

ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.93—2003
代替 GB/T 12399—1996, 部分代替 GB 13105—1991

食品中硒的测定

Determination of selenium in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

661

前 言

本标准对应于 AOAC 3.102~3.107《食品中硒的测定》(1984 年第 14 版),本标准与 AOAC 3.102~3.107 的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB/T 12399—1996《食物中硒的测定》和 GB 13105—1991《食品中硒限量卫生标准》中的测定方法。

本标准与 GB/T 12399—1996 相比主要修改如下:

——将 GB 13105—1991 中测定方法内容纳入本标准中;

——按 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第 4 部分:化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准第一法由北京市卫生防疫站、卫生部食品卫生监督检验所负责起草;北京进口食品卫生监督检验所参加起草。

本标准第一法主要起草人:毛红、杨惠芬、田佩瑶、阎军、黄流生。

本标准第二法由中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所负责起草。

本标准第二法主要起草人:王光亚、周瑞华、王淮洲、杨光圻、韩驰。

原标准于 1996 年发布,本次为第一次修订。

引 言

硒是人体必需的微量元素,但若摄入过多会对人体健康造成危害,为了控制人体硒的摄入量,制定了 GB 13105—1991《食品中硒限量卫生标准》,并配套研制了国家标准 GB/T 12399—1996《食物中硒的测定方法》。鉴于 1996 版标准中测定方法操作繁琐,所用试剂 2,3-二氨基萘(2,3-diaminonaphthalene,简称 DAN)有一定毒性、且需进口,故本次修订中增加了快速、简便、准确度、精密度好的氢化物原子荧光光谱法,作为第二法。

食 品 中 硒 的 测 定

1 范围

本标准规定了用荧光法和氢化物原子荧光光谱法测定食品中硒的方法。

本标准适用于各类食品中硒的测定。

第一法检出限为 3 ng, 线性范围为 0.01 μg ~0.2 μg ; 第二法为 0.5 ng/mL, 线性范围为 0 ng/mL~400 ng/mL。

第一法 氢化物原子荧光光谱法

2 原理

试样经酸加热消化后, 在 6 mol/L 盐酸(HCl)介质中, 将试样中的六价硒还原成四价硒, 用硼氢化钠(NaBH_4)或硼氢化钾(KBH_4)作还原剂, 将四价硒在盐酸介质中还原成硒化氢(SeH_2), 由载气(氩气)带入原子化器中进行原子化, 在硒特制空心阴极灯照射下, 基态硒原子被激发至高能态, 在去活化回到基态时, 发射出特征波长的荧光, 其荧光强度与硒含量成正比。与标准系列比较定量。

3 试剂

3.1 硝酸(优级纯)。

3.2 高氯酸(优级纯)。

3.3 盐酸(优级纯)。

3.4 混合酸: 硝酸+高氯酸(4+1)混合酸。

3.5 氢氧化钠(优级纯)。

3.6 硼氢化钠溶液(8 g/L): 称取 8.0 g 硼氢化钠(NaBH_4), 溶于氢氧化钠溶液(5 g/L)中, 然后定容至 1 000 mL。

3.7 铁氰化钾(100 g/L): 称取 10.0 g 铁氰化钾($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), 溶于 100 mL 水中, 混匀。

3.8 硒标准储备液: 精确称取 100.0 mg 硒(光谱纯), 溶于少量硝酸中, 加 2 mL 高氯酸, 置沸水浴中加热 3 h~4 h 冷却后再加 8.4 mL 盐酸, 再置沸水浴中煮 2 min, 准确稀释至 1 000 mL, 其盐酸浓度为 0.1 mol/L, 此储备液浓度为每毫升相当于 100 μg 硒。

3.9 硒标准应用液: 取 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硒标准储备液 1.0 mL, 定容至 100 mL, 此应用液浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4 仪器

4.1 原子荧光光度计。

4.2 电热板。

4.3 自动控温消化炉。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 粮食: 试样用水洗三次, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 用不锈钢磨粉碎, 储于塑料瓶内, 备用。

5.1.2 蔬菜及其他植物性食品: 取可食部, 用水洗净后用纱布吸去水滴, 打成匀浆后备用。

5.1.3 称取 0.5 g~2.0 g 试样于 150 mL 高筒烧杯内, 加 10.0 mL 混合酸及几粒玻璃珠, 盖上表面皿

冷消化过夜。次日于电热板上加热,并及时补加混酸。当溶液变为清亮无色并伴有白烟时,再继续加热至剩余体积 2 mL 左右,切不可蒸干。冷却,再加 5 mL 6 mol/L 盐酸,继续加热至溶液变为清亮无色并伴有白烟出现,以完全将六价硒还原成四价硒。冷却,转移定容至 50 mL 容量瓶中。同时做空白试验。

5.1.4 吸取 10 mL 试样消化液于 15 mL 离心管中,加浓盐酸 2 mL,铁氰化钾溶液 1 mL,混匀待测。

5.2 标准曲线的配制

分别取 0.0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL 标准应用液于 15 mL 离心管中用去离子水定容至 10 mL,再分别加浓盐酸 2 mL,铁氰化钾 1 mL,混匀,制成标准工作曲线。

5.3 测定

5.3.1 仪器参考条件:负高压:340 V;灯电流:100 mA;原子化温度:800℃;炉高:8 mm;载气流速:500 mL/min;屏蔽气流速:1 000 mL/min;测量方式:标准曲线法;读数方式:峰面积;延迟时间:1 s;读数时间:15 s;加液时间:8 s;进样体积:2 mL。

5.3.2 测定:根据实验情况任选以下一种方法。

5.3.2.1 浓度测定方式测量:设定好仪器最佳条件,逐步将炉温升至所需温度后,稳定 10 min~20 min 后开始测量。连续用标准系列的零管进样,待读数稳定之后,转入标准系列测量,绘制标准曲线。转入试样测量,分别测定试样空白和试样消化液,每测不同的试样前都应清洗进样器。试样测定结果按 5.4 计算。

5.3.2.2 仪器自动计算结果方式测量:设定好仪器最佳条件,在试样参数画面,输入以下参数:试样质量(g 或 mL),稀释体积(mL),并选择结果的浓度单位,逐步将炉温升至所需温度后,稳定 10 min~20 min 后开始测量。连续用标准系列的零管进样,待读数稳定之后,转入标准系列测量,绘制标准曲线。在转入试样测定之前,再进入空白值测量状态,用试样空白消化液进样,让仪器取其均值作为扣底的空白值。随后即可依次测定试样。测定完毕后,选择“打印报告”即可将测定结果自动打印。

5.4 结果计算

见式(1)。

$$X = \frac{(c - c_0) \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000 \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X——试样中硒的含量,单位为毫克每千克(或毫克每升)[mg/kg(或 mg/L)];
- c——试样消化液测定浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- c₀——试样空白消化液测定浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- m——试样质量(体积),单位为克(或毫升)[g(mL)];
- V——试样消化液总体积,单位为毫升(mL)。

计算结果表示到小数点后两位。

6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

第二法 荧光法

7 原理

将试样用混合酸消化,使硒化合物氧化为无机硒 Se⁴⁺,在酸性条件下 Se⁴⁺ 与 2,3-二氨基萘(2,3-Diaminonaphthalene,缩写为 DAN)反应生成 4,5-苯并苯硒脑(4,5-Benzo piaselenol),然后用环己烷萃取。在激发光波长为 376 nm,发射光波长为 520 nm 条件下测定荧光强度,从而计算出试样中硒的含量。

8 试剂

8.1 硒标准溶液

准确称取元素硒(光谱纯)100.0 mg,溶于少量浓硝酸中,加入 2 mL 高氯酸(70%~72%),至沸水浴中加热 3 h~4 h,冷却后加入 8.4 mL 盐酸(盐酸浓度为 0.1 mol/L)。再置沸水浴中煮 2 min。准确稀释至 1 000 mL,此为储备液(硒含量:100 μg/mL)。应用时用 0.1 mol/L 盐酸将储备液稀释至每毫升含 0.5 μg 硒。于冰箱内保存。

8.2 DAN(1 g/L)试剂

此试剂在暗室内配制。称取 DAN(纯度 95%~98%)200 mg 于一带盖锥形瓶中,加入 0.1 mol/L 盐酸 200 mL,振摇约 15 min 使其全部溶解。加入约 40 mL 环己烷,继续振荡 5 min。将此液倒入塞有玻璃棉(或脱脂棉)的分液漏斗中,待分层后滤去环己烷层,收集 DAN 溶液层,反复用环己烷纯化直至环己烷中荧光降至最低时为止(约纯化 5 次~6 次)。将纯化后的 DAN 溶液储于棕色瓶中,加入约 1 cm 厚的环己烷覆盖表层,至冰箱内保存。必要时在使用前再以环己烷纯化一次。

警告:此试剂有一定毒性,使用本试剂的人员应有正规实验室工作经验。使用者有责任采取适当的安全和健康措施,并保证符合国家有关条例的规定。

8.3 混合酸液

将硝酸及高氯酸(70%~72%)按 2+1 体积混合。

8.4 去硒硫酸

取浓硫酸 200 mL 加于 200 mL 水中,再加入 48% 氢溴酸 30 mL,混匀,至沙浴上加热至出现浓白烟,此时体积应为 200 mL。

8.5 EDTA 混合液

- a) 0.2 mol/L EDTA:称取 EDTA 二钠 37 g,加水并加热至完全溶解,冷却后稀释至 500 mL;
- b) 100 g/L 盐酸羟胺溶液:称取 10 g 盐酸羟胺溶于水中,稀释至 100 mL;
- c) 0.2 g/L 甲酚红指示剂:称取甲酚红 50 mg 溶于少量水中,加氨水(1+1)1 滴,待完全溶解后加水稀释至 250 mL。

将上述 a)及 b)液各取 50 mL,加 c)液 5 mL,加水稀释至 1 L,混匀。

8.6 氨水(氨水+水=1+1)。

8.7 浓盐酸(相对密度 1.18)。

8.8 环己烷

市售品需先测试有无荧光杂质,必要时重蒸后使用,用过的环己烷可回收,重蒸后再使用。

8.9 10%盐酸溶液:取 10 mL 浓盐酸加 90 mL 水。

9 仪器

荧光分光光度计。

10 分析步骤

10.1 试样处理

10.1.1 粮食

试样用水洗三次,至 60℃ 烤箱中烘去表面水分,以不锈钢磨磨成粉状,储于塑料瓶内,放一小包樟脑精,盖紧瓶塞保存,备用。

10.1.2 蔬菜及其他植物性食品

取可食部,用蒸馏水冲洗三次后,用纱布吸去水滴,用不锈钢刀切碎,取一定量试样在鼓风烤箱中于 60℃ 烤干,称量,计算水分。磨成粉保存,备用。

计算时应折合成鲜样质量。

10.2 试样的消化

称含硒量约为 $0.01 \mu\text{g} \sim 0.5 \mu\text{g}$ 的粮食或蔬菜及动物性试样 $0.5 \text{g} \sim 2.0 \text{g}$ 于磨口锥形瓶内,加 10mL 5% 去硒硫酸,待试样湿润后,再加 20mL 混合酸液放置过夜,次日置沙浴上逐渐加热。当剧烈反应发生后,溶液呈无色,继续加热至白烟产生,此时溶液逐渐变成淡黄色,即达终点。某些蔬菜试样消化后出现浑浊,以致难以确定终点,这时可注意瓶内出现滚滚白烟,此刻立即取下,溶液冷却后又变为无色。有些含硒较高的蔬菜含有较多的 Se^{6+} ,需要在消化完成后再加 10mL 10% 盐酸,继续加热,使再回终点,以完全还原 Se^{6+} 为 Se^{4+} ,否则结果将偏低。

10.3 测定

上述消化后的试样溶液加入 20mL EDTA 混合液,用氨水(1+1)及盐酸调至淡红橙色($\text{pH}1.5 \sim 2.0$)。以下步骤在暗室操作:加 DAN 试剂 3mL ,混匀后,置沸水浴中加热 5min ,取出冷却后,加环己烷 3.0mL ,振摇 4min ,将全部溶液移入分液漏斗,待分层后弃去水层,小心将环己烷层由分液漏斗上口倾入带盖试管中,勿使环己烷中混入水滴,于荧光分光光度计上用激发光波长 376nm 、发射光波长 520nm 测定苯硒脑的荧光强度。

10.4 硒标准曲线绘制

准确量取标准硒溶液($0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$) $0.0, 0.2, 1.0, 2.0$ 及 4.0mL (相当于 $0.00, 0.01, 0.05, 0.10$ 及 $0.20 \mu\text{g}$ 硒),加水至 5mL 后,按试样测定步骤同时进行测定。

当硒含量在 $0.5 \mu\text{g}$ 以下时荧光强度与硒含量呈线性关系,在常规测定试样时,每次只需做试剂空白与试样硒含量相近的标准管(双份)即可。

10.5 结果计算

见式(2)。

$$X = \frac{m_1}{F_1 - F_0} \times \frac{F_2 - F_0}{m} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X ——试样中硒含量,单位为微克每克($\mu\text{g}/\text{g}$);

m_1 ——标准管中硒的质量,单位为微克(μg);

F_1 ——标准硒荧光读数;

F_2 ——试样荧光读数;

F_0 ——空白管荧光读数;

m ——试样质量,单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后两位。

11 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10% 。