ICS

团　　体　　标　　准

T/FJHX 001-2021

破壁灵芝孢子粉

sporoderm-broken ganoderma spore

(征求意见稿)

2021-XX-XX 发布　　2021-XX-18 实施

福建省食用菌行业协会　　发 布

目　　次

前　　言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　技术要求 1
3.1　原辅料要求 1
3.2　感官要求 2
3.3　鉴别 2
3.4　标志性成分及含量 2
3.5　理化指标 2
3.6　微生物指标 3
3.7　净含量及允许负偏差 3
4　生产加工过程的卫生要求 3
5　检验规则 3
5.1　原辅料入库检验 3
5.2　组批 3
5.3　抽样方法与数量 3
5.4　检验类别、 3
5.5　判定规则 4
6　标志、标签、包装、运输和贮藏 4
6.1　标志、标签 4
6.2　包装 4
6.3　运输 4
6.4　贮藏 4
7　保质期 4
附录 A（规范性附录）　多糖的测定方法 5
附录 B（规范性附录）　总三萜的测定方法 7
附录 C（规范性附录）　β-葡聚糖的测定方法 9
附录 D（规范性附录）　腺苷的测定方法 11
附录 E（规范性附录）　破壁率的测定方法 13

前　　言

本标准编写格式要求按GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》组织编写。

本标准由福建省食用菌行业协会提出并负责组织制定。

本标准主要起草单位：福建仙芝楼生物科技有限公司、仙芝科技（福建）股份有限公司、福建中医大学、中国医学科学院药用植物研究所、浦城县仙草灵芝专业合作社

本标准起草人：

破壁灵芝孢子粉

1 范围

本标准规定了破壁灵芝孢子粉的技术要求、试验方法、检验规则、标志、标签、包装、运输和贮藏。

本标准适用于多孔菌科真菌赤芝*Ganoderma lucidum*（Leyss.exFr.）Karst.、紫芝（*Ganoderma sinense* Zhao，Xu et Zhang ）或松杉灵芝（*Ganoderma tsugae*）的干燥成熟孢子，经灭菌（辅照灭菌和湿热灭菌等）、干燥、低温物理破壁、过筛等工艺制成的用于保健食品加工原料的破壁灵芝孢子粉。

本标准不适用于非保健食品加工原料。

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，仅该日期对应的版权本适用于本文件；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 191 包装储运图示标志

GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验总则

GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定

GB 4789.3 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数

GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB 4789.10 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

GB 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数

GB 5009.3 食品安全国家标准 食品中水分的测定

GB 5009.4 食品安全国家标准 食品中灰分的测定

GB 5009.227 食品安全国家标准 食品中过氧化值的测定

GB 5009.268 食品安全国家标准 食品中多元素的测定

GB 5009.271食品安全国家标准 食品中邻苯二甲酸酯的测定

GB/T 5009.19 食品中有机氯农药多组分残留量的测定

GB/T 6543 运输包装用单瓦楞纸箱和双瓦楞纸箱

GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则

JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则

GB 17405 保健食品良好生产规范

国家质量监督检验检疫总局令（2005）第 75 号《定量包装商品计量监督管理办法》

《福建省中药饮片炮制规范》（2012年版）

3 技术要求

3.1 原辅料要求

灵芝孢子粉：应符合《福建省中药饮片炮制规范》（2012 年版）的要求。

3.2 感官要求

感官要求应符合表1的规定。

表1 感官要求

项　　目	指　　标	检验方法
色泽	棕褐色	取本品适量，放入洁净的白色瓷盘中，在自然光下观察色泽和状态，嗅其气味，用温开水漱口，品其滋味。
滋味、气味	气微，味淡或微苦	
状态	无结块，干燥疏松细腻粉末，无粘连，无沙粒感，无正常视力可见外来异物	

3.3 鉴别

显微鉴别：粉末棕褐色，置显微镜下观察，孢壁多破碎，可见多数黄褐色的大小不等的微粒、孢子破碎程度不同的壳段或孢子破碎后里面的黄色至黄褐色的内容物，少见有未破壁的孢子，不得检出子实体、菌丝、淀粉粒等异物。

3.4 标志性成分及含量

标志性成分应符合表2的规定。

表2 标志性成分及含量

项　　目		指　　标	检验方法
多糖（以无水葡萄糖（$C_6H_{12}O_6$）计），g/100g	≥	1.35	按附录 A 多糖的测定方法
总三萜（以齐墩果酸计），g/100g	≥	6.0	按附录 B 总三萜的测定方法
β-葡聚糖，g/100g	≥	1.20	按附录 C 葡聚糖的测定方法
腺苷，mg/100g	≥	1.8	按附录 D 腺苷的测定方法

3.5 理化指标

理化指标应符合表3的规定。

表3 理化指标

项　　目		指　　标	检验方法
水分，g/100g	≤	8.0	GB 5009.3
总灰分，g/100g	≤	3.0	GB 5009.4
破壁率，%	≥	98.0	按附录 E 破壁率的测定方法
蛋白质，g/100g	≥	14.0	GB 5009.5
过氧化值，g/100g	≤	0.15	GB 5009.227
铅（以 Pb 计），mg/kg	≤	1.5	GB 5009.268
砷（以 As 计），mg/kg	≤	1.0	
汞（以 Hg 计），mg/kg	≤	0.1	
镉（以 Cd 计）/（mg/kg）	≤	0.5	
铬（以 Cr 计）/（mg/kg）	≤	2.0	
镍（以 Ni 计）/（mg/kg）	≤	1.0	

邻苯二甲酸二正丁酯(DBP，以灵芝孢子油计) ≤	0.3	GB 5009.271
邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP，以灵芝孢子油计) ≤	1.5	
邻苯二甲酸二异壬酯(DINP，以灵芝孢子油计) ≤	9.0	

3.6 微生物指标

微生物指标应符合表4的规定。

表4 微生物指标

项 目	指标	检测方法
菌落总数， CFU/g ≤	10000	GB 4789.2
大肠菌群， MPN/g ≤	0.92	GB 4789.3 MPN计数法
霉菌和酵母，CFU/g ≤	50	GB 4789.15
金黄色葡萄球菌 ≤	0/25 g	GB 4789.10
沙门氏菌 ≤	0/25 g	GB 4789.4

3.7 净含量及允许负偏差

应符合国家质量监督检验检疫总局令（2005）第 75 号《定量包装商品计量监督管理办法》的规定。

4 生产加工过程的卫生要求

应符合 GB 17405 的规定。

5 检验规则

5.1 原辅料入库检验

原辅料需按各自相关质量标准检验合格后，方可入库。

5.2 组批

使用同一台混合设备一次混合量所生产的均质产品为一批。

5.3 抽样方法与数量

取样按批（包装单位：箱）取样，设总包装单位为n，则n≤3时，每件取样； n＞3时，取样件数为$\sqrt{n}$+1。常规取样量需取全检所需数量的3倍。

5.4 检验类别、

5.4.1 出厂检验

5.4.1.1 产品出厂前须经质量检验部门检验合格并签发合格证书后，方可出厂。

5.4.1.2 出厂检验项目为感官、净含量、水分、灰分、破壁率、蛋白质、灵芝孢子多糖、灵芝三萜及甾醇、菌落总数、大肠菌群、霉菌与酵母指标。

5.4.2 型式检验

5.4.2.1　型式检验项目包括该标准技术要求中所有项目。

5.4.2.2　型式检验正常生产情况下每年进行一次，发生下列情况之一亦应进行：

a)　正常生产每年时；

b)　停产半年以上，恢复生产时；

c)　原料来源发生变化或主要设备发生改变，可能影响产品质量时；

d)　出厂检验与上次型式检验有较大差异时。

e)　国家食品安全监督机构有要求时。

5.5　判定规则

5.5.1　全部检测项目经检验合格的产品为合格品。

5.5.2　微生物指标检测不符合本标准时，则判定该批产品不合格，微生物指标不得复检。

5.5.3　如果其他指标检测不符合本标准时，可重新抽取双倍样品，对不合格项进行复检。复检结果仍有一项指标不符合规定时，则判定该批产品不合格。

6　标志、标签、包装、运输和贮藏

6.1　标志、标签

产品包装物上的标签、标示应符合保健食品标识规定。包装储运图标志应符合GB/T 191的规定。

6.2　包装

包装材料和容器应符合国家有关规定及相关卫生要求。

6.3　运输

运输工具应清洁卫生，不得与有毒、有害、有异味的物品混装、混运，防止日晒雨淋及撞击，小心轻放，不得压踏。

6.4　贮藏

6.4.1　产品应放于通风干燥的仓库内，严禁与有毒、有害有异味、影响产品质量的物品混放。

6.4.2　应距离周围墙壁 20cm 以上，距离地面 10cm 以上。

7　保质期

产品在符合本标准 6.3、6.4 规定的条件下，保质期为 24 个月。

附　录　A
（规范性附录）
多糖的测定方法

A.1　方法提要

灵芝孢子多糖经乙醇沉淀分离后，去除其他可溶性糖及杂质的干扰，糖与硫酸在沸水浴中加热脱水生成羟甲基呋喃甲醛（羟甲基糖醛），再与蒽酮缩合成蓝绿色化合物，其呈色强度与溶液中糖的浓度成正比，在 625nm 波长下比色定量。

A.2　仪器与设备

A.2.1　电子分析天平：精度0.1 mg
A.2.2　紫外可见分光光度计：±2 nm。
A.2.3　离心机：（0～4000）rpm/min。
A.2.4　电热恒温水浴锅：±0.5 ℃。

A.3　试剂与溶液

A.3.1　除非另有说明，所有试剂均使用分析纯试剂；分析用水应符合GB/T 6682规定的三级水规格。
A.3.2　无水乙醇。
A.3.3　葡萄糖对照品的配制：准确称取干燥至恒重的葡萄糖对照品适量，精密称定，加水制成每1 mL含0.2 mg的溶液，即得。
A.3.4　硫酸蒽酮溶液的制备(临用现配)：准确称取0.1 g蒽酮置于烧杯中，缓缓加入100 mL 80%硫酸溶解，摇匀，即得

A.4　分析步聚

A.4.1　标准曲线的绘制：

分别精密量取葡萄糖对照品溶液 0.0mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL，分别置于具塞试管中，补充水至 2.0 mL，加入硫酸蒽酮溶液 6 mL，立即摇匀，置沸水浴中加热 15 min，取出，立即放入冰浴中冷却 15 min，取出，以相应的试剂为空白，用紫外可见分光光度计在 625 nm 波长处测定吸光度。以葡萄糖质量为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

A.4.2　样品的处理与测定

A.4.2.1　样品提取：取混合均匀的样品2 g，准确称取，置于圆底烧瓶中，加水80 ml左右，装上磨口的空气冷凝管或回流冷凝管，于沸水浴上加热8 h,冷却至室温后转移至100 ml的容量瓶中，补加水至刻度，混匀，过滤，弃去初滤液，收集余下滤液。
A.4.2.2　沉淀灵芝孢子多糖：精密吸取以上滤液5 mL（V_2），置于150 mL碘量瓶中，加入无水乙醇75 mL，摇匀，　于4℃冰箱放置12 h，取出，以4000 rpm离心10 min，弃去上清液。残渣用水溶解并定容至50 mL（V_3），混匀后供测定。
A.4.2.3　样品的测定：精密移取供试品溶液2 mL（V4），按标准曲线下方法，自“加入硫酸蒽酮溶液6.0 mL”起，依法测定吸光度值。

A.5 结果计算

$$X=\frac{(W_1-W_2)\times 10^2}{M\times\frac{V_2}{V_1}\times\frac{V_4}{V_3}} \quad \text{.....} \quad (A.1)$$

式中：

X— 样品中灵芝孢子多糖含量（以葡萄糖计），mg/100g；

W_1—从标准曲线上查得样品测定液中含灵芝孢子多糖的质量，mg；

W_2—从标准曲线上查得样品空白液中含灵芝孢子多糖的质量，mg；

M— 样品质量，g；

V_1—样品提取液总体积，ml；

V_2—沉淀灵芝孢子多糖所用样品提取液体积，ml；

V_3—样品测定液总体积，ml；

V_4—比色测定时所移取样品测定液的体积，ml。

附　录　B
（规范性附录）
总三萜的测定方法

B.1　方法提要

将样品溶于乙酸乙酯中并于100 ℃ 水浴上蒸干后，加入香草醛—冰醋酸溶液和高氯酸，于70 ℃水浴加热15min，再加入乙酸乙酯用分光光度计测定样品中的灵芝三萜及甾醇含量。

B.2　仪器与设备

B.2.1　电子分析天平：精度0.1 mg
B.2.2　紫外可见分光光度计：±2 nm。
B.2.3　超声波清洗器：功率≥45 W。
B.2.4　电热恒温水浴锅：±0.5 ℃。

B.3　试剂与溶液

B.3.1　除非另有说明，所有试剂均使用分析纯试剂；分析用水应符合GB/T 6682规定的三级水规格。
B.3.2　齐墩果酸对照品：纯度≥98 %。
B.3.3　高氯酸。
B.3.4　冰醋酸。
B.3.5　香草醛。
B.3.5.1　乙酸乙酯。
B.3.6　齐墩果酸对照品溶液：准确称取经五氧化二磷减压干燥12小时以的齐墩果酸对照品适量，置容量瓶中，用乙酸乙酯溶解，超声15 min，并稀释至刻度，摇匀，制成0.1 mg/ml 的对照品溶液。
B.3.7　5%香草醛—冰醋酸溶液：准确称取香草醛0.50 g，加冰醋酸使溶解成10 ml，即得。

B.4　分析步聚

B.4.1　标准曲线的绘制

分别精密吸取 0.0 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL 对照品溶液于 10 mL 试管中，于 100 ℃水浴上蒸干后，加入 0.2 mL 香草醛冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸，摇匀，在 70℃水浴中加热 15 min，立即置冰浴中冷却 5 min，取出，精密加入乙酸乙酯 4 mL，摇匀。用分光光度计于 546 nm 波长下测定对照品溶液的吸光度。分别以齐墩果酸质量为横坐标和吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。

B.4.2　样品的处理与测定

B.4.2.1　样品的提取:取破壁灵芝孢子粉0.1 g（M），准确称取，置100 ml（V_1）容量瓶中，加入无水乙醇80mL溶解，超声提取30 min，并稀释至刻度，摇匀，过滤。
B.4.2.2　样品的测定：精密吸取0.3ml（V_2）滤液于10 ml的试管中，于100 ℃水浴上蒸干后，加入0.20 ml 5% 香草醛—冰醋酸和1.00 ml高氯酸，摇匀，于70 ℃水浴中加热15 min，立即置冰浴中冷却5 min，取出，精密加入乙酸乙酯4mL，摇匀。后用分光光度计于546 nm波长下测定样品溶液的吸光度。

B.5 结果计算

$$X = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{M \times \frac{V_2}{V_1}} \quad \text{(B.1)}$$

式中：

X— 样品中灵芝三萜及甾醇含量（以齐墩果酸计），mg/100g；

W_1—从曲线上查得样品测定液中含灵芝三萜及甾醇的质量，mg；

W_2—从曲线上查得样品空白液中含灵芝三萜及甾醇的质量，mg；

M— 样品质量，g；

V_1—样品测定液总体积，ml；

V_2—比色测定时所移取样品测定液的体积，ml。

附　录　C
（规范性附录）
β-葡聚糖的测定方法

C.1　试剂和材料

C.1.1　硫酸（分析纯）
C.1.2　无水葡萄糖对照品（购买于中国食品药品检定研究院）
C.1.3　无水乙醇（分析纯）
C.1.4　硫酸蒽酮溶液：精密称取蒽酮0.1 g，加硫酸溶液100 mL使溶解，摇匀，置于棕色瓶中即得。
C.1.5　中温α-淀粉酶（4000U/g）
C.1.6　糖化酶（10000U/g）
C.1.7　盐酸（分析纯）

C.2　仪器和设备

C.2.1　分析天平（感量0.0001g）
C.2.2　分光光度计（±2nm）
C.2.3　玻璃回流装置
C.2.4　电热恒温水浴锅
C.2.5　离心机
C.2.6　容量瓶25 mL，100 mL
C.2.7　各规格移液管（最小刻度应不大于0.02ml）
C.2.8　具塞试管10 mL
C.2.9　滤纸（中速定性滤纸）
C.2.10　离心管50mL
C.2.11　滴管

C.3　标准曲线的制备

C.3.1　对照品溶液的制备

取无水葡萄糖对照品 12mg，准确称取，加水制成每 1mL 含 0.12mg 的溶液，即得。

C.3.1.1　标准曲线绘制

精密量取对照品溶液 0.2mL、0.4mL、0.6mL、0.8mL、1.0mL、1.2 mL，分别置 10 mL 的具塞试管中，各加水至 2.0 mL，迅速精密加入硫酸蒽酮溶液 6 mL，立即摇匀，放置 15 min 后，立即置冰浴中冷却 15 min，取出，以相应的试剂为空白，在 625 nm 波长处测定吸光度，以吸光度为纵坐标，以葡萄糖质量为横坐标，绘制标准曲线。

C.4　供试品溶液的制备

取本品约 2g（M），精密称定，置圆底烧瓶中，加水 60 mL，静置 1 小时，加热回流 4 小时，趁热过滤，用少量热水洗涤滤器和滤渣，将滤渣及滤纸置烧瓶中，加水 60 mL，加热回流 3 小时，趁热滤过，合并滤液，置水浴锅上蒸干，残渣用水溶解，转移至 25mL（V_1）容量瓶，定容，将溶液转移至 50mL 离心管，加入 30mg 中温α-淀粉酶，55℃水浴，酶解 1h，用滴管滴入 1 滴（约 0.02mL）0.1mol/L 盐酸，加入 30mg 糖化酶，55℃水浴，酶解 1h，离心取 5mL 上清液转移至三角烧瓶，边搅拌边缓慢滴加无水乙醇 75 mL，摇匀，在 4℃放置 12 小时，离心，4000r/min，弃去上清液，沉淀物用 25mL 无水乙醇洗涤，4000r/min，沉淀物用热水溶解并转移至 100 mL 量瓶中，放冷，加水至刻度，摇匀，离心，取上清液，即得。

C.5 测定

精密量取供试品溶液 2 mL（V_2），置 10 mL 具塞试管中，照标准曲线制备项下的方法，自“迅速精密加入加入硫酸蒽酮溶液 6 mL”起，同法操作，测定吸光度，从标准曲线上读出供试品溶液中无水葡萄糖的质量 C，计算即得。

C.6 结果计算

$$W = \frac{C \times F \times \frac{V_1}{V_2}}{M \times 1000} \times 100 \qquad \text{（C.1）}$$

式中：

W-多糖的含量，g/100g；

C -从标准曲线上查得样品的无水葡萄糖质量，mg；

M -样品质量，g；

F - 稀释倍数，F = 100/5；

V_1- 蒸干残渣经热水溶解定容的体积数值，V_1= 25，mL；

V_2- 参与反应的体积数值，V_2= 2，mL。

附　录　D
（规范性附录）
腺苷的测定方法

D.1　试剂

D.1.1　除非另有规定，仅使用分析纯试剂和符合GB/T6682中规定的一级水。
D.1.2　乙腈(C2H3N)，色谱纯。
D.1.3　腺苷标准物质(色谱级，纯度>95%)。
D.1.4　腺苷标准溶液：准确称取腺苷(5.1.2)标准品10　mg(按实际含量折算)，用流动相溶解定容至100mL，摇匀。该混合标准储备液中腺苷的质量浓度均为100　μg/mL，4℃冰箱保存，有效期1个月。

D.2　仪器和谈备

D.2.1　高效液相色谱仪，配有紫外检测器或者二极管阵列检测器。
D.2.2　超声波清洗器，功率大于450　W，频率50　Hz～100　Hz。
D.2.3　分析天平，感量0.0001g。
D.2.4　微孔滤膜，0.45 μm，水相。
D.2.5　离心机。
D.2.6　实验室样品粉碎机。

D.3　测定步骤

D.3.1　试样制备：称取粉碎均匀的样品0.5g(M，精确至0.0001g)于10　mL.（V）容量瓶中，加水约8　mL，置于超声波仪中超声提取3h，取出后用水定容，摇匀。取1mL.样液离心后，将上清液过0.45　μm微孔滤膜（5.2.4)，滤液供高效液相色谱法分析。

D.3.2　液相色谱测定

D.3.2.1　液相色谱条件

D.3.2.1.1　色谱柱：C18柱，250 mm×4.6 mm(i.d.)，5 μm，或相当规格色谱柱。
D.3.2.1.2　流动相：乙睛+水=5+95，用前过0.45μm滤膜，脱气。
D.3.2.1.3　流速：1.0 mL/min。
D.3.2.1.4　柱温：35℃。
D.3.2.1.5　波长：260 nm。
D.3.2.1.6　进样量：10 μL。

D.3.2.2　标准曲线的绘制

准确吸取0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL和5.0 mL标准溶液(5.1.3)于10 mL容量瓶中，用水定容、摇匀，该标准曲线浓度为1.00 μg/ mL、2.00 μg/mL、5.00 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL和50.0 μg/mL，按参考色谱条件测定，以腺苷质量浓度为横坐标，相应的峰面积为纵坐标，计算标准曲线，求线性回归方程。

D.3.2.3　测定

按照保留时间进行定性，样品与标准品保留时间的相对偏差不大于2%，多点校正外标法定量。待测样液中腺苷的响应值应在标准曲线范围内，超过线性范围则应稀释后再进样分析。

D.4 结果计算

$$X=\frac{A_1\times c\times V}{A_2\times M}\times\frac{100}{1000} \qquad \text{(D.1)}$$

式中：

X—腺苷的含量，mg/100g

A1-—试样中腺苷的峰面积；

A2——标准工作液中腺苷的峰面积；

C—-标准工作液中腺苷的质量浓度，单位为微克每毫升(μg/mL)；

V—-试样液最终定容体积，单位为毫升(mL)；

M—-试样的质量，单位为克(g)；

f—-单位换算因子。

计算结果保留三位有效数字。

附　录　E
（规范性附录）
破壁率的测定方法

E.1　方法提要

利用血球计数板对未破壁的孢子进行计数,分别计算出单位质量孢子粉中灵芝孢子的数量和单位质量破壁孢子粉中未破壁灵芝孢子的数量，从而获得破壁孢子粉的破壁率。

E.2　仪器与设备

E.2.1　血球计数板:25中格×16个小格，16个中格×25个小格
E.2.2　电子分析天平：精度0.1 mg
E.2.3　超声波清洗器：功率≥45W
E.2.4　光学显微镜：放大倍数≥200。

E.3　试剂和溶液

E.3.1　除非另有说明，所有试剂均使用分析纯试剂；实验用水应符合GB/T 6682规定的三级水规格。
E.3.2　吐温80。
E.3.3　蔗糖。

E.4　样品制备

分别取灵芝孢子粉和破壁灵芝孢子粉的样品各至少 10 g，分别充分混匀，置于密闭的容器内。

E.5　分析步聚

E.5.1　取适量的灵芝孢子粉A和破壁灵芝孢子粉B，于烘箱60 ℃下烘干5小时。
E.5.2　准确称取经烘干的孢子粉A和破壁灵芝孢子粉B，其中WA=0.1000 g，WB=0.1500 g
E.5.3　分别称取5.0 g经过研磨后过100目筛的蔗糖粉末分别与孢子粉A、B充分混合至色泽均一。用蒸馏水分别溶解上述样品，在样品溶液中加0.1 ml吐温80，用蒸馏水定容到100 ml的容量瓶中，并在室温超声震荡30 min，使孢子充分分散。
E.5.4　将待测孢子悬液,用吸管吸取一滴置于盖玻片的边缘,使液体缓缓渗入,多余的液体用吸水纸吸取,进样完成后静置约30 S,然后将血球计数板置于200倍及以上放大倍数的光学显微镜下进行观察计数。
E.5.5　使用25中格×16个小格的计数板时，应计算出血球计数板4个角上与中央5个中格中含完整灵芝孢子的数目(即以80个小格为一个计数单位)；当使用16个中格×25个小格的计数板时，应计算出血球计数板4个角上的4个中格中含完整灵芝孢子的数目(即以100个小格为一个计数单位)。如有部份孢子处于中格边线上,计数时应仅统计位于中格四个边线的其中两个边线的孢子数,每个样品观察计数时应去掉离群较大的值, 每个样品有效观察计数不少于3次,然后计算它们的平均数n。

E.6　结果计算

E.6.1　使用25中格×16个小格的计数板时每克孢子粉中含完整灵芝孢子数的计算

$$N = \frac{n}{80} \times 400 \times 10000 \times \frac{100}{W} \quad \text{(E.1)}$$

式中：

N—每克孢子粉含完整的灵芝孢子数，个/g

n—80个小格内含完整灵芝孢子的总数，个

100—孢子稀释液的体积数值；

400—指血球计数板的计数室内共有400个小方格；

10000—血球计数板计数室的容积为0.1 mm3，1 mL相当于10000个血球计数板计数室的容积。

W—样品的重量，g

E.6.2　使用16中格×25个小格的计数板时每克孢子粉中含完整灵芝孢子数的计算

$$N = \frac{n}{100} \times 400 \times 10000 \times \frac{100}{W} \quad \text{(E.2)}$$

式中：

N—每克孢子粉中含完整的灵芝孢子数，个/g

n—100个小格内含完整灵芝孢子的总数，个

100—孢子稀释液的体积数值；

400—指血球计数板的计数室内共有400个小方格；

10000—血球计数板计数室的容积为0.1 mm3，1 mL相当于10000个血球计数板计数室的容积。W—样品的重量，g

E.6.3　破壁率的计算

$$X = (1 - \frac{NB}{NA}) \times 100\% \quad \text{(E.3)}$$

式中：

X—破壁灵芝孢子粉的破壁率，%

NB—每克破壁灵芝孢子粉中含完整的灵芝孢子数，个/g

NA—每克灵芝孢子粉中含完整的灵芝孢子数，个/g