

# 灰树花中锌的存在形态分析

李 丹<sup>1</sup>, 陈贵堂<sup>2</sup>, 陈 琛<sup>1</sup>, 刘 芳<sup>1</sup>, 赵立艳<sup>\*</sup>

(1. 南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095; 2. 中国药科大学药学院, 江苏南京 210009)

**摘 要:**目的: 研究灰树花中锌的存在形态。方法: 通过单因素实验和正交实验, 优化了锌元素的提取工艺, 对灰树花水提液中微量元素锌进行了含量测定和形态分析, 采用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜和 D-101 型大孔吸附树脂将水提液中的锌分为悬浮态和可溶态、有机态和无机态, 并采用微波消解-火焰原子吸收光谱法测定了 Zn 元素各形态的含量。结果: 灰树花中锌元素的最佳提取条件为温度 40 $^{\circ}\text{C}$ , 时间 110min, 料液比 1:45, 在此条件下, 可溶态中锌的提取率达到 78.77%; 水提液中可溶态大约占 99.31%, 可溶态中无机态和有机态分别占 78.03% 和 22.39%。结论: 灰树花中微量元素锌主要以无机态形式存在。

**关键词:** 灰树花, 锌, 形态分析, 微波消解, 火焰原子吸收光谱法

## Study on the speciation of the Zinc in *Grifola frondosa*

LI Dan<sup>1</sup>, CHEN Gui-tang<sup>2</sup>, CHEN Chen<sup>1</sup>, LIU Fang<sup>1</sup>, ZHAO Li-yan<sup>\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Department of Food Quality and Safety, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Objective: To study the speciation of the Zinc in *Grifolan frondosa*. Methods: The working was analyzed by means of the single factor experiment and orthogonal experiment, extraction conditions were optimized and the content and speciation of trace element Zn in its water leaching were analyzed and discussed. By using 0.45  $\mu\text{m}$  filter membrane and D-101 macroreticular resins, four different species of the water leaching, namely the suspended, the soluble, the inorganic and organic species were obtained and separated. In the test, the sample was digested by using microwave digestion system, and the content of the Zinc in those species were determined by FAAS, respectively. Results: The best extracting condition was the ratio of material and liquid was 1:45, the temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$ , the extraction time was 110min, and the extraction rate 78.77% was obtained in this condition. The soluble Zn was about 99.31% in its water leaching, and the inorganic Zn and organic Zn was about 78.03% and 22.39%, respectively. Conclusion: The trace element Zn in *G. frondosa* was existing mainly in form of the inorganic.

**Key words:** *Grifola frondosa*; zinc; speciation analysis; microwave digestion; flame atomic absorption spectrometry

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)13-0133-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2014.13.020

灰树花是担子菌亚门, 树花菌属真菌, 是具有食用和药用等功能的珍奇真菌, 有佛菌、舞茸之称<sup>[1-2]</sup>。其营养丰富, 蛋白质、多糖等为主要的生物活性成分<sup>[3]</sup>。研究表明, 灰树花与其它食物共食时, 可以起到蛋白质互补作用, 平衡营养成分及提高机体对蛋白质的利用率等重要功能<sup>[4-5]</sup>。并且大量病理研究

表明, 灰树花多糖具有明显的抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等功能<sup>[6]</sup>。目前, 国内外对灰树花中多糖的分离提取及其生物活性等做了很多的研究, 但对其中微量元素的研究报道却很少<sup>[7-13]</sup>。

近年来, 有机成分与微量元素的协同作用引起学者们的广泛关注。一些研究表明, 微量元素与有机成分的配合物较原有机成分具有更强的生物活性<sup>[14-15]</sup>。同时, 微量元素的存在形态与其药理价值密切相关, 在不同的生理环境下, 微量元素具有不同的亲脂性和生理活性, 从而表现出不同的利用价值<sup>[16]</sup>。因此, 开展微量元素与有机成分相互关系的研究, 从本质上揭示微量元素与有机物的协同作用的规律,

收稿日期: 2013-11-13 \* 通讯联系人

作者简介: 李丹 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食 (药) 用菌资源开发与利用。

基金项目: 国家科技支撑计划“区域特产资源生态高附加值加工质量安全控制关键技术研究” (2012BAD36B02)。

using nitroxides [J]. Free Radical Biology Medicine, 2003, 35 (1): 59-67.

[22] Giandomenico A R, Cerniglia G E, Biaglow J E, et al. The

importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide [J]. Free Radical Biology Medicine, 1997, 23 (3): 426-434.

将为研究微量元素与食(药)用菌药用价值的关系提供依据<sup>[17-18]</sup>。

锌是正常人体生命过程中不可缺少的元素,对人体的生长发育、免疫等起着重要的影响和调节作用<sup>[19-20]</sup>。因此,研究灰树花中微量元素锌的含量、溶出特性及相关形态能够为阐明其药理作用机理以及探究加工工艺提供一定的信息和理论依据<sup>[21]</sup>。

本实验结合微量元素分析模型<sup>[22]</sup>和中草药微量元素形态分析的层次模式<sup>[23-24]</sup>,对可溶态中锌的提取率的主要影响因素进行优化,将微量元素锌的存在形态分为可溶态和悬浮态、无机态和有机态,利用微波消解-火焰原子吸收光谱法测定各形态中锌的含量及分布。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

灰树花 由河北迁西县板栗研发中心提供,将灰树花置于电热恒温鼓风干燥箱内,60℃干燥5h,待室温下冷却,用粉碎机粉碎成粉末,过60目的筛子,最后将灰树花粉末放于-20℃冰箱中冷冻保藏待用。

硝酸、无水乙醇、丙酮等为分析纯试剂;1000μg/mL Zn 标准储备液(国家标准物质中心);D-101 大孔吸附树脂 安徽三星树脂科技有限公司;实验用水均为去离子水。

中草药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司;万分之一天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-6 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司;TDL-5-A 离心机 上海安亭科学仪器厂;0.45μm 滤膜 上海市新亚净化器件厂;旋转蒸发器 上海爱朗仪器有限公司;CME MARS 密闭微波消解仪 美国 CEM 公司;火焰原子吸收光谱仪 北京普析通用仪器有限公司。

### 1.2 仪器及工作条件

1.2.1 微波消解仪的消解程序 实验中使用分析纯硝酸 10mL 进行样品消解,固体样品取不大于 0.5g,液体样品取 1~5mL,消解条件如表 1 所示。

表 1 微波消解的程序

Table 1 Procedure of microwave digestion

| 步骤 | 最大功率<br>(W) | 功率<br>(%) | 爬升时间<br>(min) | 温度<br>(℃) | 保持时间<br>(min) |
|----|-------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| 1  | 800         | 100       | 05:00         | 120       | 00:00         |
| 2  | 800         | 100       | 05:00         | 160       | 05:00         |
| 3  | 800         | 100       | 05:00         | 180       | 10:00         |

1.2.2 火焰原子吸收光谱仪的工作条件 火焰原子吸收光谱法的工作条件如表 2 所示。

表 2 仪器的工作条件

Table 2 Working conditions for FAAS

| 元素 | 波长<br>(nm) | 光谱带宽<br>(nm) | 工作灯电流<br>(mA) | 乙炔流量<br>(mL/min) | 燃气高度<br>(mm) |
|----|------------|--------------|---------------|------------------|--------------|
| Zn | 213.9      | 0.4          | 3             | 1800             | 6            |

1.2.3 锌标准曲线的配制 分析纯的硝酸配制成体积分数为 1% 的稀硝酸,作为锌的标准储备液的稀释液。取 1mL 锌的标准溶液(1000μg/mL),置于 100mL 的容量瓶中,用 1% HNO<sub>3</sub> 定容得 10μg/mL 的稀释液,分别取 0、1、3、4、5mL 稀释至 50mL 容量瓶中,用 1% 硝酸定容得标准溶液,锌的标准系列为:0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0μg/mL。

### 1.3 实验方法

1.3.1 灰树花原粉中锌总量的测定 准确称取 0.5000g 灰树花原粉,平行称取 3 份,置于微波消解罐中,加入 10mL 浓硝酸,放入微波消解仪器内,密闭微波消解,同时制作空白对照,消解程序见表 1。消解完全后将消解液倒入小锥形瓶中,置于电热板上赶酸,浓缩至 1mL 左右,冷却,转移至 100mL 容量瓶中,用 0.5% HNO<sub>3</sub> 定容,摇匀,待测,火焰原子吸收光谱法的工作条件见表 2。

1.3.2 锌的提取及可溶态与不可溶态的分离 平行称取 3 份取 2.0g 灰树花粉末,按照一定的料液比加入去离子水,在一定的温度下水浴一段时间,稍冷,离心(5000r/min, 10min),所得溶液为水提液。水提液经滤纸过滤,再用 0.45μm 微孔滤膜抽滤,即得可溶态溶液。用旋转蒸发器加热浓缩可溶态溶液至 20mL,取可溶态溶液 2mL 按 1.3.1 进行消化,赶酸,0.5% 硝酸定容至 50mL,待用火焰原子吸收光谱法测定可溶态中锌的含量。

可溶态中锌的提取率(%) = 可溶态溶液中锌含量(μg/g) / 灰树花原粉中锌含量(μg/g) × 100

1.3.2.1 单因素实验设计 温度对可溶态中锌提取率的影响:取 2.0g 样品在料液比 1:40、提取时间 70min 条件下进行不同温度(30、40、50、60、70、80、90、100℃)的水浴提取,提取液按 1.3.2 分离后测定可溶态锌含量。

时间对可溶态中锌提取率的影响:取 2.0g 样品在提取温度 70℃、料液比 1:40 条件下,选取提取时间分别为 30、50、70、90、110、130min 下进行水浴提取,提取液按 1.3.2 分离后测定可溶态锌含量。

料液比对可溶态中锌提取率的影响:取 2.0g 样品在提取温度 70℃、时间 110min 条件下,分别以 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 的料液比进行水浴提取,提取液按 1.3.2 分离后测定可溶态锌含量。

1.3.2.2 正交实验的设计 根据由单因素实验确定的温度、时间、料液比,按照 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交表进行正交实验,因素水平表见表 3。

表 3 正交实验因素水平表

Table 3 Factors and levels of orthogonal test

| 水平 | 因素    |         |      |
|----|-------|---------|------|
|    | 温度(℃) | 时间(min) | 料液比  |
| 1  | 35    | 100     | 1:35 |
| 2  | 40    | 110     | 1:40 |
| 3  | 45    | 120     | 1:45 |

1.3.3 可溶态中有机态锌与无机态锌的分离和测定 按照正交实验结果确定的最优条件提取,将得

到的可溶态溶液 2mL,用 1% HNO<sub>3</sub> 调至 pH 为 4.0 后,用 D-101 大孔吸附树脂进行分离,用 600mL 1% 的 HNO<sub>3</sub> 以 3.0mL/min 的流速进行洗脱,收集洗出液,得到的即为无机态溶液,加热浓缩至 5mL,进行消化,定容至 50mL,用火焰原子吸收光谱法测定,即为可溶态中无机锌的含量。

用无水丙酮 300mL 淋洗柱子,流速为 3.0mL/min,得到的淋洗液为有机态,用旋转蒸发器减压蒸馏,浓缩至 5mL,进行消化测定,得到的即为可溶态中有机锌的含量。

1.4 数据分析

采用 Excel 2003 和正交实验助手 Design-Expert 7.1.3 软件进行数理统计与分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 温度对锌提取率的影响 温度对可溶态中锌的提取的影响由图 1 可知,可溶态中锌的提取率随着水浴温度的升高逐渐增大,但温度到达 40℃ 以后,锌的提取率呈逐渐下降趋势,可能原因为温度越高,蛋白质等大分子物质失活沉淀,从而可溶态中锌含量减少。因此水浴的最佳温度为 40℃。

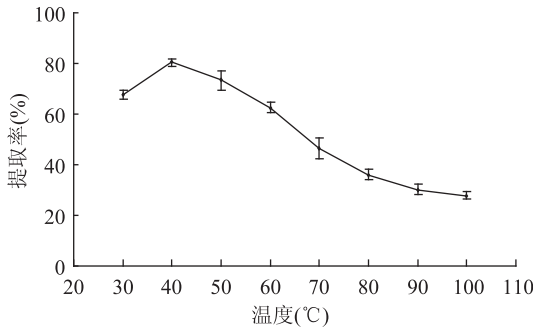


图 1 温度对可溶态中锌的提取率的影响

Fig.1 Influence of temperature on the extraction ratio of zinc in soluble state

2.1.2 时间对锌提取率的影响 图 2 可知,可溶态中锌的提取率随着提取时间的延长而逐渐增大,但时间到达 110min 后曲线的上升速度明显降低,锌元素的提取率趋于平稳,因此提取时间以 110min 为宜。

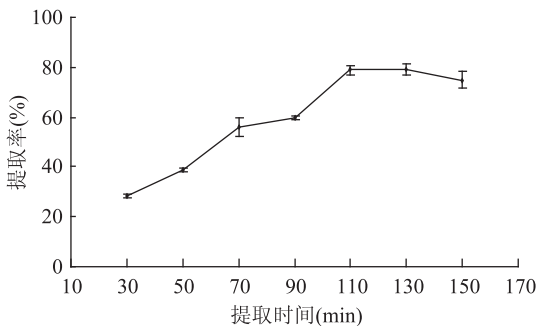


图 2 时间对可溶态中锌的提取率的影响

Fig.2 Influence of time on the extraction ratio of zinc in soluble state

2.1.3 料液比对锌提取率的影响 料液比对可溶态中锌的提取率的影响由图 3 可以发现,可溶态中锌

的提取率随着料液比的增加逐渐升高,但料液比大于 1:40 后,锌提取率的增加趋势变缓,最终确定适宜的料液比为 1:40。

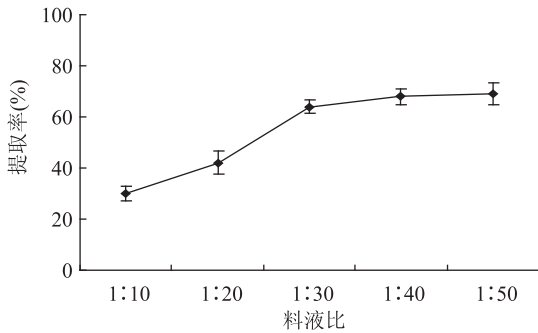


图 3 料液比对可溶态中锌的提取率的影响

Fig.3 Influence of ratio of materials and liquids on the extraction ratio of zinc in soluble state

通过单因素实验,综合考虑对灰树花中可溶态锌的提取条件,确定以提取温度 40℃,提取时间 110min,料液比 1:40 为正交实验提供参考。

2.2 正交实验结果

在单因素实验的基础上进行的 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交实验,以确定提取温度、时间和料液比与可溶态中锌的含量的关系,正交实验因素水平表及结果分析见表 4。

从极差结果来看,各因素的极差大小分别为: 7.290,10.846,9.750。初步得到影响灰树花可溶态中锌的提取效果因素大小分别是时间 > 料液比 > 温度。最佳提取条件为温度 T = 40℃,时间 t = 110min,料液比 1:45。在此条件下可溶态中锌的含量为 72.00μg/g,锌的提取率达到 78.77%。

表 4 正交实验结果

Table 4 Results of orthogonal experiment

| 实验号            | 温度(℃)  | 时间(min) | 料液比    | 提取率(%) |
|----------------|--------|---------|--------|--------|
| 1              | 1      | 1       | 1      | 52.52  |
| 2              | 1      | 2       | 2      | 56.35  |
| 3              | 1      | 3       | 3      | 64.55  |
| 4              | 2      | 1       | 2      | 67.83  |
| 5              | 2      | 2       | 3      | 78.77  |
| 6              | 2      | 3       | 1      | 48.69  |
| 7              | 3      | 1       | 3      | 53.33  |
| 8              | 3      | 2       | 1      | 66.19  |
| 9              | 3      | 3       | 2      | 55.53  |
| k <sub>1</sub> | 57.807 | 57.893  | 55.800 |        |
| k <sub>2</sub> | 65.097 | 67.103  | 59.903 |        |
| k <sub>3</sub> | 58.350 | 56.257  | 65.550 |        |
| R              | 7.290  | 10.846  | 9.750  |        |

2.3 可溶态中锌微量元素存在形态的含量及其关系讨论

由表 5 可以发现,灰树花原粉中锌的含量非常丰富。本实验利用正交实验优化的提取条件可溶出锌约 80%。锌在水提液中的可溶解率很高,可达到 99.31%,悬浮态基本没有。在可溶态中,锌主要以无

机盐或游离的状态存在为主,大约占可溶态的 78%,有机态含量相对较少,有机态分布达到 22%。

### 3 结论与讨论

通过单因素实验结果可以看出:最佳的提取温度 40℃、水浴时间 110min、的料液比 1:40。在此基础上进行的  $L_9(3^3)$  正交实验,从极差大小可以看出,灰树花可溶态中锌的提取率的影响因素大小:时间>料液比>温度;最佳因素水平组合是:温度 40℃、时间 110min、料液比 1:45,在此条件下灰树花的可溶态中锌的提取率可以达到 78.77%,说明灰树花水提液中的锌基本是以可溶态形式存在。

表 5 原粉和水溶液中元素 Zn 的形态分析结果

Table 5 Analytical results of the speciation of the Zinc in original medicine and water leaching

| 存在形态  | 元素锌的含量( $\mu\text{g/g}$ ) | 锌元素分布(%) |
|-------|---------------------------|----------|
| 原粉    | 91.40                     | 100      |
| 残渣    | 18.90                     | 20.7     |
| 水溶液   | 72.50                     | 79.3     |
| 可溶态   | 72.00                     | 78.8     |
| 悬浮态   | 0.50                      | 0.5      |
| 可溶有机态 | 56.18                     | 78.03    |
| 可溶无机态 | 16.12                     | 22.39    |

注:无机态锌分布(%) = 无机态锌的含量/可溶态中锌的含量  $\times 100\%$ ;有机态锌分布(%) = 有机态锌的含量/可溶态中锌的含量  $\times 100\%$ 。

灰树花中锌存在形态分析实验结果可以发现,灰树花可溶态溶液中锌多以无机态形式存在,含量为 56.18  $\mu\text{g/g}$ ,占灰树花锌总含量的 61.47%,占可溶态的 78.03%,无机态分布只达到可溶态的 22.39%。

灰树花中锌含量丰富且多以无机态形式存在,但研究发现,无机态锌的吸收利用易受到如植酸、膳食纤维等因素的影响, $\text{Zn}^{2+}$ 易溶于酸,而肠道为碱性,锌易生成不溶性的氢氧化物而不易吸收。但又有实验说明,锌与蛋白质、氨基酸等配体结合后,不形成不溶性的氢氧化物,故易吸收<sup>[25]</sup>。因此研究灰树花中有有机态锌的分离提取及开发利用对灰树花食用和药用价值的提高具有重大的意义<sup>[26]</sup>。这也可以很好的解释灰树花具有抗癌、免疫调节等药用价值的原因,为灰树花的加工利用提供了科学依据。

### 参考文献

- [1] 郭家瑞,王卫国.灰树花研究概述[J].食用菌,2010(4):1-2.
- [2] 陶文沂.药食用真菌生物技术[M].北京:化学工业出版社,2007.
- [3] 郭予斌,李洽胜,吴昭晖,等.灰树花化学成分和药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2011,34(3):283-288.
- [4] 刘振伟,史秀娟.灰树花的研究开发现状[J].食用菌,2001,23(4).
- [5] 王增池.灰树花的生态条件与药用价值[J].中国食用菌,1998,17(6):39-40.

- [6] Mayell M. Maitake extracts and their therapeutic potential[J]. Altern Med Rev,2001,6: 6.
- [7] Rui T, Yoshiyuki A, Ken-ichi I, et al. An unambiguous structural elucidation of a 1,3- $\beta$ -D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments[J]. Carbohydrate Research,2009,344(3):400-404.
- [8] 李磊,王卫国,郭彦亮,等.灰树花多糖的制备及其生物活性研究进展[J].食品工业科技,2009,30(11):327-331.
- [9] Hong L, Xun M, Wutong W. Anti-diabetic effect of an alpha-glucan from fruit body of maitake (*Grifola frondosa*) on KK-Ay mice[J]. J Pharm Pharmacol,2007,59(4): 575-582.
- [10] Gui-tang Chen, Xue-mei Ma, Sheng-tao Liu, et al. Isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *Grifola frondosa*[J]. Carbohydrate Polymers,2012,89(1): 61-66.
- [11] 谢文佳,黄小玲.灰树花多糖的生物活性与研究进展[J].食用菌,2010(5):1-3.
- [12] 郭予斌,李洽胜,吴昭晖,等.灰树花化学成分和药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2011,34(4):283-288.
- [13] Ulbricht C, Weissner W, Basch E, et al. Maitake mushroom (*Grifola frondosa*): systematic review by the natural standard research collaboration[J]. J Soc Integr Oncol,2009,7(2): 66-72.
- [14] 周永刚,肖鹰,杨于嘉.丹酚酸 B、丹参注射液、去铁胺对大鼠脑匀浆铁依赖性脂质过氧化的影响[J].中国老年学杂志,1997,6(17): 160-162.
- [15] 秦军志,王贤淑.丹参对大鼠胫骨骨折早期愈合过程中血清、骨痂及骨组织中钙、锌、铜的影响[J].中国中西医结合杂志,1992,12(6):354-356.
- [16] Liu Yanming. Determination of Ten Trace Elements in Chinese Traditional Medicines by Atomic Absorption Spectrometry[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis,2000,20(3):373-375.
- [17] 刘颖琳,刘耕陶.丹酚酸 A 体外对人血清低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用[J].药理学学报,2002,37(2):81-85.
- [18] 吴冬梅,王爱霞.丹参中微量元素 Fe, Cu, Mn 和 Zn 的形态分析[J].东北师大学报:自然科学版,2010,42(3):98-102.
- [19] 吴明星.常见微量元素与人体健康·综述[J].安徽卫生职业技术学院学报,2005,4(2):89.
- [20] 万发达,徐松龄.微量元素锌与人体健康[J].宜春医学学报,1988,4(1,2):76-78.
- [21] 郭春梅,武荣兰,封顺,等.火焰原子吸收光谱法分析香青兰中微量元素的溶出特性及化学形态[J].分析测试学报,2005,24(6):42-46.
- [22] 周天泽.中草药微量元素形态分析的几个问题[J].中草药,1990,21(10):37-42.
- [23] 刘长占,李爱红.药用植物中微量元素存在形态分析[J].微量元素与健康,2004,21(4):24-26.
- [24] 樊祥熹,陈颖,王淑英.中草药中微量元素形态分析方法研究[J].分析实验室,1993,12(4):52-57.
- [25] Mertz W. The essential trace element[J]. Science,1981,213(4514):1332-1338.
- [26] 刘伟民,孙琳洁,刘姜,等.加铜液体培养灰树花富集有机锌的研究[J].食品科学,2006,27(12):331-334.