
- [10] ZHU L J, CHEN Y D, WU Y J. Determination of 10 elements in vacant gelatin capsules by ICP-MS [J]. Chin J Mod Appl

Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(11): 1228-1232.

- [11] LIU R H. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet [J]. Adv Nutr, 2013, 4(3): 384-392.
- [12] BUNCHORNTAVAKUL C, REDDY K R. Review article: herbal and dietary supplement hepatotoxicity [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2013, 37(1): 3-17.

收稿日期: 2013-12-17