

超声波水浴辅助消解-原子荧光光谱法测定食用菌中硒含量

吴庆晖¹, 黄伯熹², 冉文清¹, 荀 合¹, 魏 强¹, 李正全¹, 陈 泳¹

(1. 中国广州分析测试中心, 广东省分析测试技术公共实验室, 广东 广州 510070;

2. 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东 广州 510623)

摘 要: 为提高检测效率, 建立超声波水浴辅助消解-原子荧光光谱法测定食用菌中硒含量的方法。对仪器实验条件进行正交试验优化, 对样品前处理方法、铁氰化钾的影响和方法选择性等影响因素进行研究, 根据样品检测结果进行原因分析及安全性评价。该方法检出限为0.20ng/mL, 加标回收率为91.6%~102.7%。与国标方法对照, 提高了样品前处理效率且结果无显著性差异, 为食用菌中硒的检测与质量控制提供了一种快速、准确的分析方法。

关键词: 超声波; 水浴; 原子荧光光谱; 食用菌; 硒

Determination of Selenium in Edible Mushrooms by Ultrasonic Assisted Water Bath Digestion-Atomic Fluorescence Spectrometry

WU Qing-hui¹, HUANG Bo-xi², RAN Wen-qing¹, XUN He¹, WEI Qiang¹, LI Zheng-quan¹, CHEN Yong¹

(1. China National Analytical Center, Guangzhou, Guangdong Provincial Public Laboratory of Analysis and Testing Technology, Guangzhou 510070, China; 2. Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: A method to determine selenium in edible mushroom was developed using ultrasonic assisted water bath digestion followed by atomic fluorescence spectrometry (AFS). The optimum instrumental parameters were established using an orthogonal array design. Besides, the effects of digestion methods and digestion in the presence or absence of potassium ferricyanide on the results of AFS were investigated. AFS was used to determine the selenium contents of different edible mushrooms and the causes of selenium enrichment and the food safety were analyzed based on the results obtained. The limit of detection of the AFS method was 0.20 ng/mL. The sample pretreatment was more efficient and the results of AFS obtained using ultrasonic assisted water bath digestion showed no significant differences compared with wet digestion. AFS can provide a rapid and accurate to analyze selenium in edible mushroom.

Key words: ultrasonic; water bath; atomic fluorescence spectrometry (AFS); edible fungi; selenium

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)24-0299-04

硒(selenium)是人体一种必需微量元素^[1-2], 适量补充硒具有清除体内自由基、增强人体免疫力^[3]、延缓衰老、预防癌症^[4]、防治地方性缺硒症(克山病^[5]、大骨节病^[6])及心血管疾病^[7]和拮抗重金属毒性^[8]等多种生物功能。我国约有72%地区处于缺硒状态。日常生活中, 食物是人体从环境中摄取硒的主要途径^[1]。

食用菌(edible fungi)俗称“菇”、“蕈”、“菌”、“耳”, 是一类可供人们食用的大型真菌, 具有肉质、胶质或纤维质的子实体^[9]。我国的食用菌资源丰富, 是最早栽培和利用食用菌的国家之一。食用菌具有很高的食用价值, 含有人体必需的8种氨基酸、14种维生素和多种矿物质、微量元素、多糖、蛋白质等物质。食用菌还具

有很高的保健药用价值, 能预防和治疗多种疾病, 具有抗肿瘤活性、增强免疫力、调节血压血脂、降血糖、保肝解毒、抗菌抗病毒等功效^[10]。研究表明, 食用菌自身具有富集硒的能力, 是一种高效低毒的补硒天然食品。由于它具有一定的硒耐受能力, 可以进行有目的的富硒食用菌栽培^[11]和应用。富硒食用菌有较高的硒生物利用率, 是一种良好的人体补充硒元素食物来源^[12]。因此建立准确、快速的食用菌中硒含量测定方法, 为该食用药用资源的研究开发和利用提供科学实验依据, 具有实际意义。

目前对食品中痕量硒的测定方法主要有2,3-二氨基萘荧光法^[13]、分光光度法^[14-15]、极谱法^[16]、原子吸收光谱法^[17-18]、

收稿日期: 2011-12-12

作者简介: 吴庆晖(1975—), 男, 高级工程师, 硕士, 主要从事食品及中药光谱分析研究。E-mail: scutgz@163.com

电感耦合等离子体质谱法^[19]、中子活化法^[20]和高效液相色谱法^[21]。上述方法各有优缺点,本实验拟建立一种超声波水浴辅助消解-原子荧光光谱法快速测定食用菌中硒方法,并为其方法的推广应用提供一定参考依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

所有食用菌样品均为干品。

Se标准储备液(GSBG 62029—1990, 1000 μ g/mL) 国家钢铁材料测试中心钢铁研究总院;硼氢化钾(AR)、氢氧化钾(AR)、盐酸(GR)、铁氰化钾(AR),其他试剂均为优级纯,实验用水为去离子水。所有实验器具用前均以硝酸(1+1)浸泡24h并用去离子水洗净晾干备用。

硼氢化钾(14g/L)溶液:称取硼氢化钾14g,氢氧化钾4.0g,用去离子水溶解,定容至1000mL,现用现配;载流:1.2mol/L盐酸溶液;铁氰化钾溶液(10.0g/L):称取铁氰化钾1.0g,用去离子水溶解,定容至100mL。

1.2 仪器与设备

AF-640双道原子荧光光度计 北京瑞利仪器厂; KQ-600KDE台式高功率数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; EH-35A微控数显电热板 北京莱伯泰科公司; P1000移液器 法国Gilson公司; BS 110S电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.3 仪器工作条件

空心阴极灯(hollow cathode lamp, HCL)主阴极电流:70mA; HCL辅助阴极电流:35mA;光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)负高压:300V;氩气载气流量:600mL/min;氩气辅助气流量:300mL/min;原子化器温度:200 $^{\circ}$ C;采样泵速:100r/min;采样时间:4s;注入泵速:100r/min;注入时间:16s;原子化方式:火焰法;读数时间:14.0s;延时时间:0.0s。

测量方法:标准曲线法;读数方法:峰面积。

1.4 样品测定方法

食用菌去除杂质后,用不锈钢食品打粉机研磨粉碎混匀,过20目筛,转移到已编号的聚乙烯塑料瓶内。

准确称取食用菌样品0.25~0.50g(精确到0.1mg)(若样品为富硒产品可适量少取)于50mL锥形瓶中,分别加入浓硝酸2mL,高氯酸2.5mL,在瓶口处放一小玻璃漏斗。放置于已预热恒温(60 $^{\circ}$ C)的数控超声波清洗器水浴中,对样品进行30min的超声波水浴处理,然后置于电热板上在150 $^{\circ}$ C条件下进行加热消化,若期间消解液变棕色或者炭化变黑,取下放冷,补加一定量浓硝酸继续消解至样品冒白烟且消解液颜色呈清亮透明,之后再继续消解5min,以彻底赶掉剩余的硝酸。这是因为残留的硝酸具有氧化性会对后面硒的还原产生负干扰,影响测

定结果,所以在样品消化过程中一定要赶尽硝酸。取下稍冷,加入浓盐酸3mL,把试液中的Se⁶⁺全部还原转化成Se⁴⁺,放冷,用去离子水定容至25mL,摇匀,上机测定。同时做样品空白溶液。

2 结果与分析

2.1 样品前处理方法的选择

食品中硒含量检测的前处理常用方法是微波消解法^[19]和湿式消解法,微波消解法所需的微波消解系统较贵,而且操作比较繁琐,不适用于大批量样品的检测。国标^[22]中对湿式消解法的样品前处理先采用冷消解过夜,让样品与酸充分浸润,然后进行加热消化,需时较长。本方法采用超声波水浴辅助消解,利用超声波空化作用^[23]所产生的微小气泡增加了样品与酸的接触频率和接触面积,而高频振荡所产生的局部压强和温度的升高,使样品溶液的热动力扩散系数增大,加速了消解过程的进行。与国标方法对比实验结果表明,该法不需要冷消解过夜,提高了样品前处理效率,缩短了前处理时间。

前处理的消化温度为150 $^{\circ}$ C时,硒的损失量最小^[24]。消解时,在锥形瓶上加一个小漏斗,由于小漏斗的回流作用,不仅可以更加有效地避免硒的损失,并且也减少硝酸和高氯酸的直接蒸发,提高了酸的使用效率,节约了试剂。

消化液中保持适当的酸度不仅可以提高方法灵敏度,而且可以减少某些金属元素对氢化物反应产生干扰^[25]。但是如果酸度太高,会对仪器产生腐蚀,综合考虑,故本方法在消化液和载流中均保持1.2mol/L左右的盐酸酸度。

2.2 仪器条件的正交试验优化

采用正交试验设计^[26]五因素四水平 $L_{16}(4^5)$ 方法,根据文献^[27]和仪器使用说明书^[28]推荐的硒分析技术条件因素及水平,选择灯电流、光电倍增管负高压、载气流量、辅助气流量和原子化器温度5个关键仪器工作条件及水平进行优化,试验设计见表1。

表1 仪器条件优化 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计
Table 1 Coded values and corresponding actual values of the instrumental parameters used for orthogonal array design

水平	A灯电流/mA	B负高压/V	C载气流量/(mL/min)	D辅助气流量/(mL/min)	E原子化器温度/ $^{\circ}$ C
1	40	240	600	100	100
2	50	260	700	200	200
3	60	280	800	300	300
4	70	300	900	400	400

通过改变仪器工作条件,以荧光强度的大小作为正交试验衡量指标。根据测得的荧光强度进行极差分析,

得到对试验结果影响因素的主次顺序依次为： B (光电倍增管负高压) $>A$ (灯电流) $>C$ (载气流量) $>E$ (原子化器温度) $>D$ (辅助气流量)。找出测定硒的最优工作参数组合为 $A_4B_4C_1D_3E_2$ ，即灯电流70mA，光电倍增管负高压300V，载气流量600mL/min，辅助气流量300mL/min，原子化器温度200℃，见图1、2。

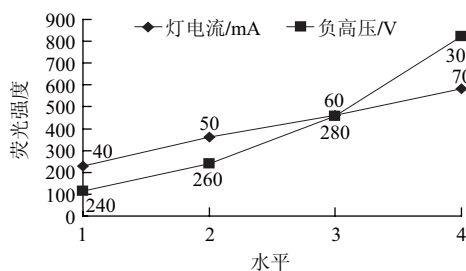


图1 灯电流、负高压与荧光强度的关系

Fig.1 Effects of lamp current and negative high voltage on fluorescence intensity

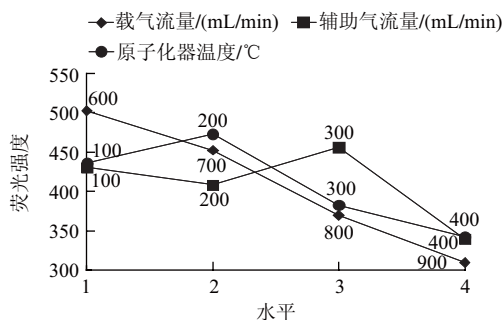


图2 载气流量、辅助气流量、原子化器温度与荧光强度的关系

Fig.2 Effects of carrier gas flow rate, assistant gas flow rate and atomizer temperature on fluorescence intensity

2.3 铁氰化钾的影响和方法选择性

国标方法在消化液中加入铁氰化钾(100g/L)1.0mL作为掩蔽剂，目的是消除样品中一些共存离子的干扰。对黄绿密环菌样品分别实验添加与不添加铁氰化钾溶液两种情况，结果表明两者无显著性差异，所以本方法选择不加铁氰化钾。

食用菌中存在的主要金属离子是钾、铁、镁、钙、锌、钠、锰等^[29]，其他金属离子均属痕量。对10.00ng/mL硒标准溶液进行测定，以相对偏差10%为判定标准，试验结果表明在不加铁氰化钾溶液情况下，500倍的 K^+ 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ，200倍的 Zn^{2+} 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 对测定结果无干扰。究其原因，在氢化物反应过程中，被测元素硒以硒化氢气体的形式从被测溶液中发生及分离，这种气液分离的方式可以有效地避免样品中共存元素的干扰，使方法对硒元素有很高的选择性。

2.4 标准工作曲线、方法检出限和重复性实验

用含10% HCl溶液把硒标准储备液逐级稀释至0.00、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00、120.00ng/mL的标准系列工作溶液。上机测定标准系列溶液，试验结果表明

硒的质量浓度(C)在0.00~120.00ng/mL内与荧光强度(I)呈线性关系，线性回归方程为： $I=12.62+56.12C$ ，相关系数 $r=0.9999$ 。

对样品空白溶液连续测定11次，方法检出限(R_{SN})为0.20ng/mL，定量下限为0.7ng/mL。若取0.50g(精确到0.1mg)样品测定，质量浓度的检出限为0.010mg/kg，定量下限为0.04mg/kg。平行处理5份黄绿密环菌的样品，上机测定，计算得出样品中硒的平均含量为4.14mg/kg，相对标准偏差为4.2%。

2.5 方法准确性

2.5.1 加标回收实验

准确称取5份黄绿密环菌样品，各0.25g(精确到0.1mg)，定量加入1mL的1.000μg/mL硒标液，按1.4节方法进行样品前处理，上机测定，硒的加标回收率为91.6%~102.7%。

2.5.2 两种前处理方法的比对实验

分别应用超声波水浴辅助消解方法和国标^[22]中的湿式消解法对不同食用菌样品进行前处理，用原子荧光光谱法进行硒含量的测定($N=2$)，结果见表2。数据经配对设计 t 检验，两种前处理方法的测定结果无显著性差异($P>0.05$)。

表2 两种前处理方法测得的硒含量对比

Table 2 Comparison of results obtained using ultrasonic assisted water bath digestion and wet digestion for determination of selenium content

样品名称	硒含量/(mg/kg)		相对标准偏差/%
	超声波水浴辅助消解法	国标中的湿式消解法	
蛹虫草子实体	0.12	0.13	5.4
黄绿密环菌	4.14	3.95	3.4
富硒肉灵芝	41.1	44.3	5.1
平菇	0.31	0.34	6.2
富硒红曲菌(粉)	442	415	4.6
香菇	0.53	0.51	2.8

2.6 样品分析

按1.4节方法对以下食用菌样品进行平行样检测，分别计算出硒的平均含量见表3。

表3 样品分析结果

Table 3 Results of determination of selenium in different edible mushrooms

序号	样品名称	硒平均含量/(mg/kg)	序号	样品名称	硒平均含量/(mg/kg)
1	蛹虫草子实体	0.12	13	灵芝0号	3.67
2	虫草(粉)	32.9	14	灵芝1号	8.95
3	虫草(粉)	0.38	15	灵芝2号	25.2
4	白玉菇	0.056	16	灵芝3号	23.7
5	黄绿密环菌	4.14	17	灵芝4号	26.4
6	富硒肉灵芝	41.1	18	灵芝5号	23.4
7	中春虫草子实体(MS)	0.068	19	灵芝1号(粉)	41.8
8	中春虫草子实体(WX粉)	0.056	20	平菇	0.31
9	中春虫草子实体(WX)	0.071	21	富硒红曲菌(粉)	442
10	富硒食用菌	326	22	香菇	0.53
11	甜灵芝(神农3号)	0.47	23	灵芝(2 ^号)	157
12	蛹虫草	0.16	24	灵芝(3 ^号)	217

2.7 样品检测结果的分析及安全性评价

本实验所测定食用菌中硒的含量范围为0.056~442mg/kg,其中富硒红曲菌(粉)测得的硒含量最高,达442mg/kg。食用菌中硒含量的高低,首先与食用菌的种类有关,不同种类食用菌对硒的富集能力存在很大差异^[30]。其次,由于食用菌中的硒元素是从环境中获得的,所以食用菌生长环境中的土壤(培养基)的硒含量、pH值等因素也会对食用菌中硒水平产生影响。根据1989年美国国家科学院食物营养学会推荐硒的膳食供给量(recommended dietary allowance, RDA):男性为70μg/d,女性为55μg/d^[31],以及中国居民膳食中硒的推荐摄入量(recommended nutrient intake, RNI):成年男子为50μg/d,成人个体硒可耐受最高摄入量(tolerable upper intake levels, UL)为400μg/d^[32],本实验中部分食用菌的硒含量偏高。由于中国大部分地区缺硒,只要不是长期、大量地摄入富硒食用菌,对人体健康的影响不会很大。可能基于以上原因,卫生部于2011年1月发布公告^[33]取消了GB 2762—2005《食品中污染物限量》^[34]中硒指标的限量规定。

3 结 论

本实验通过超声波水浴辅助消解,原子荧光光谱法对食用菌中的硒含量进行测定。与国标方法比较,本方法缩短样品前处理的时间,节约了试剂,具有准确性好,线性范围宽,选择性好等优点,为富硒食用菌产品和资源的研究开发提供科学实验方法和依据,适合于批量样品的分析检验。

参考文献:

- [1] 王夔. 生命科学中的微量元素[M]. 2版. 北京: 中国计量出版社出版, 1996: 650-657.
- [2] SCHWARZ K, FOLTZ C M. Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degeneration[J]. Am Chem Soc, 1957, 79(12): 3292-3293.
- [3] DHUR A, GALAN P, HERCBERG S. Relationship between selenium, immunity and resistance against infection[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1990, 96(2): 271-280.
- [4] SCHRAUZER G. N, WHITE D A, SCHNEIDER C J. Cancer mortality correlation studies. III. Statistical associations with dietary selenium intakes [J]. Bioinorg Chem, 1977, 7(1): 23-34.
- [5] 中国医学科学院克山病防治科研小分队. 硒与克山病关系的研究[J]. 中国医学科学院学报, 1979(1): 75-80.
- [6] 李继云, 任尚学, 陈代中. 环境中的硒与大骨节病关系的探讨[J]. 地方病通讯, 1979(2): 22-28.
- [7] SALONEN J T, ALFTHAN G, HUTTUNEN J K, et al. Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study[J]. Lancet, 1982, 320: 175-179.
- [8] IPCS-International programme on chemical safety. Environmental health criteria 58. Selenium[EB/OL]. Geneva: World Health Organization. (1987)[2011-12-10]. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc58.htm>.
- [9] 杨庆尧. 食用菌生物学基础[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981: 1.
- [10] 张学岳. 食用菌学[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1984: 2-4.
- [11] 王新风. 富硒食用菌栽培技术[J]. 中国食用菌, 2002, 21(3): 13-15.
- [12] 肖伟林, 祝寿嵩, 张志强, 等. 富硒食用菌的硒生物利用率[J]. 上海铁道大学学报: 医学版, 1996, 10(3): 180-182.
- [13] 胡益水, 苏文周. 导数荧光法测定茶叶中的硒[J]. 食品科学, 1995, 16(10): 66-69.
- [14] 王莲芳, 窦春霞, 张连富, 等. 有机物中微量元素硒的测定[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 115-117; 147.
- [15] 周华生, 张连龙, 戴舒春, 等. 钼蓝比色法测定保健食品中微量硒[J]. 食品工业科技, 2011(8): 412-414; 477.
- [16] 叶青. 微波消解单扫描极谱法初步分析葛根中微量硒与种植土壤相关性[J]. 食品科学, 2007, 32(2): 226-228.
- [17] 雷郑莉, 郭丽萍, 孙丽英. 氢化物发生-原子吸收法测定食品中硒[J]. 食品科学, 1998, 19(7): 51-53.
- [18] 杨潇, 芮光伟, 许海东. 微波消解-石墨炉原子吸收光谱法检测大米中硒元素的含量[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(1): 138-141.
- [19] 于振花, 荆淼, 黄彦良, 等. 微波消解-电感耦合等离子体质谱测定食品中硒的含量[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(10): 100-103.
- [20] FARDY J J, MCORIST G D, FARRAR Y J. The determination of selenium status in the Australian diet using neutron activation analysis[J]. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 1989, 133(2): 397-405.
- [21] 吴少雄, 杨式华, 杨光宇, 等. 固相萃取富集-高效液相色谱法测定大红景天中微量元素硒[J]. 食品与发酵, 2005, 31(7): 107-109.
- [22] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.93—2010 食品中硒的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [23] VILKHUA K, MAWSONA R, SIMONSA L, et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry: a review[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, 9(2): 161-169.
- [24] 张寒俊. 改进荧光法测定食品中微量硒的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(2): 110-113.
- [25] KIRKBRIGHT G F, TADDIA M. Application of masking agents in minimize interferences from some metal ions in the determination of arsenic by atomic absorption spectrometry with the hydride generation technique[J]. Analytica Chimica Acta, 1978, 100(9): 145-150.
- [26] 贝惠玲. 食品安全与质量控制技术[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 22-31.
- [27] 孙汉文, 冯波. 悬浮进样-氢化物发生原子荧光法用于面粉和富硒盐中微量硒形态分析[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 225-228.
- [28] 北京瑞利分析仪器公司. AF-640 原子荧光光谱仪使用说明书[M]. 北京: 北京瑞利分析仪器公司.
- [29] 林佑, 孙灿, 段志敏, 等. 云南省常见野生食用菌13种矿物质元素调查分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(6): 1521-1523.
- [30] 尚德静, 王关林. 四种食用菌富硒能力的比较研究[J]. 食用菌学报, 1999, 6(3): 17-20.
- [31] Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board, National Research Council. Recommended dietary allowances[M]. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989: 217-223.
- [32] 中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量(简要本)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 70-72.
- [33] 中华人民共和国卫生部. 关于取消《食品中污染物限量》中硒指标的公告[EB/OL]. 北京: 卫生部, 2011年第3号. (2011-02-14)[2011-12-10]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s7891/201101/50536.htm>.
- [34] 中华人民共和国卫生部. GB 2762—2005食品中污染物限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.