

黑灵芝中微量元素的形态分布

弓晓峰^{1,2}, 谢明勇¹, 杨妙峰³, 王小如^{3,4}

(1. 南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 南昌 330047; 2. 南昌大学 教育部鄱阳湖湖泊生态与生物资源利用实验室, 南昌 330047; 3. 厦门大学 化学系现代分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005; 4. 国家海洋局第一海洋研究所 现代分析技术及中药标准化重点实验室, 青岛 266061)

摘要: 研究黑灵芝中微量元素含量及溶出特性对黑灵芝质量控制、灵芝产品的合理开发利用有重要作用。用 ICP-MS 法同时测定黑灵芝中十余种微量元素的初级形态含量及分布, 考察了黑灵芝中微量元素在不同极性溶剂中的浸出率, 并通过国家一级标准物质验证了分析结果的准确性。结果表明, 随着溶剂极性增大, 大部分元素的溶出率增大。水提取黑灵芝, 铜、锰、铁、锌等元素的提取率均小于 40%, 对黑灵芝样品进行了加标回收试验, 回收率在 88.2%~110.6%。

关键词: ICP-MS 法; 黑灵芝; 微量元素; 形态分布

中图分类号: O657.31 文献标识码: A 文章编号: 1001-4020(2005)07-0460-04

SPECIATION ANALYSIS OF TRACE ELEMENTS IN *GANODERMA ATRUM*

GONG Xiao-feng^{1,2}, XIE Ming-yong¹, YANG Miao-feng³, WANG Xiao-ru^{3,4}

(1. MOE Key Laboratory of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. MOE Key Lab. of Poyang Lake Ecology and Bio-resource Utilization, Nanchang University; Nanchang 330047, China; 3. The MOE Key Laboratory of Modern Analytical Science, The College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 4. The First Research Institute of Oceanography of SOA, Qingdao 266061, China)

Abstract: It is important to study the trace element contents and transference characteristics and element speciation in the extract of *Ganoderma atrum* for the quality control and reasonable exploitation. In this experiment the contents and speciation of more than ten elements in *Ganoderma atrum* were simultaneously determined with microwave assisted digestion of sample combined with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The dissolution percentage of trace element in different solvents were also studied and the veracity of the analytical results were validated with CRM's under the same conditions. The results indicated that the dissolution percentage of most elements in solvents were increased with its polarities. In the aqueous solution of the *Ganoderma atrum*, the extraction percentage of Cu, Mn, Fe, Zn were all lower than 40%. The recoveries of the elements were ranged from 88.2% to 110.6%.

Keywords: ICP-MS; *Ganoderma atrum*; trace elements; speciation

中药的药理作用与微量元素及其存在状态密切相关。现代研究表明, 元素形态影响其营养、毒理、生物学活性和生物利用率^[1]。近 20 年来, 元素形态分析研究已引起国内外学者们的高度重视, 并取得了一系列重要结果。

灵芝是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌, 作为药物已有悠久历史。目前, 国内外许多学者已对灵芝, 尤其是赤芝和紫芝的有机成分、药理实验及临床验证等做了大量的工作, 对灵芝中微量元素的测定也有所报道^[2~4]。但到目前为止, 还未见到有关黑灵芝中微量元素含量的测定及微量元素初级形态和次级形态分布的研究报道。本研究以江西赣南黑灵芝 (*Ganoderma atrum*) 为研究对象, 将黑灵芝水提液

收稿日期: 2004-09-21

作者简介: 弓晓峰 (1962-), 女, 山西省山阴县人, 教授, 博士生, 研究方向为食品化学与营养学, 环境分析化学。

中十余种微量元素的存在形态分为悬浮态和可溶态、有机态与无机态,并对黑灵芝在不同极性溶剂中的浸出率进行了对比,采用微波消化,ICP-MS法测定十余种元素的含量及分布,并以国家一级标准物质(GBW 07603和07605)进行质量控制。

1 试验部分

1.1 样品及试剂

黑灵芝(*Ganoderma atrum*)采自江西赣州安远灵芝生产基地,60℃烘箱干燥,粉碎后过250 μm(60目)筛,备用。标准参考物灌木枝叶和茶叶为地矿部物化探研究所提供的GBW07603和GBW07605。

标准溶液用光谱纯或高纯金属或相应的金属氧化物配制。所有标准溶液均以硝酸(5+95)配成1.000 g·L⁻¹标准储备液,测定前再稀释成不同浓度的标准工作液。

过氧化氢、硝酸等为优级纯,丙酮、无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯均为分析纯。

试验用水(18.2 MΩ·cm)为去离子水经Milli-Q水处理系统得到。

所用玻璃器皿均用硝酸(1+9)溶液浸泡,使用前取出分别用二次水和超纯水冲洗。

0.45 μm微孔滤膜,D101大孔树脂。

1.2 仪器

HP4500电感耦合等离子体质谱仪

SHIN CO MK- 光纤控压密闭微波快速消解系统

Milli-Q 50超纯水处理系统

1.3 等离子体质谱仪工作条件

通过仪器设置的Tuning程序,用10 μg·L⁻¹的锂、钪、铈、钛混合标准溶液,对仪器条件进行优化,优化参数见表1。

表1 仪器操作条件和参数

Tab. 1 Instrumental parameters of ICP-MS

参数 Parameters	数值 Value	参数 Parameters	数值 Value
射频功率	1350 W	冷却气流速	16 L·min ⁻¹
采样锥直径	1.0 mm	截取锥直径	0.4 mm
采样深度	7.5 mm	重复次数	3
载气	1 L·min ⁻¹	分辨率	0.8 amu
辅助气	1.2 L·min ⁻¹	积分时间	0.1 s
样品提升率	1.0 mL·min ⁻¹	采样周期	0.3 s

1.4 试验方法

1.4.1 悬浮态和可溶态的分离和测定

植物中微量元素形态分析,常用0.45 μm滤膜

分离其浸出液或煎液中可溶态和悬浮态,并把该层次分析称为初级形态分析^[5]。本文用ICP-MS法同时测定十余种微量元素在黑灵芝中的可溶态、悬浮态、残渣中的含量,并计算相应的形态分析参数。分析流程见图1。

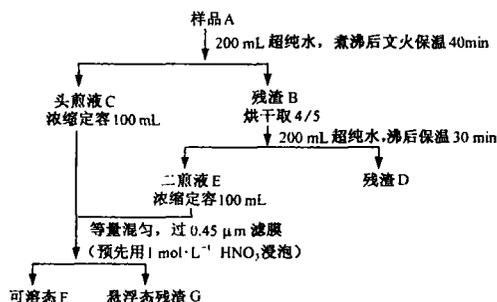


图1 可溶态及悬浮态操作流程

Fig. 1 Course of operation of dissolved species and suspension species

准确称样A~G,微波消化,定容至50 mL,ICP-MS法测定微量元素,扣除滤膜的空白,即可得到悬浮态和可溶态中的元素含量。

1.4.2 无机态和有机态的分离测定

取一定量D101树脂,用无水乙醇浸泡24 h后,把树脂连乙醇一起倒入层析柱,装完后再在上面盖一层玻璃棉。用超纯水冲洗至无醇味后,用硝酸(1+99)50 mL淋洗柱子,收集淋洗液作为空白。

将适量可溶态F加到上述制备好的D101树脂柱上,用硝酸(1+99)以5 mL·min⁻¹的流速淋洗,收集淋洗液,减压浓缩,消化定容,测定微量元素,即得无机态值。然后再用50 mL丙酮淋洗柱子,收集淋洗液,蒸去丙酮,消化定容,测定微量元素,即得元素的有机态值。

1.4.3 不同极性溶剂的浸出方法

称取样品1.000 0 g于锥形瓶中,分别加入氯仿、乙酸乙酯、丙酮、无水乙醇和水各15 mL,室温下浸提24 h,抽滤,滤渣用相应溶剂洗涤3次,抽滤至干后,于70℃左右干燥,按消解方法消解,上机测定残留态金属含量,平行三次,计算浸出率。

1.4.4 微波消解方法

称取烘干的样品及标准物质0.200 0 g,放入Teflon溶样罐中,加入浓硝酸5 mL,预消化过夜。按操作要求装好消解装置,放入MK-光纤控压密闭微波快速消解系统中,在15 MPa下5 min微波溶样,自然冷却后取出,加入30%的过氧化氢1 mL,于10 MPa下,3 min微波处理。冷却后,移入50 mL容量瓶中,用超纯水定容至50 mL。样品和

试剂空白一式3份。

溶液样品经减压浓缩至干后,加入浓硝酸5 mL后按同法操作。

2 结果与讨论

2.1 方法的准确性

按试验方法分析了国家一级标准物质灌木叶GBW 07603和茶叶GB 07605,结果见表2,同时对黑灵芝样品进行了加标回收试验,回收率在88.2%~110.6%。

表2 标准物质测定结果 ($n=3, \rho/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Tab. 2 Analyt. results of the CRM's
GBW 07603 and GBW 07605

元素 Element	灌木枝叶 GBW 07603 Busah GBW07603		茶叶 GBW 07605 Tea GBW07605	
	标准值 Standard value	测定值 ¹⁾ Determined value	标准值 Standare value	测定值 ¹⁾ Determined value
V	2.4±0.2	1.7±0.1	0.86	0.74±0.05
Cr	2.6±0.1	2.72±0.1	0.80±0.02	0.93±0.1
Mn	61±3	58±3	1240±40	1148±60
Fe	1070±40	994±10	264±10	247±20
Co	0.41±0.03	0.43±0.09	0.18±0.02	0.16±0.01
Ni	1.7±0.2	1.4±0.2	4.6±0.3	4.0±0.2
Cu	6.6±0.4	6.1±0.4	17.3±1.0	16.9±0.16
Zn	55±2	49±2	26.3±0.9	24.7±2.5
As	1.25±0.10	1.47±0.05	0.28±0.03	0.29±0.2
Se	0.12±0.02	0.20±0.07	0.072	0.056±0.1
Sr	246±10	234±30	15.2±0.5	12.1±1.0
Cd	0.38	0.46±0.02	0.057±0.008	0.071±0.008
Pb	47±2	43±2	4.4±0.2	4.1±0.2

注: 1) 测定值的表达式为 $\bar{x} \pm (S/\sqrt{n})$ 。

Note: Determined values are calculated by the for mula $\bar{x} \pm (S/\sqrt{n})$.

2.2 标准曲线和检出限

本文采用的标准溶液系列中各测定元素的含量分别为10, 20, 40, 80, 100, 150, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 介质为 HNO_3 (2+98), 结果发现所有元素回归后的相关系数均大于0.999。

在试验条件下,用 HNO_3 (2+98) 空白液连续测定11次,其 3σ 的检出限见表3。

2.3 黑灵芝元素总量的测定

为了定量考察样品中各元素的浸取效率,了解样品中各元素的总量,元素总量采用微波密闭全消解后通过 ICP-MS 法测定,元素总量的测定结果($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)为 V 0.12, Fe 75.74, Cu 11.13, Se 0.013, Cd 0.30, Cr 3.00, Co 0.06376, Zn 19.31, Sr 4.77,

表3 检出限测定结果

Tab. 3 Detection limits ($\rho/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)

元素 Element	检出限 Detection limit	元素 Elem ent	检出限 Detection limit	元素 Element	检出限 Detection limit
V	0.006	Mn	0.06	Cr	11.6
Pb	0.23	Ni	0.43	Zn	13.97
Cu	0.72	Co	0.0085	Se	145.7
Sr	0.065	Mo	2.40	Fe	360.4
Cd	0.2	As	2.03		

Pb 0.67, Mn 46.57, Ni 0.89, As 0.080, Mo 0.081。

试验结果可见,黑灵芝中铜、锰、铁、锌的含量较高,具有滋补强壮、扶正固本、抗癌、抑癌的功效与其丰富的铜、锰、铁、锌含量有重要关系。

2.4 不同极性溶剂中微量元素的浸出率

考察了不同极性溶剂对黑灵芝中微量元素的浸出率,结果见表4。浸出率按如下式计算:

$$\text{浸出率}(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100$$

式中, C_1 为原料中元素含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), C_2 为浸提后滤渣中元素含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。

从表4结果可以看出,随着溶剂极性增大,元素的溶出率绝大多数是增大的。水提取黑灵芝,铜、锰、铁、锌等微量元素的提取率均小于40%,大部分元素仍留在煎渣中,形态未知。

2.5 水提液中微量元素的形态分析结果

按1.4.3方法进行分离和测定,黑灵芝各级组分量A为2.5010 g, B为2.1895 g, C为100 mL, D为1.6420 g, E为100 mL, G为0.0133 g,元素初级形态含量见表5。

从表中数据可以看出,不管是头煎还是二煎,均为滤渣中的元素含量高于滤液。

2.6 各种微量元素的初级形态分析参数

为了更直观地了解黑灵芝中微量元素初级形态特点,将表5的结果,按照初级形态分析要求^[5],应用以下公式计算,可得到黑灵芝中微量元素的初级形态分析参数。

$$\text{头煎提取率: } T_1(\%) = \frac{W_C \cdot P_C}{W_A \cdot P_A} \times 100$$

$$\text{二煎提取率: } T_2(\%) = \frac{W_E \cdot P_E}{W_A \cdot P_A} \times 100$$

$$\text{总提取率: } T(\%) = T_1 + T_2$$

$$\text{头煎残留率: } L_1(\%) = \frac{W_B \cdot P_B}{W_A \cdot P_A} \times 100$$

$$\text{二煎残留率: } L_2(\%) = \frac{W_D \cdot P_D}{W_A \cdot P_A} \times 100$$

表 4 不同极性溶剂中微量元素的浸出率

Tab. 4 The extraction percentage of trace element in different solvents

元素 Element	灵芝总量 G. Atrum total ($\rho/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	氯仿提取 CHCl ₃ extract		乙酸乙酯提取 Ethyl acetate extract		丙酮提取 Acetone extract		乙醇提取 Ethanol extract		水提取 Water extract	
		提剩物 Am't remained ($\rho/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	浸出率 Extraction rate (%)								
		Cr	3.00	0.895 1	70.16	0.980 3	67.32	0.474 7	84.18	0.868 7	71.04
Mn	46.57	40.03	14.04	41.92	9.98	39.257 2	15.70	40.305 2	13.45	33.231 3	28.64
Fe	75.74	50.46	33.38	60.19	20.53	45.469 4	39.97	33.438 6	55.85	46.874 8	38.11
Co	0.063 76	0.054 31	14.82	0.035 3	44.64	-	-	0.061 7	3.23	-	-
Ni	0.89	0.685 0	23.03	0.461 2	48.18	0.435 3	51.09	0.535 5	39.83	0.603 0	32.25
Cu	11.13	10.585 1	4.90	10.847 6	2.54	10.647 6	4.33	10.329 0	7.20	10.453 9	32.25
Zn	19.31	16.37	15.23	6.02	68.82	19.01	1.55	16.424 0	14.95	15.54	19.52
Sr	4.77	4.25	10.90	4.181 1	12.35	4.184 0	12.29	3.795 0	20.44	3.687 3	22.70
Cd	0.300 3	0.205 5	31.50	0.212 1	29.30	0.208 4	30.53	0.208 1	30.63	0.200 5	33.17
Pb	0.67	0.397 1	40.73	0.422 7	36.91	0.478 8	28.54	0.457 4	31.73	0.370 5	44.70

表 5 黑灵芝中微量元素的形态分析结果

Tab. 5 The result of speciation analysis of trace elements in G. Atrum

元素 Element	A ($\rho/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	B	C ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	D ($\rho/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	E ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	G ($\rho/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	有机态 Org carbon ($\rho/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	无机态 Inorg. carbon
Cr	3.00	2.249	0.001	2.46	0.004 3	2.642 5	0.006 689	0.048 92
Mn	46.57	28.448	0.213 9	28.47	0.037 71	2.283 6	0.002 91	0.002 029
Fe	75.74	50.809	0.212 9	94.73	0.285 2	31.500	0.068 48	0.695 4
Co	0.063 76	-	0.000 1	-	8.82×10^{-5}	-	-	-
Ni	0.89	0.616	0.015 5	0.45	0.008 66	2.042 3	0.009 197	0.009 834
Cu	11.13	9.588	0.042 5	10.56	0.063 67	7.227 6	0.004 117	0.006 218
Zn	19.31	18.365	0.189 2	19.74	0.149 3	28.330 9	0.048 08	0.131 6
Sr	4.77	3.111	0.027 3	2.88	0.012 49	-	0.001 311	0.000 569
Cd	0.300 3	0.199	0.000 2	0.206	-	-	5.86×10^{-6}	-
Pb	0.67	0.607	0.006 2	0.32	0.007 6	2.324 1	0.002 558	0.015 02

$$\text{头煎浸留比: } Q_1 = T_1/L_1 = \frac{W_C \cdot P_C}{W_B \cdot P_B}$$

$$\text{二煎浸留比: } Q_2 = T_2/L_2 = \frac{W_E \cdot P_E}{W_D \cdot P_D} \times 100$$

$$\text{总浸留比: } Q = \frac{T}{L_2} = \frac{T_1 + T_2}{L_2} =$$

$$\frac{W_C \cdot P_C + W_E \cdot P_E}{W_D \cdot P_D}$$

式中, W 为样品的质量或体积; P 为样品中的元素含量。

黑灵芝中微量元素的初级形态分析参数见表 6。

从 T_1 、 T_2 和 T 值可知, 锌、铁、铜和锰的浸出率较高, 铬、钴、镉元素的浸出率最低, 铅的浸出率最高, 说明铅比较容易溶出。大多数元素的 $T_1 > T_2$, 但 T_2 值仍然较大, 说明进行第二次提取非常有必

要。从 L_1 、 L_2 、 Q_1 、 Q_2 和 Q 值可知, 滤渣中仍然含有大部分元素, 这一结果也提示人们, 在利用水提取黑灵芝营养成分时, 滤渣是一种矿物质资源, 可以利用其他方法进一步提取滤渣中矿物元素。

3 结论

在对黑灵芝进行的浸出率研究中, 发现随着溶剂极性的增大, 微量元素的溶出率绝大多数是增大的。随着煎煮时间的增加, 有些微量元素的溶出量与时间呈正相关, 延长煎煮时间有助于营养元素的溶出, 可溶态铅极易溶出, 只有控制黑灵芝栽培原料的铅污染才能有效减少黑灵芝水提液中的铅含量。研究黑灵芝中微量元素的溶出特性有助于进一步研究黑灵芝中元素的存在形态。

(下转第 466 页)

表 1 样品分析结果($n=5$)

Tab. 1 Analyt. results of sample

成分 Components	含量 Content ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD (%)
刺槐素	3.05	3.30
木犀草素	0.85	3.66
槲皮素	2.22	3.42

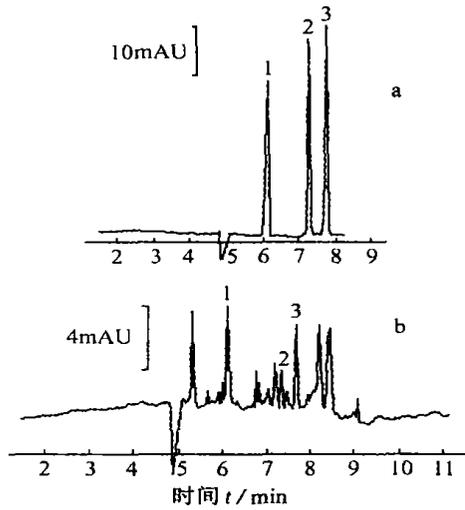


图 1 标准(a)和野菊花样品 80%乙醇提取液(b)的毛细管电泳图

Fig. 1 Electropherograms of standard mixture (a) and 80% (V/V) ethanol extract of *Chrysanthemum indicum* L(b)

1. 刺槐素(Acacetin) 2. 木犀草素(Luteolin)
3. 槲皮素(Quercetin)

草素和槲皮素的回收率分别为 97.9%~102.4%、94.7%~105.3%、96.5%~103.8%。

2.7 样品分析结果

按试验方法分析了野菊花样品中刺槐素、木犀草素和槲皮素,样品的毛细管电泳图见图 1b,样品分析结果见表 1。

参考文献:

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1975. 789~790.
- [2] 北京市野菊花协作组. 野菊花制剂临床观察附 454 例疗效分析[J]. 中药通报, 1983, 8(4): 39.
- [3] 北京第六制药厂. 野菊花药理研究及栓剂临床疗效观察[J]. 中药通报, 1985, 10(7): 45.
- [4] Fonseca F N, Kato M J, Jr L O, et al. Critical Assessment of Electrolyte System for the Capillary Electrophoresis Analysis of Phenolic Compounds in Herbal Extracts[J]. J Micro Sep, 2001, 13(6): 227.
- [5] Li X, Zhang Y, Yuan Z. Determination of Baicalin, Chlorogenic Acid and Forsythin in Chinese Medicinal Preparations by Capillary Electrophoresis[J]. Chromatographia, 2002, 55(7/8): 453.
- [6] 邓延倬, 何金兰. 高效毛细管电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 76.

(上接第 463 页)

表 6 黑灵芝中微量元素初级形态分析参数

Tab. 6 The analytical parameters of primary speciation of trace elements in *G. Atrium*

元素 Element	T_1 (%)	T_2 (%)	T (%)	L_1 (%)	L_2 (%)	Q_1	Q_2	Q
Cr	1.33	5.73	7.06	65.63	53.84	1: 49.24	1: 9.39	1: 7.62
Mn	18.36	3.24	21.60	53.48	40.14	1: 2.91	1: 12.40	1: 1.86
Fe	11.24	15.06	26.30	58.73	82.11	1: 5.23	1: 5.45	1: 3.12
Co	6.27	5.53	11.80	1.37	2.06	1: 0.22	1: 0.37	1: 0.17
Ni	69.64	38.91	108.54	60.59	33.20	1: 0.87	1: 0.85	1: 0.31
Cu	15.27	22.87	38.14	75.42	62.29	1: 4.94	1: 2.72	1: 1.63
Zn	39.18	30.91	70.09	83.26	67.12	1: 2.13	1: 2.17	1: 0.96
Sr	22.88	10.47	33.35	57.10	39.64	1: 2.50	1: 3.79	1: 1.19
Cd	2.66	6.66	9.32	58.01	45.04	1: 21.79	1: 6.77	1: 4.83
Pb	37.00	45.62	82.62	79.31	31.36	1: 2.14	1: 0.69	1: 0.38

参考文献:

- [1] Schwedt G. Elemental Speciation Analysis in Foods[J]. Trends in Analytical Chemistry, 1983, (1): 39.
- [2] 韩蕴华, 高宝岩, 宋慧源. ICP-AES 法测定栽培灵芝中 9 种微量元素[J]. 光谱实验室, 1995, 12(5): 34.
- [3] 林天慕, 朱志国, 李欣, 等. 平盖灵芝中锌锰铜铁含量分析[J]. 广东微量元素科学, 1999, 6(10): 53.
- [4] 徐新春, 吴惠玲, 刘佑波. 各种栽培因子下培养的灵芝无机元素含量比较测定[J]. 广东微量元素科学, 2000, 7(2): 64.
- [5] 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.