

上海洪纪仪器设备有限公司

食物中硒的测定

荧光法

1. 原理

样品经混合酸消化后，硒化合物被氧化为四价无机硒（ Se^{4+} ），与 2,3-二氨基萘（2,3-diaminonaphthalene, 简称为 DAN）反应生成 4,5-苯丙二硒脑（4,5-benzopiaselenol），其荧光强度与硒的浓度在一定的条件下成正比。用环己烷萃取后于激发光波长 376nm，发射光波长 520nm 处测定荧光强度与绘制的标准曲线比较定量。本方法检出限为 3ng。

2. 方法来源

GB/T 12399-1996，本方法是测定食物中微量元素硒的国家标准方法。

3. 仪器和设备

1) 实验室常用设备

2) 荧光分光光度计

4. 试剂

除说明外均为分析纯。实验用水为去离子水。

4.1 环己烷

4.2 硝酸

4.3 过氯酸

4.4 盐酸

4.5 氢溴酸

4.6 (1+9) 盐酸溶液

4.7 (1+1) 氨水

4.8 (5+95) 去硒硫酸：取 5ml 去硒硫酸，加入 95ml 水中。

去硒硫酸：取 200ml 硫酸，加于 200ml 水中，再加 30ml 氢溴酸，混匀，置沙浴上加热蒸去硒与水至出现浓白烟，此时体积应为 200ml。

4.9 0.2 mol/L EDTA：将 37g EDTA 二钠盐，加水并加热溶解，冷却后稀释至 500ml。

4.10 10% 盐酸羟胺：称取 10g 盐酸羟胺溶于水中，稀释至 100ml。

4.11 混合酸：硝酸+过氯酸（2+1）

4.12 0.1% 2,3-二氨基萘（纯度为 95~98%）：需在暗室配制，称取 200mg DAN 于一带盖三角瓶中，加入 200mL 0.1mol/L 盐酸，振摇约 15min，使其全部溶解，约加 40mL 环己烷，继续振摇 5 min，将此液体转入分液漏斗中，待溶液分层后，弃去环己烷层，收集 DAN 层溶液。如此用环己烷纯化 DAN 直至环己烷中的荧光数值降至最低时为止（纯化次数视 DAN 纯度不同而定，一般约需纯化 3-4 次）。将提纯后的 DAN 溶液储于棕色瓶中，约加 1 cm 厚的环己烷覆盖溶液表面。置冰箱中保存。必要时再纯化一次。

4.13 硒标准溶液

A) 硒标准储备液（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：精确称取 100.0mg 元素硒（光谱纯），溶于少量硝酸中，加 2mL 过氯酸，置沸水浴中加热 3-4h，冷却后加入 8.4mL 盐酸，再置沸水浴中煮 2min。准确稀释至 1000mL，其盐酸浓度为 0.1mol/L。此储备液浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

B) 硒标准使用液（0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：将 4.13.1 液用 0.1mol/L 盐酸稀释，使含硒为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。于冰箱中保存。

4.14 0.02% 甲酚红指示剂：称取 50mg 甲酚红溶于水中，加（1+1）氨水 1 滴，待甲酚红完全溶解后加水稀释至 250mL。

4.15 EDTA 混合液：取 0.2mol/L 的 EDTA（4.9）和 10% 盐酸羟胺（4.10）液各 50mL，混匀，再加 5mL（4.14）溶液，用水稀释至 1L。

5. 分析步骤

地址：上海市普陀区桐柏路芙蓉园 18 号 403

电话：(021) 61028032 传真：(021) 52710535

邮编：200062

网址：<http://www.foodtechs.com>

上海洪纪仪器设备有限公司

5.1 样品处理及消化

- 1) 粮食：样品用水洗三次，于 60℃ 烘干，用不锈钢磨磨成粉，储于塑料瓶内，放一小包樟脑精，盖紧盖保存，备用。
- 2) 蔬菜及其他植物性食物：取可食部分用水冲洗三次后用纱布吸去水滴，用不锈钢刀切碎，取混合均匀的样品于 60℃ 烘干，称重，粉碎，备用。
- 3) 称取 0.5—2.0g 样品（含硒量 0.01—0.5μg）于磨口三角瓶内，加 10mL（5+95）去硒硫酸，样品润湿后，再加 20mL 混合酸液放置过夜。次日于沙浴上逐渐加热，当激烈反应后（溶液变无色），继续加热至产生白烟，溶液逐渐变成淡黄色即达到终点。某些蔬菜样品消化后常出现浑浊，难以确定终点，所以要细心观察。另外，含硒较高的蔬菜含有较多的 Se⁶⁺，需要在消化达到终点时冷却后加 10mL（1+9）盐酸，继续加热，使 Se⁶⁺还原成 Se⁴⁺。同样按上述方法确定终点。

5.2 测定

于样品消化液中加入 20mL EDTA 混合液，用氨水（1+1）或盐酸调至淡红橙色（pH 1.5~2.0）。以下步骤在暗室进行：加 3 mL DAN 试剂，混匀，置沸水浴中煮 5min，取出立即冷却，加 3mL 环己烷，振摇 4min，将全部溶液移入分液漏斗，待分层后弃去水层，环己烷层转入带盖试管中，小心勿使环己烷中混入水滴，于激发光波长 376，发射光波长 520nm 处测定亚硒脑的荧光强度。

5.3 硒标准曲线绘制：准确吸收硒标准使用液 0, 0.2, 1.0, 2.0 及 4.0mL 加水至 5mL，按样品测定步骤同时进行。硒含量在 0.5μg 以下时荧光强度与硒含量呈线性关系，在常规测定样品时，每次需做试剂空白与样品硒含量相近的标准管（双份）即可。

6. 结果

式中：X—样品中硒含量，μg/g；

A—标准管荧光读数；

B—空白管荧光读数；

C—样品管荧光读数；

m1—标准管中硒质量，μg；

m2—试样质量，g。

7. 注意事项

7.1 结果的允许差：同一实验室平行测定或重复测定结果相对偏差绝对值 ≤ 10%。

7.2 硒含量在 0.5 μg 以下荧光强度与硒含量呈线性关系，超过 0.5 μg 时为非线性关系，故硒含量应控制在 0.5 μg 以内。硒含量过高时先用环己烷稀释样品，再测定荧光。

7.3 我国高硒地区食物样品中的硒，多以 Se⁶⁺形式存在，故应在消化到终点后，加（1+9）HCl 还原后继续消化至终点再测定。