

# 几种提取溶剂对富硒香菇中有机硒含量测定的影响

杨学华, 邓世林\*

(湖南省振华食品检测研究院, 长沙 410000)

**摘要:** **目的** 研究不同提取溶剂对富硒香菇中的有机硒含量测定的影响。**方法** 采用纯水、无水乙醇及盐酸(6 mol/L)3种不同提取溶剂对香菇中无机硒进行提取, 通过测定总硒和无机硒, 两者差减而得到有机硒含量, 探讨不同提取体系对有机硒含量测定的影响。**结果** 用乙醇提取, 仅有一半有机硒被提取出, 无法准确测定有机硒含量; 盐酸(6 mol/L)提取, 会导致无机硒测定结果略为偏高且操作较繁琐, 不适合香菇中有机硒的测定; 直接用水提取, 测定结果比较符合香菇中有机硒的含量。直接用水提取方法的测定检出限 0.039  $\mu\text{g/L}$ , 无机硒加标回收率为 99.26%~102.72%, 精密度测定相对标准偏差小于 4.81%。**结论** 水提取测定无机硒, 通过总硒相减得到有机硒含量, 对于香菇中有机硒含量测定, 该法简单、快速, 是一种较为理想的方法。

**关键词:** 富硒香菇; 有机硒; 提取溶剂

## Effect of different extractants on the determination of organic selenium in selenium-enriched mushrooms

YANG Xue-Hua, DENG Shi-Lin\*

(Hunan Zhenhua Institute of Food Inspection and Research, Changsha 410000, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the effect of different extraction solvents on the determination of organic selenium in edible selenium-enriched mushrooms. **Methods** Samples were extracted by ethanol, water and HCl (6 mol/L). The organic selenium was figured out by subtract inorganic selenium from total selenium after detection. **Results** The results showed that only half of the organic selenium could be extracted by ethanol, which might lead to inaccurate measurement. The detected inorganic selenium result was a little higher than the actual value by HCl extraction, which was not suitable for the determination of organic selenium in mushrooms. Water extraction was suitable for organic selenium determination for its result was conformed with the actual value. The detection limit of inorganic selenium was 0.039  $\mu\text{g/L}$ . The recoveries of inorganic selenium were 99.26%~102.72%, with the RSD less than 4.81%. **Conclusion** Water is a perfect solvent for inorganic selenium extraction, which is proved to be a simple, rapid, and suitable method for the detection of organic selenium in selenium-enriched mushrooms.

**KEY WORDS:** selenium-enriched mushrooms; organic selenium; extractants

## 1 引言

硒是人体必需的微量元素, 是多种酶的构成成分。医学证实, 硒具有抗衰老、养肝护肝、防癌抗癌、预防心血

管疾病、重金属解毒等功效<sup>[1-4]</sup>。硒对健康的影响受到人们的密切关注, 而硒元素的形态又影响硒在动物体内的吸收和生物作用的发挥。研究表明, 无机硒中  $\text{SeO}_3^{2-}$  经人体吸收后, 代谢会产生较多活性氧, 造成肝脏慢性中毒<sup>[5]</sup>。由于

\*通讯作者: 邓世林, 教授, 主要研究方向为食品营养、微量元素与健康。E-mail: 1136454490@qq.com

\*Corresponding author: DENG Shi-Lin, Professor, Hunan Zhenhua Institute of Food Inspection and Research, No.28, Zhenhua Road, Yuhua District, Changsha 410000, China. E-mail: 1136454490@qq.com

无机硒毒性大,生物活性低;而有机硒毒性小,易吸收,生物利用率高,是当前研究和开发的热点<sup>[6]</sup>。近年来,各种与硒相关的营养保健品应运而生。然而,富硒保健食品中,硒的形态、种类对保健效能影响很大,部分富硒食品选择添加人工合成有机硒,如硒代蛋氨酸、硒代半胱氨酸。除此之外,通过对植物施硒肥或喷洒无机硒,使无机硒在植物体内转换成有机硒,因成本低、效率高,也成为富硒食品的生产的一种方式。然而植物体内无机硒转换成有机硒需要一定周期,所得产品可能仍有部分无机硒,因此对其中的有机硒及所占比例进行准确测定显得尤为重要。文献<sup>[7-10]</sup>及标准<sup>[11]</sup>所报道的测定方法大多是测定总硒,对有机硒的测定报道较少。对于天然植物类样品中有机硒的测定,现仅有标准 DB3301/T 117-2007<sup>[12]</sup>,且仅限于大米中硒的测定,而对于其他常见富硒食品如富硒香菇、富硒酵母等均无测定标准。本研究对比了几种提取溶剂对富硒香菇中有机硒含量测定的影响,对提取方法进行选择优化,为富硒食用菌中有机总硒的测定和有机总硒检测方法标准的建立提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

AFS-230E 双道原子荧光光度计(北京海光仪器有限公司)。

1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硒单元素标准溶液(国家钢铁材料分析测试中心)。

盐酸、硝酸、高氯酸、硼氢化钠(优级纯,国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇、氢氧化钠、铁氰化钾(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 盐酸提取

取 0.20~0.50 g 样品于 25 mL 具塞比色管中,加 6 mol/L 盐酸 20 mL,70  $^{\circ}\text{C}$  水浴振荡 2 h,冷却定容,用脱脂棉过滤,所得滤液在沸水浴加热 20 min,冷却。取 1 mL 于 25 mL 具塞比色管中,加水定容至 10 mL,加入 2 mL 浓盐酸,1 mL 铁氰化钾(100 g/L)溶液,混匀待测。

#### 2.2.2 乙醇提取

取 1.0 g 样品于 50 mL 烧杯,加 25 mL 乙醇,磁力搅拌 30 min,转移到 100 mL 容量瓶,乙醇定容,在冰箱 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 1 h,取 50 mL 至 50 mL 离心管中,5000 r/min 离心 30 min,取上清液 1 mL 于 25 mL 具塞比色管中,加水定容至 10 mL,加 2 mL 浓盐酸,1 mL 铁氰化钾(100 g/L)溶液,混匀待测。

#### 2.2.3 乙醇提取(直接有机硒的测定)

取 1.0 g 样品于锥形瓶中,加 20 mL 水,100  $^{\circ}\text{C}$  水浴将水蒸至近干形成匀浆,放下冷却至室温,加 20 mL 无水乙醇,超声提取 30 min,转移至 50 mL 离心管,4000 r/min 离

心 30 min,取上清液。残渣反复用无水乙醇提取 2 次,合并上清液,加热蒸去大部分乙醇,采用 GB 5009.93-2010《食品安全国家标准 食品中硒的测定》中方法进行样品处理(见 2.2.5)及测定。

#### 2.2.4 纯水提取

称取 0.40 g 样品于 100 mL 烧杯中,加入 50 mL 去离子水,磁力搅拌 30 min,4  $^{\circ}\text{C}$  静置 1 h,取出转移至 50 mL 离心管中,5000 r/min 离心 30 min,取上清液 1 mL 于 25 mL 具塞刻度管中,加入 2 mL 浓盐酸,1 mL 铁氰化钾溶液,混匀待测。

#### 2.2.5 总硒测定

称取 0.5 g 样品于 100 mL 高脚烧杯中,加入混酸(硝酸:高氯酸=9:1, V:V)25 mL,在温控电热板上 200  $^{\circ}\text{C}$  消解,剩余酸约 2 mL 时取下冷却,加入 5 mL 盐酸(6 mol/L),继续加热,直至冒白烟,取下冷却,转移至 25 mL 具塞比色管中,加水定容至 10 mL,加入 2 mL 浓盐酸,1 mL 铁氰化钾溶液,混匀待测。

#### 2.2.6 校正曲线

准确吸取 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  的硒标准工作溶液 0.05、0.10、0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 于 25 mL 具塞比色管中,用水定容至 10 mL,加入浓盐酸 2.0 mL,铁氰化钾溶液 1.0 mL,制成标准工作系列溶液,混匀待测。

### 2.3 仪器工作条件

负高压:340 V;总电流:40 mA;辅阴极电流:20 mA;原子化器高度:8 mm;载气流量:500 mL/min;屏蔽气流量:900 mL/min;读数时间:14 s。

## 3 结果与分析

### 3.1 线性范围

配制系列不同质量浓度的硒标准溶液,按试样测定方法进行测定,作浓度与荧光响应关系曲线。结果表明,硒溶液浓度在 0.039~61.6  $\mu\text{g}/\text{L}$  范围内与荧光响应呈线性关系,相关系数为 0.9999。

### 3.2 样品测定精密度与检出限

取 6 份同一样品进行处理,平行测定 6 次,荧光值的平均值为 74.47,相对标准偏差(RSD)为 4.81%。对样品空白溶液测定 11 次,得标准偏差  $\sigma_{n-1}=0.855$ ,已知校正曲线斜率  $b=65.288$ ,按  $DL=3\sigma_{n-1}/b$  计算,本法测定硒的检出限为 0.039  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

### 3.3 硼氢化钠浓度及盐酸浓度的选择

氢化物反应过程中,  $\text{BH}_4^-$ 、 $\text{H}^+$  及  $\text{SeO}_3^{2-}$  是参与反应的反应离子,硼氢化钠和盐酸浓度会对溶液中硒化氢的生成有影响,本文研究了两者浓度对荧光信号的影响。为减少测定过程中硼氢化钠溶液被氧化,还原剂中均添加 0.5% NaOH。

表 1 NaBH<sub>4</sub> 浓度对荧光响应的影响(*n*=3)  
Table 1 Influences of the concentration of NaBH<sub>4</sub> on fluorescent response (*n*=3)

硼氢化钠 浓度/%	0.2	0.4	0.6	0.8	1.2	1.6
荧光响应/IF	0	305.1	890.2	1075.8	1062.3	1070.6
RSD/%	0	3.60	1.85	1.32	1.42	1.25

表 2 盐酸浓度对荧光响应的影响(*n*=3)  
Table 2 Influences of the concentration of HCl on fluorescent response (*n*=3)

盐酸浓度/%	4	8	12	16	20	24
荧光响应/IF	1128.1	1145.2	1130.1	1095.5	1100.3	1104.4
RSD/%	1.55	0.70	1.40	1.05	1.13	1.16

从表 1、表 2 可看出, 随着 NaBH<sub>4</sub> 浓度由 0.2% 升高到 0.8%, 荧光信号不断升高。NaBH<sub>4</sub> 浓度高于 0.8% 后, 荧光响应信号基本不变, 表明 NaBH<sub>4</sub> 最佳浓度为 0.8%。保持 NaBH<sub>4</sub> 浓度为 0.8%, 改变待测标液中 HCl 浓度, 发现盐酸浓度在 4%~24% 范围内, 荧光响应信号变化很小。为与 GB 5009.93-2010 总硒测定条件一致, 实验上机液中 HCl 浓度均控制为 16%。

### 3.4 提取条件对有机硒测定的影响

#### 3.4.1 乙醇提取测定有机硒

文献报道可通过乙醇提取植物体中有机硒, 消解后可测得有机硒含量, 而国标国家标准征求意见稿《食品安全国家标准 食品营养强化剂 富硒食用菌粉》中却是乙醇提取无机硒, 直接上机测定无机硒含量, 差减测得有机硒。两种方法互相矛盾, 本研究对此进行了对比。

植物中的有机硒一般以硒多糖、硒蛋白和硒核酸 3 种形式存在。根据相似相溶原理, 可以用有机溶剂对植物中的有机硒进行提取。孙新涛等<sup>[13]</sup>采用乙醇提取, 测定了茶叶中的有机硒含量。本研究以无水乙醇为溶剂, 用 2.2.3 中的提取方法进行提取, 测定香菇中的有机硒。结果如表 3 所示。

表 3 无水乙醇提取有机硒测定结果  
Table 3 Determination of organic selenium by ethanol extraction

样品	有机硒含量 (mg/kg)	总硒含量 (mg/kg)	有机硒所占 比例(%)
富硒香菇粉 C	53.71	102.10	52.61

通常情况下, 香菇中有机硒所占比例一般在 98% 以上, 用乙醇提取所得有机硒含量仅为 52.6%, 表明乙醇对香菇中有机硒提取不完全, 因为香菇中含有的其他形态的硒如水溶多糖、水溶蛋白、酸溶蛋白、碱溶蛋白等无法提出<sup>[14-16]</sup>, 导致有机硒测定值偏低。

无水乙醇能提取出部分有机硒, 但因有机硒不能形成氢化物, 如乙醇能提取出无机硒, 其中的有机硒对无机硒测定结果无影响。采用 2.2.2 中方法对无机硒进行提取, 发现无水乙醇无法有效提取无机硒, 无机硒测定值为 0 mg/kg。因为无机硒如亚硒酸钠易溶于水(溶解度 950 g/L, 20 °C), 不溶于无水乙醇, 因此该国标征求意见稿不适用于香菇中无机硒的提取。

#### 3.4.2 纯水及无水乙醇提取测定香菇中无机硒

天然植物中有机硒多以硒多糖和硒蛋白两种形式存在, 而硒蛋白又分为酸溶、水溶、碱溶蛋白等, 因此难以通过溶剂提取一次将有机硒提取完全。采取合适的方法将样品中无机硒提出, 通过测定总硒和无机硒, 二者相减得到有机硒的含量, 这种方法对于植物样品中有机硒含量的测定更为可行。

无机硒(如亚硒酸钠)不溶于有机溶剂, 实验采用了纯水和盐酸(6 mol/L)作溶剂, 提取香菇中的无机硒。测定结果如表 4 所示。

从表 4 可以看出, 采用 6 mol/L 盐酸提取出的无机硒含量比水提取的多 1 倍以上。有机硒所占比例, 纯水提取为 99.5% 以上, 而 6 mol/L 盐酸提取为 98.6%~98.9%。其可能因为, 提取过程用盐酸水浴加热, 导致了有机硒分解, 少量有机硒转变为无机硒。

表 4 2 种提取溶剂及硒检测结果比较(*n*=3)  
Table 4 Comparison of extraction solvents and selenium detection results (*n*=3)

样品	总硒含量 (mg/kg)	纯水提取			盐酸(6 mol/L)提取		
		无机硒含量 (mg/kg)	RSD%	有机硒比例 (%)	无机硒含量 (mg/kg)	RSD%	有机硒比例 (%)
香菇粉 A	301	0.77	8.84	99.74	3.29	4.56	98.91
香菇粉 B	320	1.65	3.90	99.48	3.37	5.35	98.95
香菇粉 C	102.1	0.123	8.92	99.88	1.37	6.62	98.66

## 3.4.3 加标回收率测定

以硒元素标准溶液作为无机硒加标物,加入一定量到香菇粉 A 中,按照 2.2.1 和 2.2.4 中的方法进行处理,测定加标回收率,结果见表 5 和表 6。

表 5 盐酸(6 mol/L)提取无机硒加标回收结果( $n=3$ )  
Table 5 Recovery results of inorganic selenium by HCl (6 mol/L) extraction ( $n=3$ )

样品	加入无机 硒量(mg/kg)	测得无机 硒量(mg/kg)	无机硒 回收率(%)	RSD%
对照香菇	--	3.29	--	--
对照香菇	8.125	11.49	100.91	7.57
对照香菇	16.25	19.99	102.75	4.13
对照香菇	32.5	34.78	96.88	3.65

表 6 纯水提取无机硒加标回收结果( $n=3$ )  
Table 6 Recovery results of inorganic selenium by water extraction ( $n=3$ )

样品	加入硒量 (mg/kg)	测得无机硒量 (mg/kg)	无机硒 回收率(%)	RSD%
对照香菇	--	0.77	--	--
对照香菇	8.125	9.12	102.72	3.96
对照香菇	16.25	16.90	99.26	2.83
对照香菇	32.5	33.15	99.63	4.95

从表 5、表 6 可知,2 种提取方式所得回收率都较合理,其中盐酸(6 mol/L)提取无机硒加标回收率在 96.88%~102.75%,水提取无机硒加标回收率为 99.26%~102.72%。2 种提取方式,无机硒回收率均很高,其中水提取加标回收率更为理想。

## 4 结论

乙醇、6 mol/L 盐酸及纯水 3 种体系提取测定香菇中有机硒,无水乙醇对有机硒的提取率为 52.61%,对无机硒提取率则为 0%。文献报告及国标征求意见稿不适用于香菇中有机硒的测定;盐酸、水 2 种体系通过提取无机硒,测定总硒与之相减得到有机硒含量。同一样品用盐酸和水提取,盐酸提取无机硒测定值为水提的两倍以上,但两者无机硒加标回收率分别为 96.88%~102.75%、99.26%~102.72%,回收率都在 95%~105%范围内,表明盐酸提取过程可能有部分有机硒分解转变为无机硒,水提取无机硒更为理想。此外盐酸提取易形成胶体,过滤困难,而纯水提取过程简单、高效,更适合香菇中有机硒的提取和测定。

## 参考文献

[1] 张俊杰. 硒的生理功能及富硒强化食品的研究进展[J]. 微量元素与健康

康研究, 2006, 23(3): 58.

Zhang JJ. The biological functions of selenium and research development of Se-enriched foodstuff [J]. Stud Trace Elem Health, 2006, 23(3): 58

[2] Schrauzer GN. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity [J]. J Nutr, 2000, 130: 1653-1656.

[3] 骆利欢, 黄琳. 有机硒与维生素 E、蛋氨酸、碘的协同作用[J]. 广东饲料, 2007, 16(4): 28-30.

Luo LH, Huang L. Cooperative effect of organic selenium, vitamin E, methine and iodine [J]. Guangdong Feed, 2007, 16(4): 28-30.

[4] 姚昭, 李红艳, 张云龙, 等. 有机硒、无机硒、VE 单独使用及有机硒与 VE 联用对大鼠体内抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 272-276.

Yao Z, Li HY, Zhang YL, et al. Effects of Se-SMC, sodium selenite and VE and combination of Se-SMC and VE on antioxidant defense system in rats [J]. Food Sci, 2013, 34(15): 272-276.

[5] 徐辉碧, 马志明, 程骅. 硒化合物毒性的自由基机理. 华中理工大学学报. 1991, 19(1): 13-19.

Xu HB, Ma ZM, Cheng Y. The free radical mechanism of the toxicity of selenium compounds [J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 1991, 19(1): 13-19.

[6] 朱善良. 硒的生物学作用及其研究进展[J]. 生物学通报, 2004, 39(6): 6-8.

Zhu SL. Biological effect of Selenium and its research advances [J]. Bull Biol, 2004, 39(6): 6-8.

[7] 邓世林, 李新凤, 郭小林. 流动注射原子吸收光谱法测定茶叶中的微量硒[J]. 微量元素与健康研究, 2002, 19(1): 58-60.

Deng SL, Li XF, Guo XL. Determination of selenium in tea by flow injection-atomic absorption spectrometry [J]. Stud Trace Elem Health, 2002, 19(1): 58-60.

[8] 邓世林, 李新凤, 郭小林. 流动注射氢化物发生原子吸收光谱法测定禽蛋中的硒[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(3): 809-811

Deng SL, Li XF, Guo XL. Determination of selenium in poultry eggs by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry [J]. Spectrosc Spect Anal, 2010, 30(3): 809-811

[9] 邓世林, 李新凤, 郭小林. 流动注射原子吸收光谱法测定富硒天麻、葡萄及大米中的硒[J]. 分析实验室, 2003, 22(2): 54-56.

Deng SL, Li XF, Guo XL. Determination of selenium in Se-riched *Gastrodia elata* Blume, grape and rice by flow injection atomic absorption spectrometry [J]. Anal Lab, 2003, 22(2): 54-56.

[10] 刘鸿稿, 王元忠, 李涛, 等. 流动注射原子吸收光谱法测定大白口蘑中的微量硒[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(9): 1030-1032.

Liu HG, Wang YZ, Li T, et al. Determination of selenium in *Tricholoma giganteum* by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry [J]. Spectrosc Spect Anal, 2007, 27(9): 1030-1032.

[11] GB 5009.93-2010 食品安全国家标准食品中硒的测定[S].

GB 5009.93-2010. National food safety standard-Determination of selenium in foods [S].

[12] DB 3301/T117-2007 稻米中有机硒和无机硒含量的测定 原子荧光光谱法[S].

DB 3301/T117-2007 Determination of organic selenium and inorganic selenium rice-Atomic fluorescence spectrometry[S].

[13] 孙新涛, 马往校, 张双隼. 食品中有机硒的测定方法的研究[J]. 陕西农业科学, 2014, 60(2): 35-37.

Sun XT, Ma WX, Zhang SJ. Study on the determination of organic selenium in food [J]. Shaanxi J Agric Sci, 2014, 60(2): 35-37.

- [14] 武芸. 富硒黑木耳中硒的分布规律及赋存形态的初探[J]. 食用菌, 2008, (5): 5-6.

Wu Y. Study on the distribution and speciation of selenium in selenium enriched black fungus [J]. Edible Fungi, 2008, (5): 5-6.

- [15] 钟鸣, 王丽贺. 蛹虫草中硒的赋存形态及蛋白硒分析[J]. 广东微量元素科学, 2008, 15(3): 35-40.

Zhong M, Wang LH. Analysis on speciation of selenium and Se-protein in *Cordyceps militaris* [J]. Guangdong Trace Elem Sci, 2008, 15(3): 35-40.

- [16] Gergely V, Kubachka KM, Mounicou S, et al. Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2006, 1101: 94-102.

(责任编辑: 杨翠娜)

### 作者简介



杨学华, 硕士, 主要研究方向为光谱及质谱检测方法开发。

E-mail: 609526904@qq.com



邓世林, 教授, 主要研究方向为食品营养、微量元素与健康。

E-mail: 1136454490@qq.com