

张水花,毕春丽,付延英. 正交设计优化浊点萃取-光度法测定野生食用菌中的铜[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):186-188.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.053

正交设计优化浊点萃取-光度法 测定野生食用菌中的铜

张水花,毕春丽,付延英

(曲靖师范学院化学与化工学院,云南曲靖 655011)

摘要:探讨了以二乙基氨基二硫代甲酸钠为络合剂,非离子表面活性剂 TritonX-100 为萃取剂,测定 4 种食用野生菌中铜含量的浊点萃取-光度法联用的新方法。在单因素试验基础上,采用 $L_{16}(4^5)$ 优化萃取条件,详细探讨溶液的 pH 值、络合剂和非离子表面活性剂的用量、萃取温度和时间对浊点萃取效率的影响。在最优条件下,铜的线性范围 0.0~0.5 $\mu\text{g/mL}$,线性回归方程为 $D=0.1306C+0.00043$ ($r=0.9991$),检出限为 0.48 $\mu\text{g/mL}$ ($n=11$),相对标准偏差 $RSD < 3.4\%$ ($n=5$),样品加标回收率在 99.26%~101.15%。该方法操作简单、环保、分析速度快、结果准确,将该方法用于 4 种野生菌中铜含量测定,结果令人满意。

关键词:浊点萃取;野生菌;分光光度法;铜

中图分类号: TS207.5⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0186-03

云南省野生食用菌资源丰富,产量占全世界食用菌一半以上,占中国食用菌的 2/3。食用野生菌常常含有利于人类身体健康的物质,在改善人类身体亚健康、防止重大疾病的发生方面起着重要的作用^[1-2],如荞面菌的子实体提取物对小白鼠肉瘤 180 及艾氏癌的抑制率为 90%,奶浆菌有健胃、止咳平喘、祛痰等功效。此外,野生菌还具有味道鲜美的特点,备受人们喜爱。近年来,国内外学者偏重于研究野生菌抗氧化清除自由基延缓衰老、免疫调节、抗肿瘤、降血脂的作用^[3-5],但野生菌中的微量元素可通过与蛋白质和其他有机基团结合,形成酶、激素、维生素等生物大分子,发挥着重要的生理生化功能,而到目前为止关于野生菌中的微量元素研究却鲜见报道。因此,野生菌中微量元素的研究不可忽视,该研究不仅可以确定其营养水平,还能为野生菌进一步开发和利用奠定化学基础。食品中铜含量测定的现行国家标准方法有原子吸收光谱法和二乙基氨基二硫代甲酸钠分光光度法。但运行成本低、操作简单的二乙基氨基二硫代甲酸钠分光光度法在操作中使用了四氯化碳有机溶剂,对人体的身体健康有害,对环境也不友好。因此,对食品中铜含量测定新方法的研究不容忽视。浊点萃取法是近年来出现的一种新型环保的液-液萃取技术,目前在微量、痕量及复杂样品的分类分析中已有研究并取得了满意的结果^[6-9],但用于萃取并测定食用野生菌中微量铜的研究尚未见报道。本研究探讨了以二乙基氨基二硫代甲酸钠为络合显色剂,非离子表面活性剂 TritonX-100 为萃取剂的浊点萃取-分光光度法测定野生食用荞面菌、奶浆菌、红蜡蘑、铜绿菌中微量铜的可行性,在单因素试验的基础上采用正交法优化萃取测定试验条件,并将最佳条件

下测定的结果与国标方法测定的结果进行对比。

1 材料与方 法

1.1 材料和仪器

新鲜的奶浆菌、铜绿菌、红蜡蘑、荞面菌均购自云南省曲靖市当地农贸市场,将块菌洗净,低温干燥再在 105 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干后粉碎并过 40 目筛,得到干燥菌粉备用。

硫酸铜,二乙基二硫代氨基甲酸钠, TritonX-100, 盐酸, 氢氧化钠, 硝酸, 氨水, 氯化铵, 以上试剂均为分析纯。所有玻璃仪器在使用前均用稀硝酸浸泡, 实验室用水为二次蒸馏水。

UV-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); pH S-3C 精密酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司); HH-306 型恒温水浴锅(乐清市姚奥特仪表有限公司); TDL-5-A 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 浊点萃取测定方法 准确移取一定量的试样于 10 mL 的具塞刻度离心管中, 分别依次加入 4 mL 氨-氯化铵缓冲液, 1.5 mL 0.4% 二乙基二硫代氨基甲酸钠, 2.0 mL 10% TritonX-100, 加水稀释至刻度, 恒温水浴一定时间后以 4 000 r/min 离心分离, 分相后冰水浴 5 min 移去水相层, 用二次蒸馏水稀释富胶束相定容至 3 mL, 静止后用紫外分光光度计在 440 nm 处测定其吸光度值。

1.2.2 样品预处理 采用 GB/T5009.13—2003 中的试样处理方法对样品进行处理, 准确称取约 5 g(精确到 0.000 1 g) 菌粉样品于瓷坩埚中, 加 5 mL 硝酸放置 0.5 h 后小火蒸干, 继续加热炭化, 移入马弗炉中, 500 $^{\circ}\text{C}$ 灰化 1 h, 取出冷却, 再加入 1 mL 硝酸浸湿灰分, 小火蒸干, 再移入马弗炉中, 500 $^{\circ}\text{C}$ 灰化 0.5 h, 冷却后取出用 1:1 的硝酸溶解灰样, 并转入 100 mL 容量瓶用二次蒸馏水稀释至刻度, 摇匀备用(同时做空白试验)。

1.2.3 试验研究方法 考察试验过程中溶液的酸度、萃取平

收稿日期:2015-12-17

基金项目:云南省科技计划(编号:2013FD047)。

作者简介:张水花(1980—),女,云南曲靖人,硕士,副教授,主要从事天然产物化学及保健食品研究。E-mail:z_shh@163.com。

衡时间、平衡温度、Triton X-100 用量、络合剂用量等 5 个因素对测定效果的影响,然后在单因素试验基础上,采用正交试验 $L_{16}(4^5)$ 设计方法优化测定方法,试验因素及水平见表 1,试验方案及数据处理见表 2,试验数据方差分析结果见表 3。

表 1 浊点萃取的因素及水平

水平	A:pH 值	B:温度 (°C)	C:时间 (min)	D:Triton X-100 用量(mL)	E:络合剂用量(mL)
1	7	60	10	1.0	1.0
2	8	70	15	2.0	1.5
3	9	80	20	3.0	2.0
4	10	90	25	4.0	2.5

2 结果与分析

2.1 测定波长的选择

按照试验方法以试剂空白为参比,在 360~600 nm 波长范围内扫描得到铜络合物的吸收光谱(图 1),选择最大吸收波长为 440 nm 为测定波长。

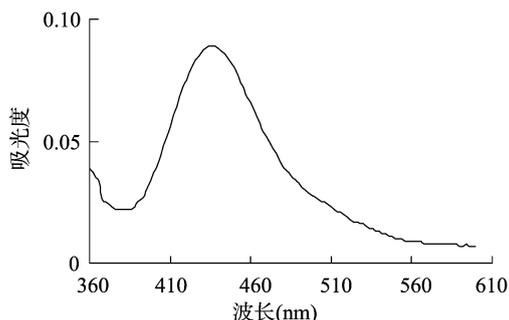


图 1 吸收光谱

2.2 单因素试验

2.2.1 pH 值对萃取效果的影响 络合剂二乙氨基二硫代甲酸钠的稳定性与溶液酸度密切相关,酸性条件下,二乙氨基二硫代甲酸钠易分解为二硫化碳,而碱性条件下又容易水解,因此,体系的酸度直接影响着络合反应的顺利进行及萃取效率。本试验考察不同 pH 值对铜萃取率的影响,发现随着 pH 值的增大,萃取效果先增大后减小,溶液酸度 pH 值为 8.0~9.0 时,对铜的萃取效果最好(图 2)。

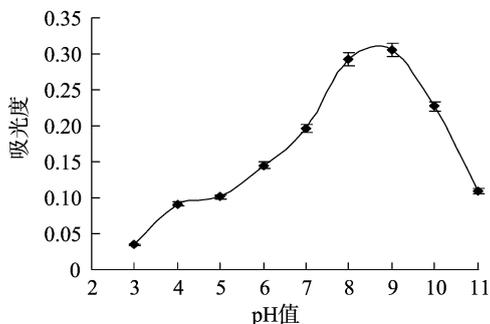


图 2 溶液 pH 值对萃取效果的影响

2.2.2 平衡时间和温度对萃取效果的影响 通常来讲,较高的温度有利于反应快速达到平衡,但过高的温度又会影响络合物的稳定性。因此,适宜的平衡温度对萃取效率影响较大。在保证萃取完全的条件下,选择较短的平衡时间可以直接提高分析效率。为此,考察平衡温度与时间对体系吸光度的影响(图 3、图 4),由图 3 可知,平衡温度为 70~80 °C,萃

取效率最高,由图 4 可知平衡 15 min 萃取效果最好。

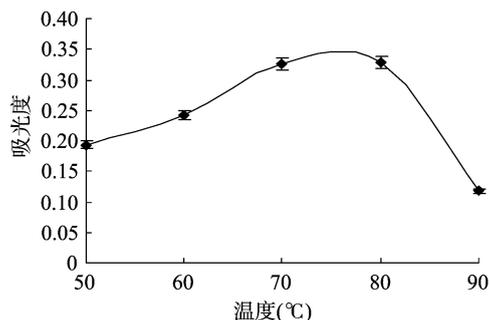


图 3 平衡温度对萃取效果的影响

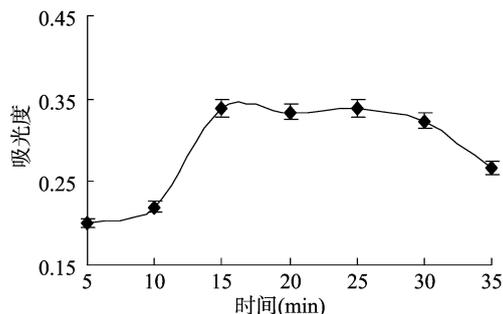


图 4 平衡时间对萃取效果的影响

2.2.3 TritonX-100 用量对萃取效果的影响 非离子表面活性剂 TritonX-100 的用量不仅决定了铜富胶束相体积的大小,同时还会影响萃取分相过程。试验考察了 TritonX-100 用量对萃取效果的影响(图 5),发现加入量小于 2.0 mL 时萃取不完全从而降低萃取效果,加入量大于 2.0 mL 时,萃取效果没有十分明显的变化。

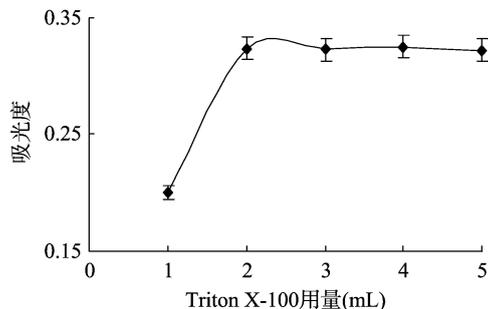


图 5 Triton X-100 用量对萃取效果的影响

2.2.4 络合剂用量对萃取效果的影响 二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DDTC) 对铜离子具有较高的生产常数,且生成物二乙基二硫代氨基甲酸铜具有疏水好的特点,是一种理想的络合剂,它除了能与试样中的铜离子生成络合物到胶束相中之外,还起到显色的作用。用量过少导致络合不完全从而使吸光度偏低,用量过多则会造成浪费,导致成本过高。本试验考察 DDTC 用量在 0.5~2.5 mL 时对萃取效率的影响(图 6)。由图 6 可知,用量为 1.5 mL 时萃取效率最好。

2.3 正交试验

由表 2、表 3 的分析结果可知,溶液的 pH 值、萃取平衡温度、平衡时间、非离子表面活性剂 TritonX-100 用量、二乙基二硫代氨基甲酸钠用量等 5 个影响因素中,各因素影响程度顺序是溶液的 pH 值 > 平衡温度 > 二乙基二硫代氨基甲酸钠用量 > 非离子表面活性剂 TritonX-100 用量 > 平衡时间。方

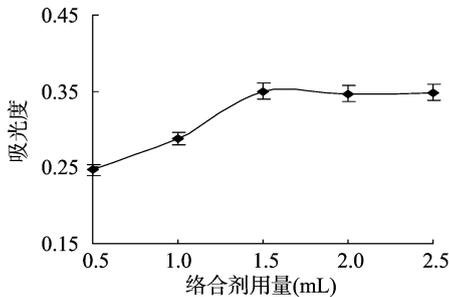


图6 络合剂用量对萃取效果的影响

差分析表明,溶液的 pH 值与平衡温度对测定结果有显著影响。优化工艺条件为:溶液的 pH 值为 8.0,萃取温度为 70 ℃,萃取时间为 20 min, TritonX-100(体积分数为 10%)的用量为 2.0 mL,二乙氨基二硫代甲酸钠(0.4%)为 1.5 mL。

表2 野生食用菌中铜测定条件的正交试验结果

编号	A	B (°C)	C (min)	D (mL)	E (mL)	吸光度
1	7	60	10	1	1.0	0.188
2	7	70	15	2	1.5	0.235
3	7	80	20	3	2.0	0.240
4	7	90	25	4	2.5	0.220
5	8	60	15	3	2.5	0.260
6	8	70	10	4	2.0	0.320
7	8	80	25	1	1.5	0.278
8	8	90	20	2	1.0	0.283
9	9	60	20	4	1.5	0.252
10	9	70	25	3	1.0	0.285
11	9	80	10	2	2.5	0.305
12	9	90	15	1	2.0	0.265
13	10	60	25	2	2.0	0.215
14	10	70	20	1	2.5	0.250
15	10	80	15	4	1.0	0.235
16	10	90	10	3	1.5	0.201
k_1	0.221	0.229	0.254	0.245	0.248	
k_2	0.285	0.272	0.249	0.260	0.241	
k_3	0.277	0.264	0.256	0.246	0.260	
k_4	0.225	0.242	0.249	0.257	0.259	
极差	0.064	0.043	0.007	0.015	0.019	

表3 野生食用菌中铜测定条件的方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	F 临界值	F 值
A	0.014	3	21.0	3.86*
B	0.005	3	7.5	3.86*
C	0.000	3	0.0	3.86
D	0.001	3	1.5	3.86
E	0.001	3	1.5	3.86
误差	0	9		

2.4 分析特性

在最优化试验条件下以不同浓度(0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)铜标准溶液按照试验方法进行测定,结果显示,在 0~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,吸光度与铜浓度之间存在着良好的线性关系,线性回归方程为 $D = 0.1306C + 0.00043$,相关系数 $r = 0.9991$,检出限为 0.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n = 11$)。

2.5 样品分析

在最佳试验条件下分别测定荞面菌、奶浆菌、红蜡蘑、铜绿菌中的铜,并进行加标回收试验(表4),由表4可知,样品

加标回收率在 99.26%~101.15%,相对标准偏差均小于 3.40%。对照国标法与本试验方法测定的结果(表5),可知本试验所用测定方法可靠。

表4 样品中铜含量的分析结果及回收率试验($n = 5$)

样品	测定值 (mg/g)	加入量 (mg/g)	回收量 (mg/g)	回收率 (%)	RSD (%)
荞面菌	0.081	0.200	0.279	99.29	3.40
荞面菌	0.070	0.200	0.271	100.37	2.70
红蜡蘑	0.071	0.200	0.269	99.26	2.60
铜绿菌	0.060	0.200	0.262	101.15	2.90

表5 不同测定方法样品中铜含量的分析结果($n = 5$)

方法	铜含量测定值(mg/g)			
	荞面菌	荞面菌	红蜡蘑	铜绿菌
本试验方法	0.081	0.070	0.071	0.060
国标(GB/T5009.13—2003)	0.089	0.068	0.068	0.069

3 结论

建立二乙氨基二硫代甲酸钠为络合剂、非离子表面活性剂 TritonX-100 为萃取剂测定 4 种食用野生菌中铜含量的浊点萃取-光度法联用的新方法。得出最佳试验条件为 pH 值 8.0,萃取温度 70 ℃,萃取时间 20 min, TritonX-100(体积分数为 10%)的用量 2.0 mL,二乙氨基二硫代甲酸钠(0.4%) 1.5 mL,在最优条件下,铜的线性范围 0~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,线性回归方程为 $D = 0.1306C + 0.00043$ ($r = 0.9991$),检出限为 0.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n = 11$),相对标准差 $RSD < 3.4\%$ ($n = 5$),样品加标回收率在 99.26%~101.15%。研究表明,该方法与现行国标法相比更环保,操作简单、分析速度快、结果准确。将该方法用于 4 种野生菌中铜含量测定,结果令人满意。本研究的测定结果可以为 4 种野生菌进一步开发和应用奠定化学基础。

参考文献:

- [1]王婷婷,游金坤,严明,等. 4种野生菌多酚的体外抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2015,41(9):148-152.
- [2]刘佳,高敏,殷忠,等. 贵州省4种食用野生菌氨基酸含量分析[J]. 中国卫生工程学,2010(4):294-294.
- [3]卢可可,谭玉荣,吴素蕊,等. 不同产地尖顶羊肚菌多酚组成及抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2015,36(7):6-11.
- [4]马利,李霞,张松. 尖顶羊肚菌胞外多糖提取物对皮肤成纤维细胞增殖和衰老的影响[J]. 菌物学报,2014,33(2):385-393.
- [5]孙延芳,刘艳凯,梁宗锁,等. 6种食用菌多酚及其抗氧化活性研究[J]. 广东农业科学,2011,38(16):76-78.
- [6]杜军良,黄静,胡杨,等. 浊点萃取-火焰原子吸收光谱法测定啤酒中痕量铅[J]. 食品工业科技,2013,34(11):303-306.
- [7]杜军良,尤海霞,胡杨,等. 浊点萃取-火焰原子吸收法(CPE-FAAS)测定蜂蜜中痕量锰[J]. 食品发酵与工业,2013,39(2):192-195.
- [8]沈跃跃,廖洋,毛卉,等. 浊点萃取-火焰原子吸收光谱法测定消食类中草药中的铅[J]. 分析实验室,2014,33(12):1389-1391.
- [9]刘洪波,赵晓芳,石贵英,等. 浊点萃取反萃取-气质联用测定金线莲中5种拟除虫菊酯类农药残留[J]. 中国中药杂志,2014,39(15):2859-2862.