

食品中微量硒的荧光测定法

沈若荃 刘明*

(食工系)

前言

硒是人体生理必需的微量元素之一,不能由其他类似功能的营养素(如维生素E等)来代替。硒含量过低,会导致大骨节病、克山病、甲状腺肿等疾病。

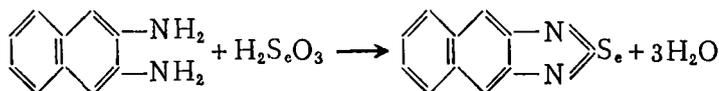
近年来,人们证明了硒有抗癌作用^[1]。高浓度硒可使引起动物肝癌、皮肤癌和淋巴肉瘤的化学致癌物的作用受到抑制,血清硒含量与肿瘤死亡率呈负相关。人体中的硒几乎全部来自食物,而食物含硒量又受食品种类、食品产地、以及加工方式等因素影响。因此研究一个快速、简便、精确且易于推广的硒测定方法乃是至关重要的。文献报道^[2],硒的分析方法有荧光法、原子吸收法、化学法、气相色谱法、极谱法、中子活化法、质谱法和X-射线荧光分光光度法等,其中以荧光法的应用最广,我们对该方法的实验条件进行了研究,提出一个适合食品中硒的测定方法。

一、实验

1. 原理

将样品用混合酸进行湿法消化,使食品有机物中的各种形态的硒转变为无机的 S_6^{+4} 。在酸性条件下与2,3-二氨基萘(DAN)生成荧光物质4,5-苯并芘啉,然后用环己烷萃取,在激发波长为378nm、发射波长为520nm条件下测定其荧光强度,生成的荧光强度与 S_6^{+4} 的浓度在一定范围内成正比。

反应式



2. 仪器和试剂

主要仪器为日立650—60荧光分光光度计。试剂规格均为分析纯,配制溶液均用双蒸水。

1) 硒标准溶液 用纯硒粉配制。称取0.1000g硒粉于100ml烧杯中,加入5ml浓硝酸于电炉上微热溶解后,立即冷却,用0.1M/HCl定容至1000ml,此为(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)储备液。应用时将0.1M/HCl稀释为(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的标准溶液,贮于冰箱内。

2) 0.1% DAN试剂(在暗室内配制) 称取0.2克固体DAN放入250ml磨口三角瓶中,

* 本院食工系食品分析专业821班毕业生
本文1986年7月23日收到。

加入 0.1M HCl 200ml 于 60℃ 水浴加热 10 分钟左右, 振摇使之溶解, 取下用冷水冷却, 转入 250ml 分液漏斗, 并加入 35ml 环己烷振摇 1 分钟, 静置分层弃去有机相, 水相通过玻璃棉滤入另一分液漏斗, 再用同样体积环己烷萃取三次, 然后将水相贮于棕色试剂瓶中, 覆以约 0.5cm 厚的环己烷层贮于冰箱内(因其容易分解, 每月应新配制)。

3) 混合酸

混合酸 I. $\text{HNO}_3\text{—HClO}_4$: 1(v/v)

混合酸 II. $\text{HNO}_3\text{—HClO}_4\text{—H}_2\text{SO}_4$ (去硒)为 3 : 2 : 1(v/v)

去硒硫酸: 将 200ml 浓硫酸缓缓加入预先置有 200ml 水的 1000ml 烧杯中混匀, 加入 48% 氢溴酸 30ml, 混匀后置于火力强的砂浴上加热, 由黄变为红棕再转为无色至冒白烟, 此时体积应为 200ml。

4) 0.02M EDTA-2Na 称取 8g 二胺四乙酸二钠溶于 1000ml 水中混匀。

5) 10% 盐酸羟胺溶液

6) 0.02% 甲酚红指示剂

7) 氨溶液(1 : 1)

8) 环己烷

3. 测定方法

1) 样品的预处理 固体食品经过切碎或捣碎使其均匀。液体食品可经搅拌均匀后取样, 样品都贮于冰箱内。

2) 样品的消化 准确称取 0.2~1.0g 匀样(视含 S₀ 量而定)于 100ml 磨口三角瓶中, 加入混合酸 5~10ml(视含脂肪量而定), 加入 2 粒玻璃珠, 盖上小三角漏斗(4cm), 在电热板上逐渐升温加热至有棕色 NO₂ 产生, 溶液为棕黄色, 剧烈反应后, 溶液呈无色, 继续加热至产生白烟, 当白烟基本除尽(溶液可能出现浅黄色)即达到消化终点。立即取下, 冷却后加入 10ml 水冲洗漏斗四壁, 消化液可贮于冰箱内备用, (若用盐酸还原, 则消化后加入盐酸加热)。

3) 4,5- 苯并芘硒脑的生成和测定 于消化液中加 4ml EDTA-2Na 溶液, 以掩蔽样品中含量较高的 Ca、Hg、Fe 等^[3]离子, 因为若存在微量的其他离子, 可能会催化氧化 DAN, 此举并能减低空白值, 混匀静置加入 3 滴甲酚红指示剂, 用 1 : 1 氨水和 6M HCl 调节溶液呈浅红橙色, PH 为 1.0~2.0 之间。(指示剂颜色变化用 pH 计测定后得出), 加 1ml 10% 盐酸羟胺稳定 2 分钟, (若用盐酸还原, 则于消化液中加 4ml EDTA-2Na 和 2ml 1% 盐酸羟胺, 然后调节 pH), 以上在暗室中进行。加 4 ml 0.1% DAN 溶液于 60℃ 水浴 30 分钟, 取出后用水冷却, 然后准确加入 5.00ml 环己烷, 振摇半分钟, 用滴管吸取上层有机相, 于 378nm 激发光和 520nm 发射光处测定荧光强度, 从而计算样品的含硒量。

4. 硒标准曲线的绘制

准确吸取 1 ppm 标准硒溶液 0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.80ml 各两份于 100ml 磨口三角瓶中, 加水 10ml, 以下步骤同样品测定。

5. 计算

样品中硒含量 $\mu\text{g/g}$

$$= \frac{\text{标准硒含量}(\mu\text{g})}{\text{标准硒荧光读数} - \text{空白荧光读数}} \times \frac{\text{样品荧光读数} - \text{空白荧光读数}}{\text{样品重量}(\text{g})}$$

二、实验条件的选择

1. 样品加消化液后放置和不放置过夜的选择

根据文献^[3,4], 生物样品血、尿、头发等加消化液以后要放置过夜或放置2小时后进行消化。如果不放置的话, 对于测定食品中硒含量究竟有无影响? 我们以虾皮为样品加消化液后放置过夜和不放置进行了比较, 结果见表1。

表1 样品放置过夜和不放置的比较

样品加消化液	样品编号						平均值
	1	2	3	4	5	6	
不放置过夜 S _e 含量(μg/g)	1.26	1.15	1.17	1.18	1.21	1.20	1.20
放置过夜 S _e 含量(μg/g)	1.31	1.20	1.15	1.28	1.15	1.31	1.23

结果说明食品加消化液后不必放置可直接进行消化。

2. 消化方式和消化液的选择

硒在消化过程中易挥发损失, 使结果不准确。因此消化方法及消化方式很多, 有低温灰化、封闭式燃烧法、湿法氧化等。湿法氧化又有敞口式、回流式、空气冷凝式烧瓶消化法。由于样品品种不同, 选择合适的消化液对保证样品消化完全是至关重要的。据报道^[6], 单独使用HNO₃或HClO₄可使硒损失70%, 而使用混合酸则硒损失较小。混合酸的品种也较多, 例如Na₂MoO₄-H₂SO₄-HClO₄^[4]、HNO₃-HClO₄-H₂SO₄^[5]、HNO₃-H₂SO₄^[6]、HNO₃-HClO₄^[7]等。我们选择常用的HNO₃-HClO₄(混合酸I)及HNO₃-HClO₄-H₂SO₄(混合酸II)采用磨口三角瓶漏斗作空气冷凝对食品进行消化比较。

在盖有漏斗作空气回流的磨口三角瓶以混合酸I和混合酸II对标准硒液消化, 结果见表2。

将混合酸I和混合酸II按上述方式对几种食品进行消化, 并作回收试验, 结果见表3。

表2 不同量标准溶液敞口消化后的回收结果

标准硒溶液 (μg)	未消化	混合酸I消化		混合酸II消化	
	测得S _e 量(μg)	测得S _e 量(μg)	回收(%)	测得S _e 量(μg)	回收(%)
0.1	0.096	0.096	100.0	0.099	103
0.2	0.204	0.203	99.5	0.198	96.9
0.3	0.292	0.303	103.8	0.292	100
0.4	0.398	0.414	103.9	0.401	100.7
0.5	0.502	0.517	102.9	0.512	101.9
0.6	0.621	0.631	101.7	0.507	97.7
0.8	0.787	0.836	106.3	0.798	101.3

使用混合酸 I < 有不需配制备去硒硫酸, 空白值小, 调节 pH 容易等优点。缺点在于对含脂量高的样品消化稍困难, 要适当增加用量, 消化终点较难控制。用混合酸 II 有对样品适应性广的优点, 10ml 混合酸可消化任何 0.5g 样品, 消化终点易控制, 缺点在于调节 pH 时, 氨水需要量多、空白值大, 且需制备去硒硫酸。文献^{[2][4]}报道用 HNO₃—HClO₄ 消化一个样品需 2~2.5 小时, 而我们采用敞口式盖有漏斗, 用 HNO₃—HClO₄ 消化 0.5g 样品在半小时内就能完成。

表 3 混合酸 I 和 II 敞口式消化几种食品的含硒量及回收率

样 品		虾 皮	虾 仁	肉 脯	肉 松	青 鱼	鱼 干
混 合 酸 I	含量 (μg/g)	1.25	0.473	0.146	0.161	0.132	1.98
	S _e 加入量 (μg/g)	0.405	0.205	0.196	0.195	0.206	0.682
	测得 S _e 总量 (μg/g)	1.66	0.663	0.331	0.344	0.344	2.68
	变异系数 (%)	4.8	5.3	n < 4	n < 4	n < 4	n < 4
	回收率 (%)	101.2	92.7	94.9	93.9	102.9	101.9
混 合 酸 II	含量 (μg/g)	1.14	0.507	0.129	0.135	0.131	2.15
	S _e 加入量 (μg/g)	0.406	0.393	0.170	0.170	0.192	0.724
	测得 S _e 总量 (μg/g)	1.56	0.966	0.307	0.300	0.305	2.88
	变异系数 (%)	5.2	5.1	2.6	4.3	n < 4	2.4
	回收率 (%)	103.4	100.8	104.7	97.1	90.6	101.4

3. 还原剂的选择

DAN 对 S_e⁺⁴ 有选择性作用, 样品中的其他价态的 S_e 必须全部转化为 S_e⁺⁴, 使用荧光法测定时, 必需用还原剂。文献^[3,5,8]采用的还原剂有盐酸及盐酸羟胺。盐酸需在 100~150℃ 加热 30 分钟, 使 S_e⁺⁶ 还原成 S_e⁺⁴。我们对二种试剂还原效果进行了比较。

用不同量的标准 S_e 溶液, 用混合酸 I 消化后, 加二种不同的还原剂, 结果见图 1。

以虾皮为样品, 对二种还原剂的测定结果见表 4。

表 4 以二种还原剂测定虾皮中硒含量

消 化 液	混合酸 I 硒含量 (μg/g)	混合酸 II 硒含量 (μg/g)
用 5ml 6 M HCl 还原	1.35	1.26
用 1ml 10% 盐酸羟 胺还原	1.30	1.24

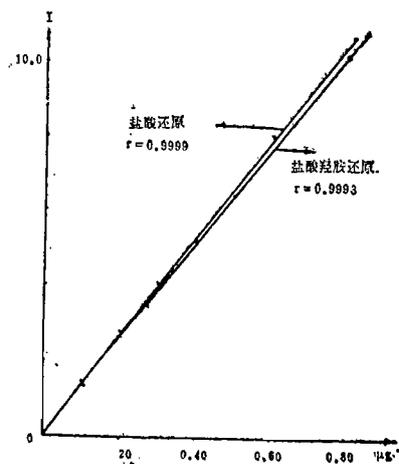


图 1

结果说明,用10%盐酸羟胺1ml与用6M HCl、5ml还原及稳定效果是相同的。而用盐酸还原需加热,然后再加盐酸羟胺还原稳定,采用盐酸羟胺只需稳定,2分钟便成。

4. 荧光物质4,5-苯并苯硒脑生成的适宜条件

无机硒在酸性条件下与 DAN 反应生成苯硒脑, pH 在 1.0~2.0 范围内, 酸度增加, 反应速度减慢, 酸度降低, 反应速度加快, 但同时相应加速了 DAN 的氧化及分解, 降低了反应的选择性^[4]。加热煮沸使反应速度加快, 但破坏了 DAN 及生成的荧光物质苯硒脑。若 pH<1.0 时, 环己烷萃取液会出现乳化现象, 妨碍环己烷分层。若 pH>1.5, 萃取液会呈淡黄色而影响测定。因此 pH 对测定结果有很大影响, 我们认为反应温度以 60°C(水浴), 时间以 30 分为宜。

5. 结论

通过上述试验, 对低脂样品可用消化液 I, 对含脂量较高的样品可适当增加用量。含脂量高的样品则用消化液 II, 用磨口三角烧瓶盖上小漏斗敞口消化。加 1 ml 10% 盐酸羟胺作还原剂及稳定剂, 调节 pH 为 1.0~1.5, S_6^{+4} 与 DAN 在 60°C 水浴 30 分钟反应产生荧光物质, 测其荧光强度。

三、分析方法的灵敏度、精密度和准确度

1. 用标准硒溶液作测定方法的灵敏度

分别取 0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.80 μg 硒的标准溶液, 用混合酸 I 和 II 进行消化后分别测定其荧光强度。数据见表 5

表 5 标准溶液测定时的灵敏度

n = 6 标准 S_6 量(μg)	混合酸 I					混合酸 II				
	\bar{I}	$\bar{I} - I_0$	$\frac{c}{\bar{I} - I_0}$	$3\sigma_0$	$S(\text{ng})$	\bar{II}	$\bar{II} - I_0$	$\frac{c}{\bar{II} - I_0}$	$3\sigma_0$	$S(\text{ng})$
0	0.10					0.19				
0.10	1.33	1.23	0.081	0.063	5.1	1.46	1.27	0.079	0.067	5.3
0.20	2.69	2.59	0.077		5.0	2.72	2.53	0.079		5.3
0.30	3.97	2.87	0.076		4.8	3.93	3.74	0.080		5.4
0.40	5.39	5.29	0.076		4.8	5.32	5.13	0.078		5.2
0.50	6.71	6.61	0.076		4.8	6.74	6.55	0.076		5.1
0.60	8.18	8.08	0.074		4.7	7.96	7.77	0.077		5.2
0.80	10.8	10.7	0.075		4.7	10.4	10.21	0.077		5.2

最低检出限

$$S = \frac{C}{F_{0.05} - F_0} \times 3\sigma_0$$

其中

S —— 硒的最低检出限

F_0 —— 空白试验的荧光强度

C ——标准溶液中硒的含量

F_{s_0} ——标准溶液的荧光强度

σ_0 ——空白试验的荧光强度的标准差

最低检出限为 5.2ng 以下, Ihnat 等人用荧光法测定标准 S_0 检出限为 10ng^[1], 因此试验结果是较为满意的。

几种食品中微量 S_0 测定的精密度和准确度见表 6

表 6 几种食品中硒含量的结果、精密度和回收率

样 品	(n)	平均 S_0 含量 ($\mu\text{g/g}$)	变异系数 (%)	S_0 加入量 ($\mu\text{g/g}$)	测得总量 ($\mu\text{g/g}$)	回 收 率 (%)	备 注
肉 松	5	0.135	4.3	0.170	0.300	97.1	
肉 脯	6	0.129	2.6	0.170	0.307	104.7	
虾 仁	6	0.570	5.1	0.393	0.966	100.8	
虾 皮	6	1.14	5.2	0.406	1.56	103.4	
鱼 干	4	2.15	2.4	0.724	2.88	101.4	
扬 梅(罐头)	6	0.0114	9.0	0.0946	0.104	97.9	
猕猴桃(罐头)	6	0.0171	13.3	0.0403 0.0807	0.0587 0.0979	99.4	加入不同的 标准量
甜 炼 乳	6	0.0172	11.0	0.0401 0.167	0.0579 0.180	99.5	
干 酪	5	0.0885	4.3	0.183	0.281	105.2	
青 鱼	2	0.131	—	0.192	0.3050	90.6	

食品中硒含量在 0.01ppm 及 0.1~1.0ppm 时, 变异系数分别为 9.0~13.3%、2.4~5.2%, 回收率为 90~105%。

荧光测定承蒙本院设备处秦昉同志的帮助, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] 武汉医学院主编,《营养与食品卫生学》, 第一版, 人民卫生出版社第 35~72页, 1981
- [2] Gilbert. J; Analysis of Food Contaiminants, Elsevier Applied science Publishers, London and New York, 19843 P72
- [3] Kon TS & Benson TH; Critical Re-appraisal of Fluorometric Method for Determination of Selenium in Biological Meteral, JAOAC 66: 918, 1983
- [4] 王光亚等,“生物样品、水及土壤中痕量硒的荧光测定法”,《营养学报》, 7: 39, 1985

- [5] 王伟坤等,《食品化学分析》,上海人民科学技术出版社,1978
- [6] 王伟坤等,“食品中硒的测定方法”,《上海食品》,第一期93,1983
- [7] Ihnat M, Fluorometric Determination of Selenium in Foods, JAOAC 57 : 373,1974
- [8] Watkinson JH, Fluorometric Determination of Selenium in Biological Material with 2,3-Diaminonaphthalene, Analytical Chemistry, 38 : 92, 1966

86026

提高黑曲糖化酶活力的研究——诱变育种，《无锡轻工业学院学报》，1986年，第5卷，第4期

主题词 变异株，糖化酶/糖化酶活力

摘要 使用DES、 γ 射线、5-FU、NTG等诱变处理黑曲霉A.S.3.4309，获得高产变异株7E-19-12，糖化酶活力比初始菌株提高100.6%，用30001发醇罐验证，其酶活力达9300 u/ml，并且 α -淀粉酶，酸性蛋白酶，转移葡萄糖苷酶含量较低。

作者：毛理一、修道高、顾国贤

86027

中华猕猴桃蛋白酶性质的研究及其在肉类嫩化剂制备中的应用，《无锡轻工业学院学报》，1986年，第5卷，第4期

主题词 中华猕猴桃，蛋白酶/嫩化剂

摘要 本文研究了中华猕猴桃蛋白酶的一些性质和它在配制肉类嫩化剂中的应用。此酶对两种不同的底物具有两种不同的最适pH，即以酪蛋白为底物时，最适pH为5.0~6.5，而以苯甲酰精氨酸乙酯(BAEE)为底物时，最适pH为7.5。在pH4.0~10.0范围内，酶能保持稳定。在65℃热处理16分钟，酶活力残存50%。将此酶配制成肉类嫩化剂处理牛肉，其蛋白酶萃取液中总可溶性含氮及可溶性非蛋白氮含量均比对照样品高，其脯氨酸甘氨酸含量也有明显的增加。这表明猕猴桃蛋白酶对肌肉组织中的胶原蛋白和弹性蛋白产生了一定作用。流变性试验也表明该嫩化剂是有效的。

作者：臧大存、王璋、陈舜祖

86029

食用羟丙基淀粉的研究，《无锡轻工业学院学报》，1986年，第5卷，第4期

主题词 食品添加剂，淀粉/羟丙基淀粉

摘要 用化学方法对淀粉分子结构进行改造，使其部分脱水葡萄糖单位上的羟基与烷基化试剂反应生成羟丙基淀粉。羟丙基醚化后的淀粉糊化温度明显降低，糊化速度大大加快，老化现象改善，凝胶较为透明清晰，在冷藏、冻融以及微酸性条件下，能保持凝胶的稳定性。参照F.C.C标准，羟丙基淀粉可供食用。动物毒理学试验结果无异常。性能稳定。食用羟丙基淀粉可以代替或部分代替天然胶(果胶、阿拉伯胶等)。

作者：姜雪珍、吴宽民、杨荣珍

86028

食品中微量硒的荧光测定法，《无锡轻工业学院学报》，1986年，第5卷，第4期

主题词 荧光分析；微量元素；硒/荧光分光光度法

摘要 本文介绍用2,3-二氨基萘(DAN)与食品中微量硒作用产生4,5-苯并芘硒的荧光测定法，并对实验条件进行了探讨。本方法的最低检出量为6.0ng，硒含量为0.01 ppm；0.1~1ppm时变异性系数分别为9~13.3%、2.4~5.2%，回收率为90~105%。本法的精密度及准确度均高。

作者：沈若荃、刘明

86028

A METHOD OF FLUOROMETRIC DETERMINATION OF TRACE AMOUNT OF SELENIUM in FOOD «Journal of the Wuxi Institute Light Industry», Vol.5, No.4, 1986

SUBJECTWORDS fluorometric analysis, microelement, selenium/fluorimetric determination

ABSTRACT A method using the reaction of 2,3-diaminonaphthalene with the trace amount of selenium to form Se-DAN complex is introduced for the fluorimetric determination of selenium in food. The condition of experiments was studied. The detection limit was 6 ng. The content of selenium was 0.01 ppm, 0.1—1 ppm, the coefficients of variation were 9.0—13.2%, 2.4—5.2% respectively. The recovery was 90—105%. Both precision and accuracy of this method are satisfactory.

Author: Shen Ruoquan, Leu Ming

86029

STUDY on FOOD HYDROXYL-PROPYL STARCH «Journal of the Wuxi Institute Light Industry», Vol.5, No.4, 1986

SUBJECTWORDS food additives starch/hydroxypropyl starch

ABSTRACT The structure of starch molecules modified chemically that part of dehydroglucose units' hydroxyl group react with alkylating agent and form hydroxypropyl starch. Hydroxypropyl ethers of starch have apparently lowered temperatures and much faster speed of gelatinization, improved retrogradation, and the granules more clearly transparent. Its stability can be retained in refrigeration, thawing and under weak acid or acid environments.

Food hydroxypropyl starch in compliance with FCC regulations can be used in food. Its toxicity found to be normal, also stable in characteristics. Hydroxypropyl starch can be used to substitute or partly substitute expensive natural gums (pectin, acacia gum, etc.).

Author: Jian Xuechen, Wu Kuanmin, Yang Yungchen

86027

STUDY on the PROPERTIES of PROTEINASE in KIWI FRUIT and ITS APPLICATION to PREPARING MEAT TENDERIZER «Journal of the Wuxi Institute Light Industry», Vol.5, No.4, 1986

SUBJECTWORDS actindia chinensis, proteinase/acl:inidin

ABSTRACT Some properties of proteinase in kiwi fruit and its application to preparing meat tenderizer were investigated. The enzyme has two different optimum pH ranges with two different substrates, namely, 5.0—6.5 for casein and 7.5 for benzylarginine ethylester(BAEE). The enzyme was stable in the pH range from 4.0 to 10.0. 50% enzymatic activity still remained after sixteen minutes of heat treatment at 65°C. The effect of tenderizer prepared with the recovered proteinase on beef tenderizing was investigated. The content of the total soluble nitrogenous compounds and the nonprotein nitrogen in the extract was higher from the beef sample treated by the tenderizer than that from the control. The increase in the amount of the proline and glycine in the beef extract showed that the proteinase in kiwi fruit could hydrolyze the collagen and elastin in muscle tissue to a certain extent. Rheology determination also demonstrated that the tenderizer was effective.

Author: Zang Decun Wang Zhang

Chen Shunzu

86026

STUDIES to RAISE the ACTIVITY or GLUCOAMYLASE of ASPERGILLUS NIGER—MUTATION BREEDING «Journal of the Wuxi Institute Light Industry», Vol.5, No.4, 1986

SUBJECTWORDS aspergillus niger, mutant/activity of glucoamylase

ABSTRACT A high yield mutant Te-19-12 is obtained by mutation for aspergillus niger A.S.3.4309 using DES.R rays, 5-FU, NTG and so on. As compared with initial strain, the activity of glucoamylase of the mutant is increased by 100.6%. To test with 300-L fermentor, the activity of glucoamylase is as high as 9300u/ml, and the content of I-amylase, acidic protease and I-glucoosidase is lower.

Author: Mao Xingyi, Xiu Daogo, Gu Guoxian