

食物中硒含量的HPLC测定方法研究

江月仙 任玉翠 周彦钢 (浙江省医学科学院, 杭州 310013)

摘要 介绍了HPLC检测食物中硒的方法。实验表明:用甲醇水洗脱,灵敏度高,结果准确,在0.0—2.0 ug/ml范围内呈线性,相关系数, $r = 0.9998$,回收率为98.82%,变异系数RSD = 3.18%。

关键词 硒 HPLC 食物

硒是人体必需的微量元素,硒与健康是近二十年来生物学和医学中广泛。深入研究的一个领域,中国药典(1995年版)二部、食品卫生国家标准汇编采用分光光度法以及色谱法,本文在HPLC C_{18} 柱上以甲醇水作流动相荧光检测食物中硒的含量。本法与前述方法比较具有试剂成本低、毒性小,硒化物可定量检测的特点,最小检出量为 4×10^{-10} g。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Shimadzu 公司 LC-10AS 高效液相色谱仪,FLD-1荧光检测器,C-RIB 数据处理机。

1.2 试剂

1.2.1 0.1% 2, 3-二氨基萘(DAN)溶液配制参阅食品卫生国家标准 GB 12399—90

1.2.2 EDTA 混和液

量取50 ml 0.2 mol/l EDTA溶液,50 ml 10% 盐酸羟胺溶液及5 ml 0.02% 甲酚红指示液,加水至一升混匀。

环己烷、氨水,盐酸羟胺、EDTA-2Na、草酸铵、高氯酸、硫酸均为分析纯,硝酸为优级纯,甲醇为色谱纯、重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Shim-pack CLC-ODS 6×150 mm,

流动相: 甲醇: 水 = 85:15, 流速: 1.0 ml/min, 柱温: 30°C, 荧光检测器: 激发波长 $E_x = 378$ nm (EX-2滤光片), 发射波长 $E_m = 570$ nm (EM-4滤光片), 进样量: 20 μ l。

2.2 样品制备

2.2.1 标准硒溶液制备

精取1000.0 ug/ml的硒标准贮备液(食品卫生国家标准 GB 12399—90) 1.0 ml于100.0 ml容量瓶中,以0.1 mol/l 盐酸稀释至刻度,此液为标准中间液,再以0.1 mol/l 盐酸稀释汤硒浓度为1.0 ug/l的标准使用液。

2.2.2 样品处理及消化

准确称取0.2—0.3克动物性食物干粉,于50 ml试管中,加入4 ml 硝酸,2 ml 高氯酸,0.3 ml 硫酸浸泡过夜,次日沸水浴消化至淡黄色或无色透明,再加入2 ml 饱和草酸铵溶液,沸水浴加热1 h,试管中溶液即为样品消化液。

2.2.3 荧光化合物生成

于样品消化液中加入10 ml EDTA 混和液,用1:1氨水及10% 盐酸调至淡橙红色(pH 1.5—2.0),在暗室加入2.0 ml 0.1% DAN溶液,摇匀,沸水浴加热5 min,立即冷却,将全部溶液移入分液漏斗,加2.0 ml 环己烷,振摇3 min,静置10 min,弃去水层,环己烷层转入带塞试管取20 μ l进行

HPLC 分析。

2.3 标准曲线制备

精取1.0 ug/ml 硒标准溶液 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 ml, 加水至 5 ml, 按萤光物生成步骤进行测定, 根据硒浓度与峰面积计算汤回归方程为: $y = 14047.34x + 120.47$, $r = 0.9998$ 。

2.4 回收率试验

在样品中分别添加 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 ug 的硒, 按前述实验条件和方法进行分析, 每份测定 3 次, 结果平均回收率为 98.62%。(见表 1)

表 1 方法回收率试验结果

编 号	加入 硒 (ug)	测得 硒 (ug)	回 收 率 (%)	平均回收率 (%)
1	0	0.3426		
2	0.4	0.7242	95.40	
3	0.8	1.1622	102.45	$\bar{x} = 98.82$
4	1.2	1.4994	96.39	$RSD = 3.18$
5	1.5	1.9696	101.69	
6	2.0	2.3051	98.13	

2.5 稳定性试验

以硒溶液按萤光物生成步骤操作, 分别放置 0、1、2、4、6、8、10、12...24 小时, 重复测定, 结果表明: 苯骈硒二唑在 8 小时以内峰面积值基本不变, RSD 为 2.6%。

2.6 样品测定

精取 0.2—0.3 克不同品种的动物性样本 5 份,

按前述步骤进行测定, 每份测定 5 次, 根据样品峰面积与标准峰面积值之比, 外标法定量。结果见表 2。

表 2 样品硒分析结果

样品 名称	测得硒含量(ug)					变异 系数 (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	
蚯蚓	4.017	3.881	3.966	3.989	4.022	1.37
乌龟	0.372	0.380	0.375	0.382	0.370	1.44
蚂蚁	0.332	0.323	0.314	0.328	0.330	2.06
蜂蛹	0.022	0.021	0.020	0.021	0.022	3.83
牛蛙	0.049	0.050	0.047	0.051	0.049	2.70

3 讨论

3.1 本实验分别用乙腈、甲醇、85%甲醇作流动相, 考察苯骈硒二唑在 C18 柱上的分离情况, 结果灵敏度相当, 最小检出量为 0.4 ug, 因甲醇水价廉, 毒性低, 保留时间稍长, 故选作流动相。

3.2 样品在予处理过程中, 遇难消化时, 需适当添加高氯酸, 硫酸, 使其消化完全。

3.3 从表 2 五种样本测试结果看: 蚯蚓硒含量最高, 蜂蛹最低, 其余次之, 这符合样本的实际硒含量情况, 蚯蚓在土壤中以腐植质为食料, 对硒的浓集比较高; 而蜂蛹形成前的幼虫食料简单, 时间短, 故硒含量就低。根据杨光圻教授推荐的膳食硒日供给量范围(50—250 ug), 我们认为: 蚯蚓是一种很有开发价值的硒保健食品资源。