

富硒豆的培养及其硒含量分析

薛洪宝^{1,2}, 任小蓉², 李 晖²

(1. 蚌埠医学院 化学教研室, 安徽 蚌埠 233030; 2. 四川大学 化学工程学院, 四川 成都 610065)

摘要: 为了开发新型富硒功能食品——富硒豆, 研究了绿豆和大豆在不同含硒溶液中发芽生长情况。结果表明, 20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高浓度硒培养溶液会对绿豆和大豆的发芽生长产生明显毒性, 且四价硒毒性更强, 表现在四价硒培养的绿豆和大豆发芽率较六价硒低; 分别在 0~3.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0~6.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的六价硒溶液培养下, 绿豆和大豆发芽生长情况基本良好。采用氢化物原子荧光光谱法作外标标准曲线, 并测定培养后的绿豆和大豆硒含量, 结果 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高浓度硒溶液培养的豆含硒量最高, 为 75.0273~102.2612 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而在 0~6.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的六价硒培养条件下, 绿豆和大豆的含硒量分别为 7.5002~69.8483 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 11.1737~58.3926 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 且该硒含量范围适合富硒功能食品硒含量标准。

关键词: 富硒豆; 培养; 硒含量

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)03-0470-04

Cultivation of Selenium-enriched Legumina and Analysis of Its Selenium Content

XUE Hong-bao^{1,2}, REN Xiao-rong², LI Hui²

(1. Teaching and Research Section of Chemistry, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, Anhui; 2. College of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan, China)

Abstract: The mungbean and soybean germinating in different Selenium cultivating solution were investigated for developing Selenium-enriched legumina as rich Selenium foodstuff. The mungbeans and soybeans can be toxic significantly during germination in Selenium solution of high concentrations as 20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The germination rate of mungbean and soybean cultivating in tetravalent Selenium(Se IV) was lower than that in hexavalent Selenium(Se VI). Therefore, the Se IV was more toxic than that of Se VI. When the Se VI concentration below 3.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the mungbeans buds could grow better, while the Se VI concentration below 6.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the soybeans could grow better. Hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) was applied to make the external regression curve, and the Selenium content of mungbean and soybean was determined by this approach. The results indicated that when the legumina was cultivated in high Selenium concentration as 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the detected Selenium was in the range of 75.0273-102.2612 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. When cultivated in Se VI concentrations below 6.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the Selenium content for mungbean and soybean was about 7.5002-69.8483 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 11.1737-58.3926 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, which could meet the national standard of Selenium-enriched foodstuff.

Key words: Selenium-enriched legumina; Cultivation; Selenium content

硒作为人体必需微量元素^[1], 在人体组织内含量虽不超过千万分之一, 但其生物学作用和功能却十分重要^[2]。硒是人体中谷胱甘肽过氧化物酶和硒-P 蛋白等^[3,4]抗氧化酶的重要组成部分, 在体内起到平衡氧化还原作用, 并能有效提高人体免疫力。在国际上对硒增强免疫力和癌症预防的研究已成为热点^[5]。目前, 国际营养学会推荐的成人摄入量为每日 50~250 μg ^[6]。据统计, 我国的 72% 地区属于低、缺硒地区, 近亿人的硒摄入量低于最低推荐值。

无论是动物实验还是临床实践, 都说明人类需要终生补硒。如果从饮食中不能及时补充足够量的硒, 就会降低祛病能力。为了缓解人类的缺硒问题, 相关科研工作者正在开发富硒功能食品, 这就使得富硒食品开发成为目前食品研究领域又一热点^[7]。

该文采用含不同浓度的无机硒(Se IV, Se VI)培养液培养绿豆和大豆, 对其发芽情况、失水率等进行试验分析, 并采用氢化物原子荧光光谱法^[6,8-10]对其含硒量进行测定, 为开发富硒功能食品-富硒豆提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

AFS-3000 型双道氢化物发生-原子荧光光度计(广州北锐精密仪器有限公司, 广州), 高性能双阴极硒灯; 最佳工作条件: 灯电流 90 mA, 负高压 310 V, 原子化器高度 11 mm, 载气流量 350 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 屏蔽气流量 850 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 采用峰面积定量方式, 外标标准曲线法测定。

Speedwave-4 型微波消解系统(Berghof 公司, 德

收稿日期: 2012-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29877018); 安徽省生化药物工程技术研究中心开放课题(BYEC1202)。

第一作者简介: 薛洪宝(1979-), 男, 博士, 主要从事生物分析技术研究。E-mail: hongbaoxueqhd@126.com。

通讯作者: 李晖(1954-), 男, 博士生导师, 教授, 主要从事生物分析技术研究。E-mail: lihui@lhb@sina.com。

国);AFZ-1001AFZ-1001 分子生物型超纯水机(北京泰亚赛福科技发展有限公司,北京);电子天平(Sartorius 公司,精度 0.0001 g);恒温恒湿培养箱(Shell Lab 公司,USA);玻璃培养皿(直径 150 mm,深 25 mm)。

绿豆(*Vigna radiate*,产地:四川雅安),大豆[*Glycine max*(L.)Merrill,产地:四川西昌],GSB 04-1751-2004-硒标准溶液(北京龙天韬略科技有限公司,北京), Na_2SeO_3 (成都格雷西亚化学技术有限公司,成都), Na_2SeO_4 (成都格雷西亚化学技术有限公司,成都),硼氢化钠,铁氰化钾,氦气,盐酸、浓硝酸、高氯酸、双氧水为优级纯等,未特殊指明的均为分析纯试剂,超纯水(电阻率 $\geq 18.23 \text{ M}\Omega$)。

1.2 实验方法

1.2.1 硒含量标准曲线的绘制 取 Se 标准溶液配制成不同浓度系列(0.00, 50.00, 100.00, 150.00, 200.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),摇匀,静置 30 min,待测。

1.2.2 高浓度硒培养的豆发芽情况 分别取大豆和绿豆若干批,每批 60 粒,用蒸馏水冲洗后用 75% 的乙醇浸泡杀菌,再用蒸馏水浸泡 4 h。将每批浸泡好的豆放在滤纸上,并放入培养液中。取培养皿并依次编号,分别加入 200 mL 超纯水、20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 四价硒(Na_2SeO_3)溶液、20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 六价硒(Na_2SeO_4)溶液。最后将培养皿放入恒温培养箱中,保持培养温度 28℃,光暗时间比为 16/8 h,培养 4 d,统计发芽数、未发芽数、坏死数,并测定硒含量。再选择较低的不同浓度系列的六价硒(Na_2SeO_4)培养液进行培养,重复上述培养操作。5 次重复。

将培养好的绿豆和大豆用自来水冲洗,再用超纯水洗去表面杂质,并取一定量的新鲜发芽豆置于烘箱中,在 45℃ 下,烘烤 48 h,称重,重复操作 5 次,计算平均失水率。

1.3 分析样品制备

另取一定量的新鲜发芽豆,粉碎并置于消化罐中,分别加入 5.00 mL 硝酸,2.00 mL 双氧水和 1.00 mL 高氯酸,采用中高火微波消解 5 min,处理后加热赶酸,过滤、转移至 50 mL 容量瓶加 2.00 mL 盐酸、1.00 mL 10% 铁氰化钾掩蔽剂,摇匀,定容至 50 mL,静置 30 min,采用原子荧光法测定 Se 含量,为了保证实验结果的客观性,称取 1.1307 g Na_2SeO_4 固体采用上述消化、定容过程作空白实验,5 次重复。

2 结果与讨论

2.1 硒含量标准曲线的绘制

根据所测定的硒标准溶液浓度系列荧光值对硒浓度作标准曲线,计算出线性回归方程、线性相关系数、检测限等,结果见图 1。所作标准曲线的线

性系数较高: $r^2 = 0.9999$,检测限较低,为 0.0653 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该标准曲线能满足硒培养的绿豆和大豆中硒含量测定要求。

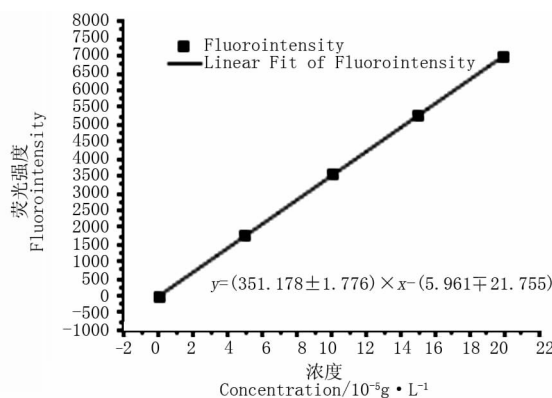


图 1 Se 含量测定线性关系

Fig. 1 The linear regression relationship of Se content determination

2.2 高浓度硒培养的绿豆和大豆发芽情况

绿豆和大豆在水和 20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高浓度硒培养下发芽情况见表 1。培养后的培养皿中有红色硒单质析出,局部伴随腐烂迹象,可能是由于硒浓度过大,对植物体产生毒性作用,从而抑制发芽生长。从空白水溶液培养结果可以看出,绿豆比大豆更容易发芽。不管是绿豆还是大豆在四价硒培养液中发芽率较低,而在六价硒培养液中发芽率较高,可能是由于四价硒较六价硒对豆科植物的毒性较大。从含硒量结果可知四价硒培养液培养的绿豆和大豆含硒量均低于相应的六价硒培养的含硒量。整体看来,绿豆含硒量较大豆含硒量高约 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。总之,20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高浓度硒培养液不适合绿豆和大豆的培养,除了因含硒量明显高于国家标准^[6]外,高浓度的硒会导致豆类植物体机体中毒,而使组织变质,因此为了开发可供食用的富硒豆产品,20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及其以上浓度的硒培养液不适合绿豆和大豆的培养。

2.3 绿豆和大豆在低浓度六价硒培养下的生物学指标结果

鉴于 2.1 中的预培养试验结果,选择 0 ~ 6.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的较低浓度硒酸钠培养液。培养 4 d 的绿豆和大豆发芽情况、失水率及硒含量结果见表 2。当硒浓度在 4.00 ~ 6.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,绿豆发芽就受到不同程度的影响,芽的坏死比例显著增加;在相同情况下,硒对大豆的发芽情况影响不明显。与对照组相比,绿豆和大豆的失水率都有所下降,可能是硒浓度较高,对绿豆和大豆的发芽生长有一定程度的阻碍,降低了机体含水量。培养后的绿豆和大豆硒含量随培养液浓度增加而递增。

表 1 不同培养液下绿豆和大豆的发芽情况

	绿豆 Mungbean			大豆 Soybean		
	水 Water	SeⅣ Tetravalent Selenium	SeⅥ Hexavalent Selenium	水 Water	SeⅣ Tetravalent Sselenium	SeⅥ Hexavalent Selenium
发芽率 Germination rate/%	96.67	50.00	53.33	66.67	40.00	63.33
未发芽率 Rate of not germination/%	3.33	6.67	3.33	30.00	50.00	33.33
坏死率 Necrosis rate/%	0.00	43.33	43.33	3.33	10.00	3.33
硒含量 Selenium content/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	-	96.9761	102.2612	-	75.0273	83.9164

n = 5; “-”表示未检出。n = 5; “-” is shown as; not detectable.

表 2 不同浓度硒培养下绿豆和大豆的发芽情况及硒含量结果

Table 2 The germination status of mungbean and soybean in different Se concentration solutions and its Selenium content								
豆种类 Kinds of legumina	Se 培养液 Se culture solution/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	发芽率 Germination rate/%	未发芽率 Rate of not germination/%	坏死率 Necrosis rate/%	湿重 Wet weight/%	干重 Dry weight/g	失水率 Water loss rate/%	Se 含量 Se content / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
绿豆 Mungbean	0.00	100.00	0.00	0.00	10.0200	2.5521	74.53	-
	1.00	96.67	3.33	0.00	8.3086	2.4218	70.85	7.5002
	2.00	93.33	6.67	0.00	8.0054	2.3830	70.23	14.9568
	3.00	83.33	16.67	0.00	7.2446	2.5676	64.56	22.9887
	4.00	36.67	40.00	23.33	8.1410	2.5100	69.17	45.8668
	5.00	46.67	50.00	3.33	8.0199	2.5921	67.68	48.4235
大豆 Soybean	6.00	16.67	33.33	50.00	7.2590	2.4213	66.64	69.8483
	0.00	83.33	16.67	0.00	15.9125	5.1498	67.64	-
	1.00	76.67	23.33	0.00	15.2050	5.4264	64.31	11.1737
	2.00	90.00	10.00	0.00	15.4700	5.5200	64.32	21.0815
	3.00	86.67	13.33	0.00	14.5300	5.1900	64.28	29.7365
	4.00	76.67	26.67	0.00	14.3000	5.3900	62.31	37.0128
Na_2SeO_4 (s)	5.00	80.00	20.00	0.00	14.2100	5.2960	62.73	49.3785
	6.00	83.33	16.67	0.00	14.2050	5.2310	63.17	58.3926
								112.3070

“-”表示未检出。“-” is shown as; not detectable.

结果表明,0 ~ 3.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低浓度硒酸钠可保证绿豆发芽生长基本不受影响,而在 0 ~ 6.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下可保证大豆发芽生长基本不受影响,且硒含量随着培养液浓度升高而增加,绿豆和大豆的含硒量基本保持一致。

3 讨 论

根据大豆发芽过程富硒能力研究^[11]所选择的最佳浓度 10.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为参考,采用与之相近的多个不同浓度,进行多次预实验,确定高浓度阈值及适宜浓度阈值,结果表明在 20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的较高浓度硒培养下,不利于绿豆和大豆的发芽生长。在 0 ~ 3.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的较低浓度下,绿豆发芽情况基本良好,而在 0 ~ 6.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度下大豆的发芽情况基本良好。

目前植物栽培富硒法^[12]有主要有土壤栽培富硒法,叶面富硒法和溶液培养富硒法^[13-15],其中土

壤栽培富硒法的富硒效果不明显,硒资源损失浪费严重,不适合推广使用;叶面富硒法操作相对简便,生物富硒量也较大,尤其适合于蔬菜等的嫩芽或者幼苗的富硒^[14];溶液培养富硒法更适合绿豆和大豆的富硒,该法的硒利用率最高,适合于粮食作物的富硒,不利因素是对设备、通风设施等条件有一定的要求。综合考虑,该研究所选的溶液培养富硒法更适合豆类等粮食作物富硒。

因豆类是重要的含蛋白质和碳水化合物的食物,并且是人类摄取微量元素的重要来源,所以成为最有潜质的生物富硒植物。豆类中有 70% 以上的硒以硒代蛋氨酸形式存在,有不到 20% 的无机硒,此外还有少量的硒代半胱氨酸等^[16]。该研究对绿豆和大豆在含硒溶液中的培养结果表明,20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的较高浓度硒不利于绿豆和大豆的发芽生长。同等浓度下,四价硒较六价硒对绿豆和大豆的生物毒性大,阻碍发芽生长。在 0 ~ 3.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

的较低浓度下,绿豆发芽情况基本良好,而在 $0 \sim 6.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度下大豆的发芽情况基本良好。因此,通过溶液培养富硒法能较容易地实现无机硒到有机硒的天然转化,有望开发富硒绿豆和富硒大豆等新型富硒功能食品。

参考文献

- [1] Thomson C D. Assessment of requirements for Selenium and adequacy of Selenium status[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 58: 391-402.
- [2] Paul Cotter. Dietary Selenium in cultured hybrid striped bass[D]. Blacksburg, Virginia: Virginia Polytechnic Institute and State University, 2006: 3-15.
- [3] Swathy S S, Panicker S, Indira M. Effect of exogenous Selenium on the testicular toxicity induced by ethanol in rats[J]. *Indian Journal Physiology and Pharmacology*, 2006, 50(3): 215-224.
- [4] 李小迎, 郭雄, 王立新, 等. 成人大骨节病血清透明质酸、肿瘤坏死因子 α 、血管内皮生长因子、NO 和硒含量检测[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(7): 941-944. (Li X Y, Guo X, Wang L X, et al. Serum hyaluronic acid, tumor necrosis factor- α , vascular endothelial growth factor, NO and Se levels in adult patients with Kashin-Beck disease[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2007, 27(7): 941-944.)
- [5] Bonfig W, Gartner R, Schmidt H. Selenium supplementation does not decrease thyroid peroxidase antibody concentration in children and adolescents with autoimmune thyroiditis[J]. *Scientific World Journal*, 2010, 10: 990-996.
- [6] 吴正奇, 刘建林. 硒的生理保健功能和富硒食品的相关标准[J]. *中国食物与营养*, 2005(5): 43-46. (Wu Z Q, Liu J L. Relevant standards of the physiological health functions of selenium and selenium-rich foods[J]. *Food and Nutrition in China*, 2005(5): 43-46.)
- [7] 李丽辉, 林亲录. 我国富硒食品的研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2007(2): 23-25. (Li L H, Lin Q L. Selenium-enriched foods research progress in China[J]. *Food and Nutrition in China*, 2007(2): 23-25.)
- [8] GB/T 20127. 10-2006 钢铁及合金-痕量元素的测定, 第 10 部分: 氢化物发生-原子荧光光谱法测定硒含量[S]. (GB/T 20127. 10-2006 Steel and alloy-determination of trace elements, Part 10: Hydride generation-atomic fluorescence spectrometry determination of selenium content[S].)
- [9] GB/T5009. 93-2003 食品中硒的测定, 第一法: 氢化物原子荧光光谱法[S]. (GB/T5009. 93-2003 Determination of selenium in the food, method 1st: Hydride generation atomic fluorescence spectrometry[S].)
- [10] 陈家厚, 王晓燕. 用微波消解和原子荧光法测定富硒产品中的硒[J]. *环境科学与管理*, 2008, 33(10): 170-171, 174. (Chen J H, Wang X Y. Selenium measurement in Selenium abundant foods with microwave digestion and atomic fluorescence spectrometry[J]. *Environmental Science and Management*, 2008, 33(10): 170-171, 174.)
- [11] 郭晓玲. 稀土对富硒豆芽富硒能力影响的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007: 11-14. (Guo X L. Effects of rare earth on the accumulation of Selenium in soybean sprouts[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2007: 11-14.)
- [12] 莫海珍. 高有机硒保存率蔬菜富集和加工机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007: 19-22. (Mo H Z. Selenium enrichment in vegetables and the effects of processing parameters[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007: 19-22.)
- [13] Hu Q H, Pan G X, Zhu J C. Effect of fertilization on Selenium content of tea and the nutritional function of Se-enriched tea in rats[J]. *Plant and Soil*, 2002, 238(1): 91-95.
- [14] Mo H Z, Zhu Y, Zhang M. Selenium enrichment pattern in flowering Chinese cabbage, cabbage and asparagus[J]. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 2006, 17(2): 39-42.
- [15] Sugihara S, Kondo M, Chihara Y, et al. Preparation of selenium-enriched sprouts and identification of their Selenium species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68(1): 193-199.
- [16] Thavarajah D, Ruskowski J, Vandenberg A. High potential for Selenium biofortification of lentils (*Lens culinaris* L.) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56: 10747-10753.
- [11] Boissonnas A, Fetter L, Zeelenberg I S, et al. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(2): 345-356.
- [12] 田鹏程, 黄国军. 扶正胶囊增强免疫力实验研究[J]. *医学导报*, 2008, 27(10): 1184-1186. (Tian P C, Huan G J. Experimental study on the immunity-enhancement capability of the fuzheng capsule[J]. *Herald of Medicine*, 2008, 27(10): 1184-1186.)
- [13] 王熙才, 左曙光, 邱宗海, 等. 艾舍尔软胶囊增强小鼠免疫力的实验研究[J]. *昆明医学院学报*, 2008, 29(6): 71-75. (Wang X C, Zuo S G, Qiu Z H, et al. Investigation of the immunity-enhancement capability of the Acer Capsule in mice[J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2008, 29(6): 71-75.)
- [14] Jolles P, Henschen A. Comparison between the clotting of blood and milk [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1982, 7(9): 325-328.
- [15] 周业飞, 孙镇平, 杭柏林. 外源性生物活性肽的营养与生理作用[J]. *动物医学进展*, 2003, 24(6): 58-60. (Zhou Y F, Sun Z P, Hang B L. Nutrition and physiological effects of exogenous active polypeptides[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2003, 24(6): 58-60.)
- [16] Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44(1): 6-29.
- [17] Brantl V, Teschemacher H, Henschen A, et al. Novel opioid peptides derived from casein(β -casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone[J]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 1979, 360(9): 1211-1216.
- [18] McFarland G A, Holliday R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine[J]. *Experimental Cell Research*, 1994, 212(2): 167-75.